Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ciencias Veterinarias

Laboratorio de Ecología Molecular Aplicada
Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral

Tesis presentada para optar por el grado académico de
Doctora en Ciencias Veterinarias

EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A AGROQUÍMICOS SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO DEL YACARÉ OVERO *(Caiman latirostris)*, SU IMPACTO EN LA FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA, E IMPLICANCIAS EN LA CONSERVACIÓN, MANEJO Y USO SUSTENTABLE DE LA ESPECIE

Autora: Lic. Chacón Camila Felisa

Director: Dr. Siroski Pablo Ariel
Codirectora: Dra. Parachú Marcó María Virginia

2026

En la naturaleza nada existe solo.

Rachel Carson R, 1962.

AGRADECIMIENTOS

-A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (UNL), por permitirme realizar mi formación doctoral en el ámbito de una educación libre, gratuita y de calidad.

-Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar mi formación doctoral y por su compromiso histórico con el fortalecimiento de la ciencia pública, el desarrollo nacional y la soberanía científica argentina.

-Al CONICET, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y la UNL por los subsidios otorgados (PIP, PICT, CAID) que permitieron la realización de este trabajo de Tesis.

-Al Centro de Rescate, Investigación e Interpretación de Fauna "La Esmeralda" (CRIIF) por la disponibilidad de las instalaciones y recursos para la cría de animales.

-A mis directores de Tesis y Beca doctoral los Dres. Pablo A. Siroski y Ma. Virginia Parachú Marcó y Gisela Poletta, por su apoyo, orientación, conocimientos compartidos y acompañamiento a lo largo de todo el desarrollo de mi tesis, y por la confianza brindada en mi trabajo.

-A los Dres. Ayelén Amweg, Fernanda Rodríguez y Matías Belotti por su valiosa colaboración, por compartir generosamente sus conocimientos y por brindar su tiempo.

-A la Dra. Evelyn López González por permitirme crecer a su lado, por inspirarme y brindarme su compañerismo y amistad. Gracias por su tiempo, su apoyo incondicional y su constante predisposición en cada etapa de este camino.

-A todos mis colegas del Proyecto Yacaré, del Laboratorio de Ecología Molecular Aplicada y del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, por integrarme como equipo de trabajo y por compartir momentos y aprendizajes.

-A mi madre, mis hermanas, mis sobrinos, a mi gran familia, por ser un pilar fundamental y la fuerza que me impulsa, por acompañarme en este proceso de transformación, brindándome amor, comprensión y apoyo incondicional.

-A mis abuelos, con mención especial a Carri: "*En el mí, estás vos también*".

-A mis buenos amigas y amigos, solo tengo palabras de agradecimiento, sin lugar a duda este camino ha sido más liviano gracias a ellos.

-A mi compañero de vida, Agustín, por ser hogar, por empoderarme y por impulsarme a ser una incansable perseguidora de objetivos y sueños. Gracias por sostenerme, alentarme y creer siempre en que todo es posible.

Finalmente, un agradecimiento especial a mi Dios, por su fidelidad, por acompañarme siempre y nunca dejarme sola.

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas.....XV
Resumen XIX
Abstract.....XX
1. Introducción..... 1
1.1. Expansión agrícola Argentina y sus consecuencias ambientales 1
1.1.1. Agroquímicos formulados: definición y clasificación 4
1.1.2. Herbicidas..... 5
1.1.2.1. Glifosato (GLI)..... 5
1.1.2.2. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 8
1.1.3. Insecticidas 10
1.1.3.1. Clorantraniliprole (CAP) 10
1.1.3.2. Imidacloprid (IMI)..... 12
1.2. Especie en estudio: características y distribución geográfica..... 16
1.2.1. Situación histórica de las poblaciones silvestres de yacaré overo en Argentina .. 18
1.3. Estado del arte del metabolismo lipídico y su aplicación en el estudio del impacto ambiental de agroquímicos formulados..... 21
1.3.1. Metabolismo lipídico y éxito reproductivo en saurópsidos..... 22
1.3.2. Vías metabólicas de los lípidos y su regulación: características conservadas en saurópsidos 24
1.4. Análisis del metabolismo de lípidos como biomarcador de estrés ambientales: Implicancias biológicas en especies silvestres 31
1.5. Hipótesis y Objetivos 38
1.5.1. Hipótesis..... 38
1.5.2. Objetivo general 38
1.5.3. Objetivos específicos..... 38
2. Materiales y métodos..... 40
2.1. Comité de ética..... 40
2.2. Formulaciones de agroquímicos..... 40
2.3. Etapa 1: Ensayos experimentales 40
2.3.1. Exposición a formulaciones de agroquímicos durante el desarrollo embrionario de *C. latirostris*..... 40

2.3.1.1. Diseño experimental y tratamientos 43
2.3.2. Exposición *in vivo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas en pichones de *C. latirostris* 47
2.3.2.1. Diseño experimental y tratamientos 47
2.4. Etapa 2: Monitoreo de poblaciones silvestres 49
2.5. Variables registradas 51
2.5.1. Cuantificación de plaguicidas en el material de nido y en agua 51
2.5.2. Éxito de eclosión y malformaciones externas 51
2.5.3. Tamaño corporal y crecimiento a corto y largo plazo (OE5) 51
2.5.4. Determinación del perfil lipídico basal en yema de huevo de *C. latirostris* (OE1) 53
2.5.5. Extracción y separación de muestras de sangre 53
2.5.6. Determinación del perfil lipídico e indicadores de actividad hepática en plasma (OE2) 54
2.5.6.1. Determinación plasmática de metabolitos lipídicos 54
2.5.6.2. Determinación molecular de genes asociados al metabolismo lipídico 55
2.5.6.2.1. Extracción de ARN 55
2.5.6.2.2. Identificación de productos de PCR convencional 55
2.5.6.2.3. qPCR Real Time 58
2.5.7. Determinación de eicosanoides plasmáticos 60
2.5.8. Determinación de corticosterona plasmática 62
2.5.9. Peroxidación lipídica (OE3, 6 y 7) 62
2.5.10. Extracción de yema residual e histología de hígado, gónadas e intestino (OE4 y 6) 63
2.5.10.1. Determinación del perfil de ácidos grasos, tocoferoles y colesterol de yema residual de *C. latirostris* 63
2.5.10.2. Histología de hígado, gónadas e intestino 63
2.5.11. Determinación de hormonas sexuales en animales de 1 año (OE5) 70
2.6. Análisis estadísticos 71
3. Resultados 73
3.1. Etapa 1: Ensayos experimentales 73
3.1.1. Exposición a formulaciones de agroquímicos durante el desarrollo embrionario de *C. latirostris* 73
3.1.1.1. Cuantificación de plaguicidas en el material de nido 73

3.1.1.2. Resultados obtenidos de la temporada 2021 73
3.1.1.2.1. Éxito de eclosión de neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE2) 73
3.1.1.2.2. Tamaño corporal de neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE2) 75
3.1.1.2.3. Determinación del perfil lipídico e indicadores de actividad hepática en plasma en neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE2) 76
3.1.1.2.3.1. Determinación plasmática de metabolitos lipídicos 76
3.1.1.2.3.2. Determinación molecular de genes asociados al metabolismo lipídico 79
3.1.1.2.3.3. Expresión génica en sangre de neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas 83
3.1.1.2.4. Peroxidación lipídica en neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE3) 84
3.1.1.3. Resultados obtenidos de la temporada 2022 85
3.1.1.3.1. Éxito de eclosión de neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE2) 85
3.1.1.3.2. Tamaño corporal de neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE2) 87
3.1.1.3.3. Determinación del perfil lipídico e indicadores de actividad hepática en plasma en neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE2) 88
3.1.1.3.3.1. Determinación plasmática de metabolitos lipídicos 88
3.1.1.3.3.2. Expresión génica en hígado de neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas 91
3.1.1.3.3.3. Expresión génica en sangre de neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas 95
3.1.1.3.4. Determinación de corticosterona plasmática en neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos 96
3.1.1.3.5. Peroxidación lipídica en neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos (OE3) 97
3.1.1.3.6. Determinación del perfil lipídico basal en yema de huevo de *C. latirostris* (OE1) 98

3.1.1.3.6.1. Determinación del perfil de ácidos grasos, tocoferoles y colesterol de yema residual de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas 102
3.1.1.3.7. Histología de hígado, gónadas e intestino en la temporada 2022 (OE4)..... 109
3.1.1.3.7.1. Caracterización histológica del tejido hepático en neonatos de *C. latirostris* 109
3.1.1.3.7.2. Caracterización histológica de ovarios en neonatos de *C. latirostris*..... 117
3.1.1.3.7.3. Caracterización histológica de testículos en neonatos de *C. latirostris* 127
3.1.1.3.7.4. Caracterización histológica de intestino en neonatos de *C. latirostris*..... 130
3.1.1.3.8. Determinación de hormonas sexuales en animales de 1 año (OE5)..... 134
3.1.2. Exposición *in vivo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas en crías de *C. latirostris* 136
3.1.2.1. Cuantificación de plaguicidas en agua 136
3.1.2.2. Parámetros de crecimiento de crías de seis meses de *C. latirostris* luego de la exposición *in vivo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas 136
3.1.2.3. Determinación del perfil lipídico e indicadores de actividad hepática en crías de *C. latirostris* luego de la exposición *in vivo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas 138
3.1.2.4. Determinación de eicosanoides en plasma de crías de *C. latirostris* luego de la exposición *in vivo* a dos formulaciones de herbicidas y su mezcla..... 141
3.1.2.5. Peroxidación lipídica en crías de seis meses de *C. latirostris* luego de la exposición *in vivo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE3)..... 145
3.1.2.6. Determinación de hormonas sexuales en animales a los seis meses post-exposición *in vivo* (OE5)..... 146
3.2. Etapa 2: Monitoreo de poblaciones silvestres (OE6 y 7) 148
3.2.1. Éxito de eclosión de neonatos de *C. latirostris* provenientes de áreas ambientalmente expuestas y no expuestas 148
3.2.2. Tamaño corporal de neonatos de *C. latirostris* provenientes de áreas ambientalmente expuestas y no expuestas 149
3.2.3. Determinación del perfil lipídico e indicadores de actividad hepática en plasma en neonatos de *C. latirostris* provenientes de áreas ambientalmente expuestas y no expuestas 149
3.2.3.1. Determinación plasmática de metabolitos lipídicos..... 149
3.2.3.2. Expresión génica en sangre e hígado..... 150

3.2.4. Determinación del perfil de ácidos grasos en yema residual de *C. latirostris* provenientes de áreas ambientalmente expuestas y no expuestas 152
3.2.5. Histología de hígado, gónadas e intestino de *C. latirostris* provenientes de áreas ambientalmente expuestas y no expuestas 155
3.2.6. Análisis multivariado del estado metabólico en animales de áreas ambientalmente expuestas y no expuestas (OE7) 160
4. Discusión 163
4.1. Etapa 1 163
4.1.1. Éxito de eclosión 163
4.1.2. Parámetros de crecimiento 164
4.1.3. Perfil de ácidos grasos, tocoferoles y colesterol en yema residual basal y post-exposición embrionaria..... 165
4.1.4. Metabolitos lipídicos indicadores de actividad hepática 169
4.1.5. Lipoperoxidación..... 181
4.1.6. Corticosterona y respuesta al estrés asociada a la exposición 183
4.1.7. Expresión tisular específica de genes involucrados en el metabolismo lipídico 184
4.1.8. Expresión de genes asociados al metabolismo lipídico en respuesta a la exposición 188
4.1.9. Alteraciones histológicas y disrupción endócrina como consecuencias de la exposición a formulaciones de agroquímicos..... 195
4.2. Etapa 2 206
4.2.1. Monitoreo ambiental de poblaciones silvestres de *C. latirostris*..... 206
5. Conclusión general 213
6. Bibliografía..... 217
ANEXO I..... 260
ANEXO II 261

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa Nacional de Cultivos verano 2024 (INTA campaña 2024/2025; soja y maíz en color verde y azul, respectivamente)..... 1
Figura 2. Distribución geográfica de *Caiman latirostris* (Siroski y col., 2022)..... 16
Figura 3. Ejemplar adulto de *Caiman latirostris* (1,5 m de longitud aproximadamente). Barra = 10 cm. Fotografía: Gisela L. Poletta..... 17
Figura 4. Neonato de *Caiman latirostris* eclosionando del huevo (A) y luego de nacido (B). Barra = 1 cm..... 18
Figura 5. A: adulto de *Caiman latirostris* en un canal de agua lindante a un campo agrícola. B: nido de *Caiman latirostris* próximo a un cultivo agrícola. Fotografía: Gisela L. Poletta..... 20
Figura 6. Regulación del metabolismo de lípidos: interacción compleja entre los factores de transcripción del *receptor activado por proliferadores de peroxisomas* (*ppar*), el *receptor X de retinoides* (*rxr*) y los *receptores X hepáticos* (*lxr*). 28
Figura 7. Imagen satelital de la Reserva Natural Manejada "El Fisco". Recuadro: imagen de la laguna principal (Laguna Fisco), donde se colectan los huevos de *Caiman latirostris*. 41
Figura 8. Colecta de huevos en nidos de *Caiman latirostris* en el Área Natural Protegida El Fisco. 42
Figura 9. Ovocoscopía de huevos de *Caiman latirostris*. 43
Figura 10. Bandejas plásticas para incubación (23 x 17 cm = 0,034 m^2) con 6 huevos de *Caiman latirostris* (N de cada tratamiento = 18; N total = 216). 45
Figura 11. Imagen de la aplicación de las soluciones de agroquímicos formulados por pulverización sobre el material vegetal que cubre los huevos de *Caiman latirostris*. ... 45
Figura 12. Ensayo de exposición de crías de *Caiman latirostris* por inmersión voluntaria. 48
Figura 13. Imagen satelital de la Provincia de Santa Fe y las áreas de colección de huevos de *Caiman latirostris*. Recuadros: Estancia "El Lucero" (A); Laguna Fisco de la Reserva Natural Manejada "El Fisco" (B). 50
Figura 14. Ejemplar de *Caiman latirostris* luego de su individualización mediante corte de verticilos caudales. Barra = 1 cm..... 52
Figura 15. Caracterización histológica de ovarios en neonatos de *Caiman latirostris.* 65

Figura 16. Cortes transversales del complejo gónada-adrenal-mesonefro de hembras (A) y machos (B) de neonatos de *Caiman latirostris.* 66
Figura 17. Micrografía del oviducto de neonatos de *Caiman latirostris.* 68
Figura 18. Esquema representativo de alteraciones epiteliales observadas en el oviducto de hembras recién nacidas de *Caiman latirostris.* 68
Figura 19. Micrografía de testículo de neonatos de *Caiman latirostris.* 69
Figura 20. Sección del intestino de neonatos de *Caiman latirostris.* 70
Figura 21. Identificación de genes involucrados en el metabolismo lipídico en diferentes tejidos de juveniles de *Caiman latirostris* (n = 3). 79
Figura 22. Niveles de expresión relativas en diferentes tejidos de juveniles *Caiman latirostris* (n = 3). 81
Figura 23. Árbol de consenso de *Caiman latirostris.* 82
Figura 24. Expresión relativa (media ± EE) de los genes *g-6-pdh* (*deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato-A*) y *me* (*enzima málica*-B) en sangre de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2021. 84
Figura 25. Niveles de TBARS (nmol/mg de proteína; media ± EE) en neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2021. 85
Figura 26. Expresión relativa (media ± EE) en hígado de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022. 94
Figura 27. Expresión relativa (media ± EE) de los genes *g-6-pdh* (*deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato*-A) y *me* (*enzima málica*-B) en sangre de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022. 95
Figura 28. Concentración de corticosterona plasmática (ng/mL; media ± EE) de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022. 96
Figura 29. Niveles de TBARS (nmol/mg de proteína; media ± EE) en neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022. 97
Figura 30. Distribución porcentual de ácidos grasos saturados (A), monoinsaturados (B) y poliinsaturados (C) basales en yemas de *Caiman latirostris* en distintos estadios (E) del desarrollo embrionario. 102

Figura 31. Distribución porcentual de ácidos grasos saturados (A), monoinsaturados (B) y poliinsaturados (C) en yema de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022. 107
Figura 32. Concentración de colesterol en yema residual (mg/g; media ± EE) de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022. 108
Figura 33. Concentración de tocoferoles (µg/g; media ± EE) de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022. 109
Figura 34. Micrografía de Hígado. Venas centrales sin una organización definida (asterisco negro); tractos porta rodeados por hepatocitos (cuadro negro). H-E; 10X.. 110
Figura 35. Micrografía de hígado. Cápsula de Glisson (flecha negra); cordones celulares anastomosados y ramificados (cuadro negro); hepatocito en sección transversal (cuadro rojo); hepatocito en sección longitudinal (cuadro rojo con líneas entrecortadas). H-E; 40X. 111
Figura 36. Micrografía de hígado. Población celular predominante. 112
Figura 37. Micrografía de hígado. Triada portal. vena central (v); arteria (a); conducto biliar (bd) y vasos linfáticos (vl). H-E; 40X. 113
Figura 38. Micrografía de hígado de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición *in ovo* de distintas formulaciones de agroquímicos formulados y mezclas en la T2022. 114
Figura 39. Porcentaje del contenido lipídico (media ± EE) en hígado de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022. 116
Figura 40. Micrografía de ovario (o) de neonato de *Caiman latirostris.* 118
Figura 41. Micrografía de ovario de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición *in ovo* de distintas formulaciones de agroquímicos formulados y mezclas en la T2022. 120
Figura 42. Micrografía del oviducto de neonatos de *Caiman latirostris*. 122
Figura 43. Micrografías de oviducto de hembras de *Caiman latirostris* recién nacidas luego de la exposición *in ovo* de distintas formulaciones de agroquímicos formulados y mezclas en la T2022. 124

Figura 44. Altura promedio del epitelio del oviducto (µm; media ± EE) en gónadas de hembras de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos. 126
Figura 45. Micrografía de una sección transversal de testículo de *Caiman latirostris*. 128
Figura 46. Micrografía de testículo de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición *in ovo* de distintas formulaciones de agroquímicos formulados y mezclas en la T2022. 129
Figura 47. Imágenes de tres porciones diferentes del intestino de neonatos *de Caiman latirostris.* 130
Figura 48. Micrografía de intestino de un neonato de *Caiman latirostris*. 131
Figura 49. Micrografía de intestino de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición *in ovo* de distintas formulaciones de agroquímicos formulados y mezclas. 133
Figura 50. Metabolitos derivados de COX y LOX (ng/mL; media ± se) en plasma *de Caiman latirostris* luego de una exposición *in vivo* a las formulaciones de glifosato (GLI 2 %), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D 0,12 %) y su mezcla (M1), en comparación con el grupo control (CN)..... 143
Figura 51. Relación $PGE_2/PGF_2\alpha$ (media ± se) bajo diferentes condiciones de tratamientos: glifosato (GLI 2 %), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D 0,12 %) y su mezcla (M1), en comparación con un control negativo (CN). 144
Figura 52. Niveles de TBARS (nmol/mg de proteína; media ± EE) en pichones de 6 meses de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas. 145
Figura 53. Distribución porcentual de ácidos grasos saturados (A), monoinsaturados (B) y poliinsaturados (C) en yema residual de neonatos de *Caiman latirostris* provenientes de áreas controles no expuestas (NoExp) y áreas ambientalmente expuestas (Exp). 155
Figura 54. Micrografías de hígado de neonatos de *Caiman latirostris* provenientes de áreas no expuestas (A) y ambientalmente expuestas (B-F). 156
Figura 55. Micrografías de ovario de neonatos de *Caiman latirostris* provenientes de áreas no expuestas (A y B) y ambientalmente expuestas (C y D). 158
Figura 56. Micrografías de testículo de neonatos de *Caiman latirostris* proveniente de un área no expuesta (A) y ambientalmente expuesta (B). 159

Figura 57. Micrografía de intestino de neonatos de *Caiman latirostris* proveniente de un área control (A) y ambientalmente expuesto (B)..... 160
Figura 58. Análisis de componentes principales (PCA) basado en parámetros metabólicos de neonatos de *Caiman latirostris* proveniente de un área sin exposición y ambientalmente expuesto. 161
Figura 59. Análisis de componentes principales (PCA) basado en el estado metabólico de hembras y su relación con sus respectivas nidadas..... 162

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información y clasificación toxicológica de las formulaciones de agroquímicos según la OMS analizados en este trabajo de tesis. 15
Tabla 2. Estudios sobre el metabolismo de lípidos en saurópsidos (embriones y adultos) tras la exposición a contaminantes ambientales. 32
Tabla 3. Grupos experimentales de *Caiman latirostris* expuestos *in ovo* a GLI, 2,4-D, CAP, IMI y sus mezclas durante el desarrollo embrionario. 44
Tabla 4. Grupos experimentales de *Caiman latirostris* expuestos *in vivo* a formulaciones de plaguicidas de GLI, 2,4-D, CAP, IMI y sus mezclas. 49
Tabla 5. Información de genes estudiados y cebadores utilizados en PCR convencional. 56
Tabla 6. Información de genes estudiados y cebadores utilizados en qPCR Real Time 59
Tabla 7. Criterios histológicos para la identificación de posibles alteraciones tisulares en la gónada femenina de *Caiman latirostris* asociadas a la exposición a xenobióticos. ... 67
Tabla 8. Éxito de eclosión (media ± EE e IC) de los huevos de *Caiman latirostris* durante el ensayo de exposición embrionaria de la T2021. 74
Tabla 9. Longitud total (LT), longitud hocico-cloaca (LHC), peso y condición corporal (CC; media ± EE) de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición embrionaria a agroquímicos formulados en la T2021. 75
Tabla 10. Determinaciones bioquímicas (media ± EE) en neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición embrionaria a diferentes formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2021. 78
Tabla 11. Éxito de eclosión (media ± EE e IC) de los huevos de *Caiman latirostris* durante el ensayo de exposición embrionaria de la T2022. 86
Tabla 12. Longitud total (LT), longitud hocico-cloaca (LHC), peso y condición corporal (CC; media ± EE) de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición embrionaria a agroquímicos formulados en la T2022. 87
Tabla 13. Determinaciones bioquímicas (media ± EE) en neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición embrionaria a diferentes formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022. 90
Tabla 14. Perfil de ácidos grasos (media ± EE) en diferentes estadios del desarrollo embrionario de *Caiman latirostris.* 100

Tabla 15. Perfil de ácidos grasos (media ± EE) en yema residual de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición embrionaria a diferentes formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022. 104
Tabla 16. Niveles de estradiol, progesterona y testosterona (media ± EE) en plasma de *Caiman latirostris* al año de la exposición embrionaria. 135
Tabla 17. Parámetros de crecimiento (media ± EE) de pichones de seis meses de *Caiman latirostris* medidos antes (pre-exposición) y después (post-exposición) del tratamiento sub-crónico *in vivo* con formulaciones de agroquímicos y sus mezclas. 137
Tabla 18. Determinaciones bioquímicas (media ± EE) en crías de *Caiman latirostris* luego de la exposición *in vivo* a diferentes formulaciones de agroquímicos y mezclas. 140
Tabla 19. Parámetros de detección, tiempos de retención y validación analítica de nueve eicosanoides medidos por LC-MS/MS en plasma de *Caiman latirostris.* 142
Tabla 20. Niveles de estradiol, testosterona y radio (E2/T; media ± EE) en plasma de *Caiman latirostris* luego de seis meses de exposición *in vivo.* 147
Tabla 21. Longitud total (LT), longitud hocico-cloaca (LHC), peso y condición corporal (CC; media ± EE) de neonatos de *Caiman latirostris* provenientes de áreas no expuestas y ambientalmente expuestas 149
Tabla 22. Determinaciones bioquímicas (media ± EE) en neonatos de *Caiman latirostris* provenientes de áreas expuestas y no expuestas. 150
Tabla 23. Expresión relativa (a *β-actina*) de genes del metabolismo lipídico (-ΔΔCt; media ± EE) determinadas en sangre e hígado de neonatos de *Caiman latirostris* provenientes de áreas no expuestas y de áreas ambientalmente expuestas. 151
Tabla 24. Perfil de ácidos grasos (media ± EE) en yema residual de neonatos de *Caiman latirostris* provenientes de áreas no expuestas y áreas ambientalmente expuestas. 153

Abreviaturas

%: Por ciento

<: Menor que

>: Mayor que

Δ: diferencia, cambio o variación entre dos valores

ΔΔCt: método de cuantificación relativa de expresión génica

µL: microlitro

®: Marca registrada

°C: grado centígrado

2,4-D: 2,4-diclorofenoxiacético

AA: ácido araquidónico

ACC: acetil-CoA carboxilasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

AG: ácidos grasos

AGI: ácidos grasos insaturados

AGMI: ácidos grasos monoinsaturados

AGPI: ácidos grasos poliinsaturados

AGS: ácidos grasos saturados

ALB: albúmina

AMPA: ácido aminometilfosfónico

ARN: ácido ribonucleico

ATZ: atrazina

BH: Benjamini Hochberg

CAP: clorantraniliprole

CASAFE: Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes

CC: condición corporal

CE50: concentración efectiva 50

CIP: cipermetrina

CITES: Convención Internacional para el Tráfico de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre

CL: colesterol

CL50: concentración letal 50

CLy: colesterol en yema

cm: centímetro

CN: control negativo

col: Colaboradores

CORT: corticosterona

COX: ciclooxigenasa

CPF: clorpirifós

CPT: carnitina palmitoiltransferasa

CRIIF: Centro de Rescate, Investigación e Interpretación de Fauna

CV: coeficiente de variación

DE: disruptores endócrinos

DL50: dosis letal 50

DM: disruptores del metabolismo

E2: estradiol

EE: error estándar

EF: esfingolípidos

EL: esteroles

END: endosulfán

ER: receptores de estrógenos

EROs: especies reactivas de oxígeno

FA: formulaciones de agroquímicos

FAO: Organización para la Alimentación y la Agricultura

FAS: sintasa de ácidos grasos

FBC: factor de bioconcentración

FFL: fosfolípidos

FSH: hormona folículo estimulante

g: gramo

g-6-pdh: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GAM: gónada-adrenal-mesonefro

GE: grupo experimental

GF: glicerofosfolípidos

GH: hormona del crecimiento

GL: glicerolípidos

GLI: glifosato

GLM: modelos lineales generalizados

GLUC: glucosa

GOT: transaminasa glutámico-oxalacética

GPT: glutamato-piruvato-transaminasa

h: horas

ha: hectárea

HDL: lipoproteínas de alta densidad

H-E: hematoxilina y eosina

HHA: hipotálamo-hipófisis-adrenal

HPG: hipotálamo-hipófisis-gónada

i.a: ingrediente activo

IC: intervalo de confianza

ID: individuo

IMI: imidacloprid

Koc: coeficiente de adsorción orgánica

L: litro

LDH: lactato deshidrogenasa

LDL: lipoproteínas de baja densidad

LHC: longitud hocico-cloaca

LOX: lipooxigenasa

LP: lipoproteínas

lpl: lipoproteína lipasa

LPO: lipoperoxidación

LT: largo total

LXR: receptor X hepático

me: enzima málica

mg: miligramo

mL: mililitro

mm: milímetro

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica

OAG: β-oxidación de ácidos grasos

OE: objetivo específico

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONU: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

p.a: principio activo

P: progesterona

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PG: prostaglandina

ppar: proliferadores de peroxisomas

PT: proteínas totales

PTS: periodo termosensible

RR: Roundup Ready®

s: segundos

SPE: extracción en fase sólida

srebp: proteínas de unión al elemento regulador de esteroles

T: testosterona

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TBX: tromboxano

TCy: tocoferol en yema

TG: triglicéridos

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

USEPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

VTG: vitelogenina

Resumen

El creciente uso de agroquímicos en Argentina representa un problema de contaminación difusa por la magnitud y complejidad de las mezclas que afectan a los organismos no blanco, con posibles consecuencias poblacionales. Se evaluó el efecto de plaguicidas en concentraciones aplicadas a campo: glifosato (GLI, 1-2%), 2,4-D (0,06-0,12%), clorantraniliprole (CAP, 0,015-0,03%), imidacloprid (IMI, 0,1-0,2%) y tres mezclas a la menor concentración (M1: GLI+2,4-D; M2: CAP+IMI; M3: M1+M2) sobre el metabolismo lipídico y la fisiología reproductiva en *Caiman latirostris* tras exposiciones durante el desarrollo embrionario y a los seis meses de edad. Posteriormente, se evaluaron hembras y crías procedentes de ambientes perturbados y no perturbados. Los neonatos y crías expuestas experimentalmente, y los de áreas ambientalmente expuestos mostraron efectos adversos incluyendo alteración en la composición lipídica y de α-tocoferoles en la yema residual, alteraciones en el perfil lipídico plasmático, actividad hepática, desregulaciones en la expresión de genes asociados al metabolismo lipídico en hígado y sangre, daño histológico en hígado e intestino y desorganización gonadal, así como cambios en la condición corporal. Los niveles plasmáticos de hormonas sexuales se mantuvieron alterados incluso seis meses después de la exposición. Estos hallazgos demuestran que en estadios tempranos los caimanes son altamente sensibles a estos xenobióticos, afectando el metabolismo lipídico y la fisiología asociada. En individuos de ambientes naturales, el estado metabólico materno influyó en la programación metabólica de su descendencia, mostrando que la exposición crónica de las hembras podría trascender en la dinámica reproductiva de la especie incluso, con efectos transgeneracionales.

Abstract

The increasing use of agrochemicals in Argentina represents a diffuse pollution problem due to the magnitude and complexity of the mixtures that affect non-target organisms, with potential population-level consequences. We evaluated the effects of pesticides at field-applied concentrations: glyphosate (GLY, 1-2%), 2,4-D (0.06-0.12%), chlorantraniliprole (CAP, 0.015-0.03%), imidacloprid (IMI, 0.1-0.2%), and three mixtures at the lowest concentrations (M1: GLI+2,4-D; M2: CAP+IMI; M3: M1+M2) on lipid metabolism and reproductive physiology in *Caiman latirostris* following exposures during embryonic development and at six months of age. Subsequently, females and offspring from disturbed and undisturbed environments were evaluated. Experimentally exposed hatchlings and yearlings, as well as individuals from environmentally exposed areas, showed adverse effects including alterations in the lipid and α-tocopherol composition of the residual yolk, changes in plasma lipid profiles, hepatic activity, dysregulation of lipid-metabolism gene expression in liver and blood, histological damage in liver and intestine, gonadal disorganization and changes in body condition. Plasma levels of sex hormones remained altered even six months after exposure. These findings demonstrate that early life stages of caimans are highly sensitive to these xenobiotics, affecting lipid metabolism and associated physiological processes. In individuals from natural environments, maternal metabolic status influenced the metabolic programming of their offspring, showing that chronic exposure of females could impact the reproductive dynamics of the species, potentially with transgenerational effects.

1. Introducción

1.1. Expansión agrícola Argentina y sus consecuencias ambientales

En Argentina, la agricultura es una de las principales actividades económicas que además de abastecer al país, destina una buena parte de la producción a la exportación. La superficie continental de nuestro país abarca 2,8 millones de km^2, de los cuales en el año 2025 se registró que 19 millones hectáreas (ha) estuvieron destinadas a la producción agrícola. Según informes de la Bolsa de Cereales de Rosario (BCR), la campaña 2024/25 dejó una expansión interanual del área del 9,8 %, reflejando un aumento del 13 % en relación con el promedio de los últimos cinco años (Figura 1).

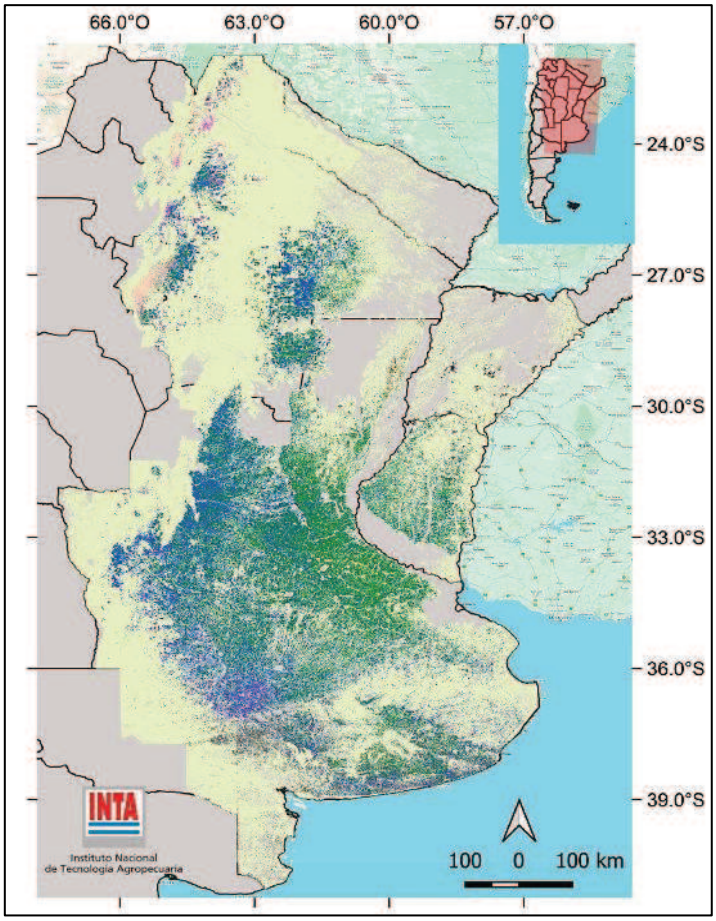

Figura 1. Mapa Nacional de Cultivos verano 2024 (INTA campaña 2024/2025; soja y maíz en color verde y azul, respectivamente).

En Argentina, la región núcleo agrícola, localizada principalmente en el sur de Santa Fe, el sudeste de Córdoba y el norte de la provincia de Buenos Aires, se consolida como la principal área de producción del país. Esta área se distingue por su alta productividad en cultivos extensivos, impulsada por la calidad excepcional de sus suelos, un régimen de precipitaciones favorable y su estratégica proximidad a puertos y vías navegables, factores que facilitan la logística y el comercio exterior. En esta región, los cultivos de soja, maíz y trigo son los que presentan la mayor superficie de ocupación del suelo (BCR, 2025). Según datos del Sistema de Información Simplificado Agrícola (SISA) para la campaña 2023/2024, Santa Fe destinó aproximadamente el 17,86 % de la superficie total al cultivo de soja. Junto con Buenos Aires (31,07 %) y Córdoba (26,61 %), estas tres provincias representan el 75,53 % de la superficie sembrada de soja en el país (SISA, 2024).

De acuerdo con el calendario agrícola, la fecha de siembra de la soja depende del ambiente de cultivo y del período de lluvias. En la región núcleo, la campaña de “soja de primera” comienza en septiembre con la preparación de los suelos y culmina en mayo con la cosecha. La "soja de segunda", que se siembra entre noviembre y enero y se cosecha hasta julio, presenta un rendimiento inferior al de la soja de primera. Esta disminución se debe a que su desarrollo está influenciado por la temperatura y el fotoperíodo, es decir, horas (h) de luz diarias; al sembrarse a inicios del verano, los días comienzan a acortarse, limitando el crecimiento final de la planta (Satorre y Andrade, 2021).

La expansión del cultivo de soja y maíz ha sido beneficiada por varios factores, entre ellos: la implementación de un modelo neoliberal de agronegocios, la manipulación genética por parte de las multinacionales con la producción de cultivos transgénicos de siembra directa y la amplia utilización de químicos asociados a la optimización de la producción agrícola con la minimización de costos y pérdidas (Carrasco y col., 2012; Satorre y Andrade, 2021). El crecimiento agrícola acelerado marcó una fuerte relación con otras empresas industriales que proporcionan los insumos para una producción rápida y libre de malezas, es decir, fábricas de fertilizantes y plaguicidas (Satorre y Andrade, 2021).

La revolución agrícola contemporánea se asocia a la implementación de la primera semilla de soja genéticamente modificada conocida como soja Roundup Ready® (RR)

producida por la empresa Monsanto y resistente al herbicida glifosato (GLI; Carrasco y col., 2012). La soja RR fue introducida y aprobada para su uso en Argentina en 1996 y a partir de ese momento su uso se ha expandido rápidamente en otros países del mundo, aumentando el uso de GLI y otras formulaciones de agroquímicos (FA) altamente tóxicos. Actualmente, Argentina es el tercer país con mayor número de organismos genéticamente modificados y uso de tecnologías transgénicas dependientes de FA, principalmente soja, maíz y trigo, las cuales predominan ampliamente en la región núcleo del país (Ferraro y col., 2020). De acuerdo con el informe de SISA (2023/2024), el 97,06 % del total de la superficie argentina sembrada consistió en semillas de soja RR (SISA, 2024). Además, la adopción de la siembra directa constituyó un pilar fundamental de esta revolución agrícola, caracterizada por su implementación masiva a nivel nacional. Esta se promocionaba como una técnica que reduce la degradación del suelo, disminuye la erosión hídrica y eólica, y conserva la materia orgánica, en comparación con el arado convencional (Satorre y Andrade, 2021). Sin embargo, estudios científicos evidencian que puede tener efectos negativos en la biodiversidad del suelo, afectando a organismos clave para la descomposición de la materia orgánica y el reciclaje de nutrientes (Ronco y col., 2024).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el 70 % de la deforestación mundial es causada por la expansión de la frontera agropecuaria (FAO, 2017). En nuestro país, las innovaciones en la agroindustria han acelerado este proceso desde la Región Pampeana hacia la Chaqueña (Carrasco, 2012). La deforestación está vinculada a factores que desestabilizan los ecosistemas, aumentan la pérdida de biodiversidad y reducen las funciones y servicios ecosistémicos (Carrasco, 2012; Satorre y Andrade, 2021). Además, la agroindustria no solo provoca estos problemas, sino que, a través de las aplicaciones sucesivas de FA en las áreas de cultivo, genera la degradación de las zonas circundantes (Brovini y col., 2021). En este sentido, se sabe que solo el 10 % de los plaguicidas aplicados alcanza su objetivo previsto; el resto ingresa y contamina diversas matrices ambientales, como suelo, polvo y agua (Ferraro y col., 2020; Brovini y col., 2021; Alaoui y col., 2024). Consecuentemente, el uso intensivo de FA elimina especies no objetivo, reduciendo la biodiversidad, al mismo tiempo que produce la homogeneización del ecosistema (Lupi y col., 2019; Satorre y Andrade, 2021; Navarro y col., 2024). Según la FAO, el uso global de agroquímicos alcanzó aproximadamente 3,73 millones de toneladas en 2023, lo que representa un aumento

considerable desde principios del siglo (FAO, 2025). En este mismo año, el continente americano importó alrededor de 1,9 millones de toneladas de FA, lo cual lo sitúa como el continente de mayor aplicación de estos compuestos en el mundo (FAO, 2025).

1.1.1. Agroquímicos formulados: definición y clasificación

Los plaguicidas son sustancias, o mezclas de sustancias, destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga que cause daño o interfiera con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera (FAO, 2006). Todas las FA presentan dos partes: una conformada por el principio o ingrediente activo (p.a o i.a), que es el constituyente que actuará controlando la plaga y otra parte conformada por los surfactantes, también denominados "inertes" o inactivos, por su falta de acción biocida *per se* (Arregui y col., 2013). Los adyuvantes incluyen aditivos como vehículos, emulsionantes, tensioactivos que mejoran las propiedades físicas y químicas del producto y facilitan la penetración del p.a. en el organismo blanco (INTA, 2015). Los agroquímicos se comercializan en formulaciones líquidas o sólidas, cuyos envases presentan etiquetas que incluyen el nombre comercial, la denominación química y común del p.a., su concentración, tipo de formulación, categoría toxicológica y banda de color correspondiente, así como instrucciones de uso y advertencias de seguridad (FAO y OMS, 2022). Además, la FAO y la OMS recomiendan declarar aquellos co-formulantes que representen un peligro para la salud o que contribuyan a la clasificación toxicológica del producto (FAO y OMS, 2022). Sin embargo, en la legislación argentina sobre etiquetado de productos fitosanitarios, regulada por el Servicio Nacional De Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), generalmente se declara de manera específica el principio activo, mientras que los coadyuvantes, inertes u otros componentes de la formulación suelen consignarse de forma general o como "c.s.p." (cantidad suficiente para), salvo que la autoridad regulatoria considere necesaria su identificación específica (SENASA, 2014). Sin embargo, la información sobre el mecanismo de acción o los riesgos de estos coadyuvantes no se incluye en el etiquetado de los agroquímicos, lo cual es una omisión grave, ya que a menudo son más peligrosos que el propio p.a. (Larramendy y col., 2010).

Las FA presentan un grado de toxicidad que puede variar de acuerdo con las propiedades químicas de sus constituyentes y a la existencia o no de interacciones entre ellos. Los

plaguicidas pueden clasificarse según la familia química a la que pertenecen, con propiedades químicas similares y generalmente un mismo modo de acción (FAO y OMS, 2022). No obstante, la forma más común de clasificar a los plaguicidas es considerando el organismo blanco sobre el cual hará el efecto para el que fue diseñado, es decir, herbicidas, insecticidas, fungicidas, entre otros (INTA, 2015).

1.1.2. Herbicidas

Los herbicidas son productos químicos elaborados para controlar especies vegetales no deseadas en la producción de cultivos, ya que podrían generar un impacto negativo en estos. Existen varias formas de clasificar los herbicidas, incluyendo cómo se usan, sus propiedades químicas y su modo de acción (FAOSTAT, 2021). Según su tipo, los herbicidas pueden actuar de forma localizada (de contacto), ser absorbidos y transportados dentro de la planta (sistémicos), o diferenciarse por su selectividad o persistencia en el suelo. A nivel fisiológico, interfieren en procesos clave como la fotosíntesis, la síntesis de pigmentos, la división celular y la producción de aminoácidos, o alteran el equilibrio hormonal al imitar las auxinas naturales de las plantas, provocando un crecimiento anormal que lleva a su muerte.

1.1.2.1. Glifosato (GLI)

El GLI [N-(fosfonometil) glicina sal monopotásica; $C_3H_7KNO_5P$; Nº CAS 1071-83-6] pertenece al grupo químico de los fosfonatos y se utiliza como herbicida sistémico no selectivo de post-emergencia, con un amplio espectro de acción. Este herbicida circula por el sistema vascular de las plantas una vez que ingresa en ellas a través de las hojas. El GLI actúa inhibiendo la enzima cloroplástica *5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa* (*EPSPS)*, esencial para la síntesis de aminoácidos aromáticos como triptófano, fenilalanina y tirosina (Funke, 2006). Este proceso metabólico no ocurre en mamíferos, lo que ha llevado a argumentar que el GLI no produce toxicidad significativa en ellos. Según la OMS (2019), está clasificado como Clase III (producto poco peligroso) para exposición oral e inhalatoria. Sin embargo, en 2015, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) lo reclasificó como Grupo 2A (probablemente cancerígeno para humanos). En ratas, la dosis letal 50 (DL_{50}) oral aguda es de 4230 mg/kg, con baja absorción intestinal, lo que permite su excreción casi sin metabolizar. La

Agencia de Protección Ambiental (EPA) clasifica a este compuesto como ligeramente tóxico cuando los valores de DL_{50} para peces se encuentran entre 10 y 100 mg/L, y prácticamente no tóxica cuando los valores de DL_{50} son superiores a 100 mg/L (EPA, 2015). En anfibios, los valores de DL_{50} para larvas se encuentran en el rango de 1,7 a 161 mg p.a./L, con diferencias marcadas entre formulaciones con y sin surfactantes (Lajmanovich y col., 2003; EPA, 2015). En aves, el GLI se considera de baja toxicidad, con DL_{50} oral superior a 4500 mg/L en patos y codornices (Solomon y col., 2007). Además, se han documentado efectos negativos en microorganismos del suelo, como Acidobacteriota, esenciales en procesos biogeoquímicos (Newman y col., 2016), lombrices (Arrojeria y col., 2016), abejas (Faghani y col., 2018) y crustáceos (Lares y col., 2022).

El GLI también afecta organismos fotosintéticos no blanco, causando fitotoxicidad, retraso en el crecimiento y letalidad (Ferreira y col., 2017). Estas aplicaciones impactan los ecosistemas circundantes, como parches de bosques y pastizales, reduciendo la biodiversidad vegetal (Lupi y col., 2019). En los suelos, la agricultura intensiva y el uso de GLI afectan la microbiota, mesofauna y macrofauna (bacterias, hongos, artrópodos, anélidos, entre otros), comprometiendo procesos clave como la descomposición de materia orgánica, el reciclaje de nutrientes y la fijación de nitrógeno (Ronco y col., 2024). En este contexto, el modelo agrícola basado en siembra directa, fuertemente dependiente del uso de herbicidas como el GLI, también favorece la proliferación de plagas emergentes debido a la ausencia de depredadores naturales y la simplificación del ecosistema por el monocultivo (Alaoui y col., 2024).

A 25 °C, el GLI se encuentra en forma de partículas en la atmósfera, siendo eliminado principalmente por deposición húmeda y seca debido a su baja presión de vapor. En el suelo, muestra una movilidad limitada, con un coeficiente de adsorción orgánica (Koc) entre 300 y 20100, lo que favorece una fuerte retención y reduce su disponibilidad para la biodegradación y la absorción por las plantas (Brovini y col., 2021). Es un compuesto estable en el aire, no volátil y resistente a la degradación fotoquímica. En medios acuáticos, permanece estable frente a la hidrólisis a pH 5-9, aunque su toxicidad se incrementa a valores de pH más altos. Presenta una baja bioconcentración en organismos acuáticos, con un factor de bioconcentración (FBC) de 0,52 (Brovini y col., 2021).

La persistencia del GLI en el suelo varía entre 2 y 197 días, y su degradación ocurre principalmente por acción bacteriana, generando ácido aminometilfosfónico (AMPA), un metabolito aún más persistente -con una vida media estimada entre 76 y 240 días- y también considerado tóxico (Aparicio y col., 2024). Este compuesto puede alcanzar aguas subterráneas a través de procesos de escorrentía y lixiviación. Incluso en ausencia de nuevas aplicaciones, se ha registrado la presencia de AMPA durante un período de hasta tres años, evidenciando su alta persistencia en el ambiente (Aparicio y col., 2025b). En Argentina, registros históricos han evidenciado la presencia de GLI y su metabolito AMPA en cursos de agua superficial, sedimentos asociados a áreas agrícolas y suelos cultivados, reflejando la amplia dispersión ambiental de estos compuestos en paisajes productivos intensivos. En agua superficial, los valores más frecuentes se ubicaron mayormente en rangos 0,2 y 700 µg/L para GLI y entre 0,1 y 6,5 µg/L para AMPA (Peruzzo y col., 2008; Aparicio y col., 2013; Ayarragaray y col., 2014; Primost y col., 2017; Demonte, 2020; Pérez y col., 2021; Peluso y col., 2023; Navarro y col., 2024). En sedimentos, las concentraciones se ubicaron principalmente entre 5 y 3294 µg/kg para GLI y entre 5 y 7220 µg/kg para AMPA (Peruzzo y col., 2008; Aparicio y col., 2013; Ayarragaray y col., 2014; Ronco y col., 2016; Primost y col., 2017; Pérez y col., 2021; Peluso y col., 2022, 2023). En suelos agrícolas, los valores registrados oscilaron entre 35 y 1500 µg/kg para GLI y 300 a 2256 µg/kg para AMPA (Aparicio y col., 2013; Pérez y col., 2021). Existen, no obstante, episodios puntuales de contaminación extrema, en los cuales se registraron concentraciones de GLI en agua de hasta 73000 y 105000 µg/L, asociadas al manejo inadecuado de envases vacíos de herbicidas (Sasal y col., 2017). Estudios actuales han confirmado concentraciones de GLI en aguas subterráneas de hasta 10000 µg/L durante eventos de lluvias intensas, superando ampliamente los límites internacionales recomendados para agua de consumo humano (Aparicio y col., 2025a). Asimismo, tanto en fuentes públicas como privadas de agua potable se ha detectado la presencia simultánea de múltiples plaguicidas, incluyendo GLI, AMPA y atrazina, lo que refuerza la necesidad de implementar estrategias integrales de monitoreo y regulación (Aparicio y col., 2025b). Por su parte, Bernasconi y col. (2021) han propuesto al GLI y su metabolito AMPA como trazadores ambientales de actividades agro-productivas convencionales, destacando su elevada movilidad en el ambiente y su presencia en concentraciones equivalentes a aquellas reportadas como causantes de efectos subletales y letales en organismos edáficos.

En Argentina y a nivel mundial, las formulaciones comerciales a base de GLI más utilizadas son Roundup® o Panzer®. Si bien existen numerosos estudios sobre su toxicidad en organismos acuáticos (Lajmanovich y col., 2003; Brovini y col., 2021; Lares y col., 2022), los efectos en especies de cocodrilianos, cuyo modo de vida los hace vulnerables tanto a los residuos existentes en el agua, el suelo y los sedimentos, aún requieren una mayor atención.

1.1.2.2. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

El 2,4-D [$C_{10}H_{13}Cl_2NO_3$; Nº CAS 94-75-7] pertenece al grupo químico de los ácidos fenólicos y es el segundo herbicida más utilizado en nuestro país, después del GLI. En Argentina, no obstante, se restringió el uso de sus formulaciones más volátiles -ésteres butílicos e isobutílicos- mediante resoluciones de SENASA que prohibieron su importación desde diciembre de 2019, y su producción, fraccionamiento y comercialización a partir de julio de 2020 (N° Res 466/2019; SENASA, 2019). Este compuesto sistémico actúa como una auxina sintética, interfiriendo en el crecimiento y metabolismo de las malezas de hojas anchas al alterar el ácido indolacético, una auxina natural esencial para el crecimiento vegetal de las dicotiledóneas. Se aplica como herbicida post-emergente de la maleza.

Toxicológicamente, el 2,4-D está clasificado como Clase II (producto moderadamente peligroso) y, según la IARC, se considera posiblemente cancerígeno para los humanos (Grupo 2B). De acuerdo con el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), pertenece a la categoría 4, siendo dañino por ingestión y contacto dérmico. El 2,4-D presenta una DL_{50} oral y dérmica de 639–1646 mg/kg en ratas (Jote, 2019). Es nocivo para organismos acuáticos, con una concentración letal 50 (CL_{50}) a 96 h de 1008 mg/L en peces, provocando alteraciones en el comportamiento y efectos genotóxicos en peces expuestos a concentraciones entre 252 y 756 mg/L (Arcaute y col., 2016). En *Daphnia magna,* el 2,4-D presenta una CL_{50} a 48 h de 5,2 mg/L, lo que indica una toxicidad moderada para este microcrustáceo acuático. En aves, es ligeramente tóxico (LD_{50}: 540 - 668 mg/kg; Jote, 2019). Los valores de CL_{50} para exposiciones de 24 h en *Apis mellifera* se estimaron en 104 y 115 µg/abeja, mientras que la DL_{50} oral fue mayor a 10 µg/abeja, por lo que el 2,4-D se clasifica como prácticamente no tóxico para las abejas según los criterios internacionales de toxicidad (Jote, 2019).

Debido a su presión de vapor, el 2,4-D liberado al aire puede persistir en la atmósfera tanto en forma de vapor como adherido a partículas. Su degradación ocurre principalmente por reacciones fotoquímicas con radicales hidroxilos (vida media estimada de 19 h), así como por procesos de deposición húmeda y seca. En medios acuosos, este compuesto puede sufrir fotólisis directa (Jote, 2019). El 2,4-D presenta una alta movilidad en el suelo, con un rango de Koc de 20 a 136. No muestra una volatilización significativa en superficies húmedas o secas, ni en cuerpos de agua. La biodegradación es su principal mecanismo de eliminación en el suelo, generando diversos productos aromáticos hidroxílicos. Este proceso depende de factores como la concentración de 2,4-D, el contenido de agua y materia orgánica, la temperatura, y el grado de preexposición del suelo al herbicida o sus derivados. No obstante, se ha observado que la concentración del 2,4-D influye en el crecimiento de los microorganismos responsables de su degradación (Magnoli y col., 2023). En el agua, este compuesto no se adsorbe significativamente a sólidos suspendidos ni sedimentos. Su vida media en el agua oscila entre 10 y 50 días, siendo más prolongada en aguas oligotróficas o con altas concentraciones de 2,4-D. Los residuos de 2,4-D pueden ingresar a estanques y arroyos por aplicación directa o deriva accidental; por la entrada de herbicidas previamente depositados en lechos secos de arroyos, fondos de estanques o canales de riego; por escorrentía del suelo; o por lixiviación a través de la columna de suelo (Magnoli y col., 2023). En el suelo, su principal metabolito es el 2,4-DCP, cuya formación depende de la presencia de plantas y organismos del suelo. Este herbicida es estable a la hidrólisis, ya que carece de grupos funcionales susceptibles a este proceso en condiciones ambientales (pH 5-9). Es un compuesto lipofílico, y su FBC estimado es 3, indicando un reducido potencial de bioconcentración en organismos acuáticos (Jote, 2019).

Existen niveles guía de 2,4-D reportados en la bibliografía y por distintas instituciones reguladoras. Según la OMS (2011), los niveles guía para el agua de consumo presenta un valor máximo de 30 µg/L. Sin embargo, el límite guía establecido por la Unión Europea para el agua de consumo es de 0,1 µg/L, valor muy por debajo del límite reportado por la OMS (HSE, 2018). En cuanto al nivel máximo de vertido permitido en aguas superficiales para Argentina, la recomendación es que no supere los 4 µg/L (ACUMAR-UNSAM, 2022). En aguas superficiales de distintas regiones de Argentina, las concentraciones de 2,4-D reportadas oscilan entre 0,015 y 2,24 µg/L (Pérez y col., 2017; 2021; Corcoran y col., 2017; 2020; Reno y col., 2018; Peluso y col., 2023). En sedimentos del río Salado,

Peluso y col. (2022) reportaron concentraciones de hasta 6 µg/kg. Más recientemente, Navarro y col. (2024) evaluaron la presencia de 193 residuos de plaguicidas en cuerpos de agua superficiales, incluidos arroyos, canales, ríos, lagos, estanques y embalses, en diez países europeos y Argentina. En dicho estudio, el 2,4-D presentó la segunda concentración mediana más alta (0,821 µg/L) entre todos los compuestos analizados, siendo superado únicamente por el GLI. Además, el 2,4-D se destacó como uno de los plaguicidas más prevalentes en las muestras de agua de Argentina, con concentraciones superiores a las registradas en la mayoría de los otros sitios incluidos en el estudio (Navarro y col., 2024).

1.1.3. Insecticidas

Los insecticidas son sustancias o mezclas de sustancias químicas, orgánicas o inorgánicas, destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier insecto (FAOSTAT, 2021). Estos compuestos pueden ejercer su acción en cualquier estado de desarrollo del insecto, actuando como ovicidas, larvicidas o adulticidas si eliminan los huevos, la larva o el adulto, respectivamente. Su mecanismo de acción puede ser directo, afectando funciones vitales como la transmisión de impulsos nerviosos, la respiración celular o la síntesis de quitina. Existen insecticidas convencionales, que actúan sobre funciones fisiológicas comunes, y bio-racionales, que afectan procesos específicos del insecto como la muda, la reproducción o la alimentación (Ferré y col., 2008). Sin embargo, aún se requiere más investigación para evaluar sus efectos específicos y posibles impactos ambientales.

1.1.3.1. Clorantraniliprole (CAP)

Es un ácido [3-bromo-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-pirazol-5-carboxílico; $C_{18}H_{14}BrCl_2N_5O_2$; Nº CAS 500008-45-7] perteneciente a las diamidas antranílicas. Actúa mediante un mecanismo bioquímico altamente específico contra larvas de diversas plagas, incluyendo lepidópteros, dípteros, isópteros, coleópteros y hemípteros. Es un activador alostérico de los receptores de rianodina y de los canales de calcio intracelulares presentes en tejidos animales excitables como músculos y neuronas. Este mecanismo provoca incrementos transitorios de Ca^{2+} dentro de las células musculares, liberándolo del retículo sarcoplásmico. La liberación sostenida de este ion agota sus reservas, lo que

interfiere con el funcionamiento muscular del insecto, causando cese inmediato de la alimentación, letargo, parálisis y, finalmente, la muerte (Rodrigues y col., 2017).

El CAP está clasificado como de baja peligrosidad (Clase U - Clase IV, producto que normalmente no ofrece peligro; OMS, 2019) y, según el SGA, pertenece a la categoría 5. Puede ser dañino si es ingerido e irritante en contacto con la piel (Anguiano y Ferrari, 2019). En Argentina, el uso del CAP ha aumentado debido a su eficacia, larga persistencia y bajo impacto ambiental (Fonseca Peña y col., 2023). En mamíferos (ratas, ratones, perros y conejos), la toxicidad aguda del CAP es baja (DL_{50} oral y dérmica > 5000 mg/kg; CL_{50} por inhalación > 5,1 mg/L; EFSA, 2013). En peces, la CL_{50} a las 96 h para CAP es de 12,7 mg/L (Rathnamma y col., 2013). Según estudios de la EFSA (2013), en aves las CL_{50} por vía oral y dietética son mayores a 2250 mg/kg y 5620 mg/kg respectivamente, lo que indica una toxicidad aguda muy baja. En exposición oral de 48 h, la CL_{50} de CAP para *A. mellifera* es de aproximadamente 256 mg/L, mientras que para *A. cerana* se estimó en 109,7 mg/L, evidenciando una mayor sensibilidad de esta última especie (Li y col., 2024). En *D. magna*, la concentración efectiva 50 (CE_{50}) a 48 h para CAP se sitúa en 0,0116 mg/L, y la CL_{50} aguda se ha calculado en 9,4 µg/L, lo que revela una marcada toxicidad aguda (FMC, 2013).

A 25°C, el CAP permanece en la fase de partículas en la atmósfera y se elimina mediante deposición húmeda o seca. En el suelo, su persistencia varía según las condiciones: en aerobiosis puede persistir entre 233 y 886 días, mientras que en anaerobiosis alcanza hasta 208 días (NCBI, 2024). Su coeficiente de Koc de 244 a 464 indica movilidad moderada (EFSA, 2013). En el agua, el CAP se adhiere a sólidos en suspensión y sedimentos, pero no presenta volatilización significativa en superficies húmedas del suelo ni del agua. Debido a su persistencia y movilidad en el suelo, estas sustancias químicas pueden alcanzar las aguas subterráneas y superficiales a través de procesos de lixiviación y escorrentía (EFSA, 2013).

El CAP tiene un FBC estimado de 31, lo que sugiere un potencial moderado de bioconcentración en organismos acuáticos. En cuerpos de agua, puede degradarse por procesos químicos y fotoquímicos. Es estable en agua pura y en ausencia de luz solar, pero en aguas alcalinas (pH 9), su vida media es de 10 días. Bajo radiación ultravioleta, se transforma en un metabolito fotoestable, mientras que la presencia de iones nitratos y

ácidos húmicos tiene poca influencia en su fotodegradación (NCBI, 2024). Hasta el momento de la presentación de este manuscrito, no se han encontrado reportes en la bibliografía sobre la presencia de residuos de este insecticida en matrices ambientales.

1.1.3.2. Imidacloprid (IMI)

El IMI [1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilidenamina; $C_9H_{10}ClN_5O_2$; Nº CAS 138261-41-3] pertenece a la familia química de los neonicotinoides relacionados estructuralmente con la nicotina. Tienen un modo de acción específico sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina postsinápticos en el sistema nervioso central de los insectos (NCBI, 2024). Este compuesto es un insecticida sistémico, tóxico por contacto e ingestión, con eficacia comprobada en el control de insectos succionadores como pulgones, trips y moscas blancas, insectos del suelo como termitas, y algunas especies masticadoras como orugas defoliadoras. Es utilizado en diversos cultivos como cereales, maíz, algodón, sorgo, frutas, arroz, soja, remolacha azucarera, césped y hortalizas. IMI es uno de los neonicotinoides prohibidos por la Unión Europea en el año 2013, como consecuencia del declive global de los polinizadores (EFSA, 2015).

El IMI estimula las células nerviosas específicas de los insectos al actuar como un agonista en los receptores nicotínicos, imitando la acción de la acetilcolina. Toxicológicamente, está clasificado como Clase III (moderadamente peligroso) según la OMS (2019) y como Clase II por la EPA. Estudios realizados en ratones reportan una DL_{50} oral de 131 mg/kg en machos, con valores de 150-170 mg/kg en hembras (Arfat y col., 2014). En embriones y larvas de carpa común (*Cyprinus carpio*), la CL_{50} para embriones fue de 12,7 mg/L a las 24 h, mientras que en larvas se estimó en 93,7 mg/L para el mismo periodo (Islam y col., 2019). En aves, el IMI mostró una toxicidad aguda baja, con una CL_{50} oral a 5 días mayor a 5000 mg/kg; mientras que las DL_{50} fueron de 152-283 mg/kg (Tide International USA, 2018). En peces, la CL_{50} a 96 h es de 214,4 mg/L, indicando toxicidad moderada (Tide International USA, 2018). En *D. magna*, CE_{50} a 48 h fue superior a 336,92 mg/L, lo que sugiere baja toxicidad aguda en invertebrados acuáticos (NCBI, 2024). En abejas el IMI presentó una DL_{50} oral a 48 h mayor a 21 ng/abeja y una DL_{50} por contacto de 81 µg/abeja, evidenciando alta toxicidad para polinizadores (NCBI, 2024). En lombrices de tierra, se registró una CL_{50} de

10,7 mg/kg de suelo, lo que indica una toxicidad relevante para organismos edáficos (NCBI, 2024).

Liberado al aire a 25°C, el IMI permanece en la fase de partículas en la atmósfera, las cuales son eliminadas mediante deposición húmeda o seca. En el suelo, presenta una persistencia alta a extrema, con una vida media que varía entre 48 y 365 días, dependiendo de la cobertura vegetal (NCBI, 2024). La biodegradación, predominantemente microbiológica, es más rápida en suelos con mayor vegetación, aunque la degradación aeróbica puede ser más lenta.

El IMI muestra una movilidad de moderada a baja en el suelo, con valores de Koc entre 156 y 800 (NCBI, 2024). El potencial del IMI para encontrarse en el suelo, el sedimento y el agua, así como sus vías de ingreso al ecosistema acuático, están fuertemente determinados por sus propiedades fisicoquímicas, especialmente su alta hidrofilia (Iturburu, 2017). En cuerpos de agua, el compuesto se adhiere a sólidos suspendidos y sedimentos, lo que, combinado con su solubilidad y movilidad, puede provocar su llegada a cursos de agua superficiales a través del escurrimiento (Anguiano y Ferrari, 2019). En el medio ambiente, existe mayoritariamente en forma de catión debido a la disociación de sus moléculas, lo que favorece su adsorción en suelos ricos en carbono orgánico y arcilla en comparación con sus formas neutras.

Este insecticida no se volatiza en superficies húmedas del suelo ni en cuerpos de agua. La fotodegradación del IMI ocurre en h en el agua y en meses en el suelo, lo que lo hace susceptible a la fotólisis directa por la luz solar. El compuesto tiene un FBC estimado de 3, lo que indica un bajo potencial de bioconcentración en organismos acuáticos. No obstante, es estable a la hidrólisis en un rango de pH de 5 a 11, por lo que este proceso no constituye un destino ambiental relevante (NCBI, 2024).

Las concentraciones de IMI en agua dulce superficial a escala global varían desde no detectado hasta 9,14 µg/L (Li y col., 2025). En Argentina, se reportó una concentración de 0,56 µg/L para IMI en aguas superficiales (Pérez y col., 2017). Más recientemente, se registraron concentraciones en distintas matrices ambientales, con rangos de 8-33 µg/kg en suelo, 7-8 µg/kg en sedimentos y 0,008-0,19 µg/L en aguas superficiales (Pérez y col., 2021; Peluso y col., 2023). En el trabajo de Navarro y col. (2024), el IMI fue clasificado

entre las 20 sustancias con mayor frecuencia de detección en el compartimento ambiental en Argentina. Más aún, este trabajo mostró que un metabolito de IMI, el imidacloprid desnitro, excedió el Estándar de Calidad Ambiental de Promedio Anual (Comisión Europea, 2022). En este sentido, cabe destacar que la alta persistencia de este compuesto puede conducir a su acumulación tras aplicaciones sucesivas en los cultivos agrícolas y en los ambientes adyacentes.

En el siguiente cuadro se detallan las formulaciones de agroquímicos analizados en esta tesis, su clasificación (herbicidas e insecticidas) y la clasificación toxicológica de sus p.a. según la OMS (Tabla 1):

Tabla 1. Información y clasificación toxicológica de las formulaciones de agroquímicos según la OMS analizados en este trabajo de tesis.

Tipo específico	**Herbicidas**		**Insecticidas**	
Marca comercial	**Panzer Gold® (60,8%)**	**Deferon Hexil® - Adama® (50%)**	**Coragen® (20%)**	**Imistar® (35%)**
Principio activo	Glifosato (GLI)	Ácido 2,4-D	Clorantraniliprole (CAP)	Imidacloprid (IMI)
N° II CAS	1071-83-6	94-75-7	500008-45-7	138261-41-3
N° ONU	3077	3345	3082	2588
Tipo químico	Fosfonoglicina	Ácido fenólico	Diamidas antranílicas	Neonicotinoide
Formulación	SL	CE	SC	SC
Organismo diana	Malezas gramíneas perennes y anuales	Malezas de hoja ancha	Lepidópteros y otros	Pulgones y hormigas
OMS (clase)	III	II	IV-U	II
Cultivos donde se aplican	Soja, maíz, girasol, arveja, cebada, centeno, frutales	Trigo, maíz, arroz, y similares cereales	Soja, maíz, girasol, arveja, frutales	Soja, maíz, patata, lúpulo, algodón, hortalizas, frutales

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; GLI: Glifosato; CAP: Clorantraniliprol; IMI: Imidacloprid. SL: concentrado soluble; CE: concentrado emulsionable; SC: suspensión concentrada. Clase II: Moderadamente peligrosa; Clase III: Ligeramente peligrosa; Clase U / IV: Improbable que presente riesgo agudo.

1.2. Especie en estudio: características y distribución geográfica

El Orden Crocodylia (Clase Reptilia) está integrado por 26 especies distribuidas en todo el mundo (Vliet, 2024) de las cuales 10 se encuentran en Latinoamérica. En Argentina, se pueden encontrar dos de estas especies, ambas del género *Caiman* (familia *Alligatoridae*): *Caiman latirostris* (yacaré overo o ñato) y *Caiman yacare* (o yacaré negro). Ambas especies habitan en simpatría en gran parte de su distribución geográfica; sin embargo, el yacaré overo se extiende hacia las regiones más meridionales y occidentales debido a su mayor tolerancia térmica, ocupando las provincias de Jujuy, Salta, Formosa, Corrientes, Chaco, Misiones, Santiago del Estero, Entre Ríos y Santa Fe (Figura 2; Siroski y col., 2022). De esta manera, *C. latirostris* es el cocodriliano con distribución más austral en Sudamérica (Larriera y col., 2008; Siroski y col., 2022).

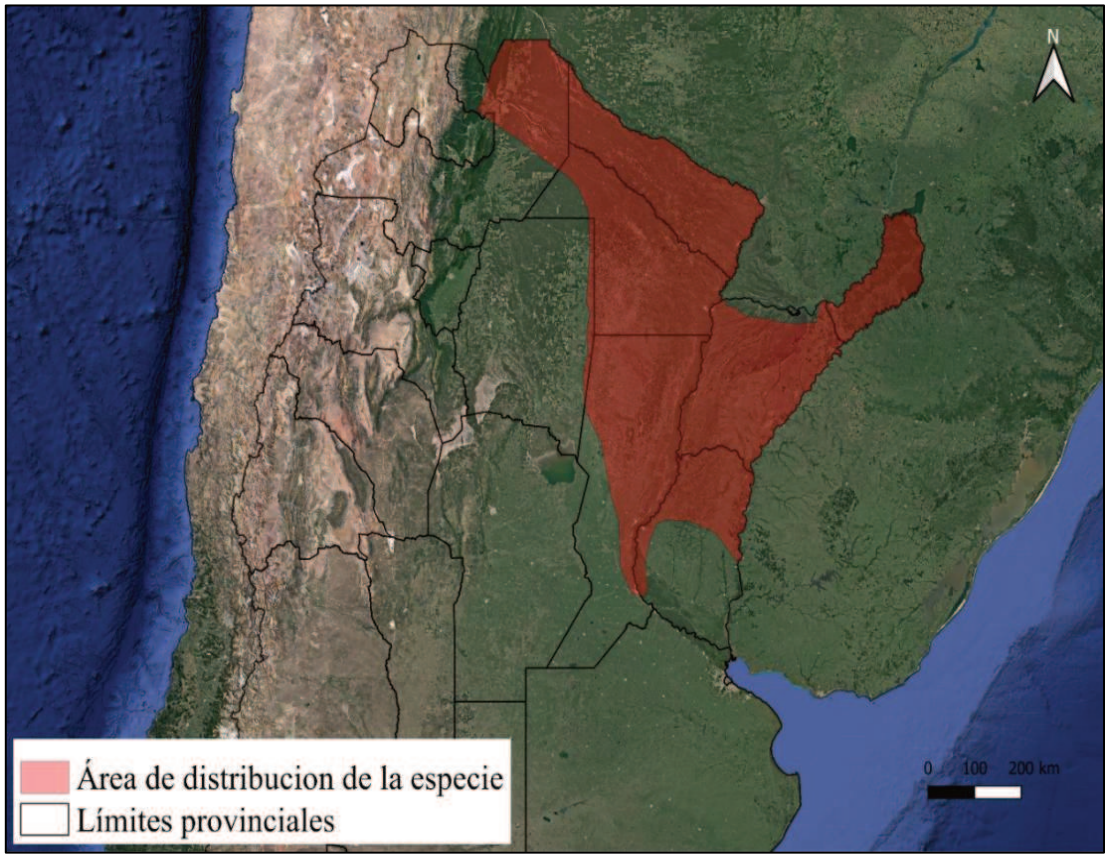

Figura 2. Distribución geográfica de *Caiman latirostris* (Siroski y col., 2022).

Por sus hábitos de vida, los caimanes están estrechamente asociados al agua, de manera que el hábitat del yacaré overo en la provincia de Santa Fe comprende los tres principales sistemas hídricos: las planicies de inundación del río Paraná, la cuenca del río Salado y la de los Saladillos (Larriera y col., 2008). Sin embargo, no son fáciles de observar en los grandes espejos o cursos de aguas limpias, ya que prefiere cuerpos de agua de poca profundidad, abundante vegetación y alimento, lugares cuyo acceso generalmente se encuentra limitado tanto para el hombre como para la mayoría de los predadores. *C. latirostris* posee un cuerpo comprimido dorsoventralmente, una cola musculosa y una piel prácticamente impermeable con manchas de camuflaje. La ubicación de sus ojos y narinas en posición dorsal les permite mantenerse sumergidos prácticamente por completo, pasando inadvertido tanto para presas como para predadores (Figura 3; Yanosky, 1990). En cuanto a su tamaño corporal, es una especie de porte mediano llegando a medir hasta 3,5 m de largo total y 80 kg de masa corpórea, a pesar de ser difícil encontrar individuos de este tamaño en la naturaleza (Larriera y col., 2008).



Figura 3. Ejemplar adulto de *Caiman latirostris* (1,5 m de longitud aproximadamente). Barra = 10 cm. Fotografía: Gisela L. Poletta.

Como especie ectotérmica que habita en regiones templadas, el yacaré overo presenta un ciclo estacional definido dependiente de dos factores climáticos principales, la

temperatura y el régimen de lluvias. Durante el invierno, presenta una baja actividad y se limita sólo a unos pocos movimientos para asolearse y sumergirse nuevamente en el agua. En primavera, conforme la temperatura ambiental asciende, su comportamiento es más activo, se alimenta con mayor frecuencia hasta iniciar la temporada reproductiva (noviembre-diciembre), período en el cual llegan al pico máximo de actividad (Larriera e Imhof, 2006). Los apareamientos se producen siempre en el agua y, una vez fecundadas, las hembras se alejan hacia lugares apartados para la construcción de los nidos (Larriera y col., 2008). Los mismos están constituidos por montículos de material vegetal, tierra, arena, ramas y deyecciones que actúan como incubadoras naturales por medio del calor del sol y la fermentación vegetal, de esta manera, producen una temperatura interior adecuada y relativamente constante (30-32 °C) durante toda la incubación. El período de incubación es de 70 días aproximadamente, a una temperatura promedio de 29-30°C (Larriera e Imhof, 2006). Las posturas se producen entre principios de diciembre y mediados de enero, con un promedio de 35 huevos y los neonatos eclosionan entre febrero y marzo, con un tamaño aproximado de 22 cm de largo y un peso promedio de 40 gr (Figura 4; Larriera y col., 2008).

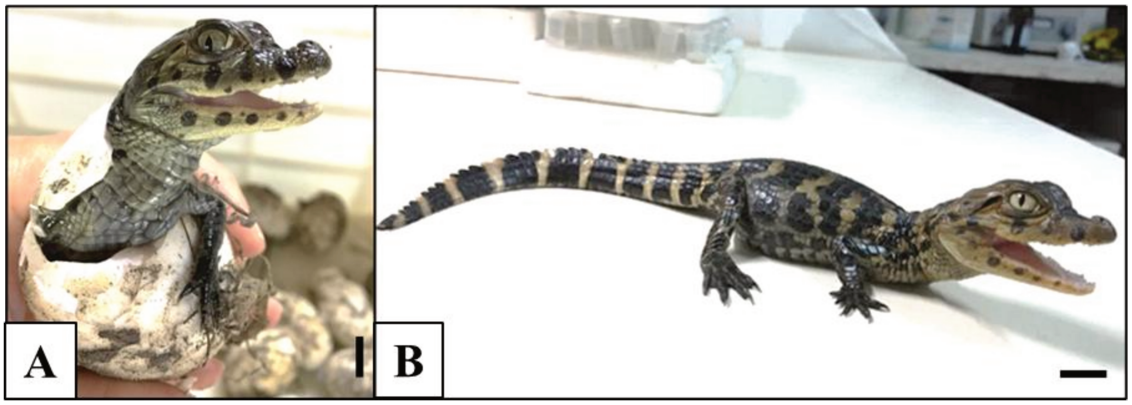

Figura 4. Neonato de *Caiman latirostris* eclosionando del huevo (A) y luego de nacido (B). Barra = 1 cm.

1.2.1. Situación histórica de las poblaciones silvestres de yacaré overo en Argentina

En el año 1990, las poblaciones silvestres de yacaré overo de la provincia de Santa Fe 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 (N° Res 283/00, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación). Este programa, basado en la técnica de "*rancheo*" (cosecha de huevos en la naturaleza, cría en cautiverio y devolución a la naturaleza), logró una importante recuperación de las poblaciones naturales, de manera que la especie fue transferida en el año 1997 al Apéndice II de CITES (Larriera y col*.,* 2008), permitiendo la comercialización de productos de esta especie (cuero y carne) cuando provengan de programas debidamente habilitados. Este tipo de programas involucraba activamente a los pobladores locales en la identificación y conservación de las áreas de nidificación, lo cual significaba un beneficio no sólo para la especie bajo manejo, sino para todos los taxa que comparten el hábitat (Larriera y col*.,* 2008).

Si bien estos programas llevaron a cabo una efectiva recuperación en las poblaciones naturales de caimanes en Argentina, desde hace varios años las mismas atraviesan otra problemática que afecta a muchas especies silvestres: la pérdida y degradación del hábitat como consecuencia del avance de la frontera agrícola, principalmente asociado al cultivo de soja. Muchas de las poblaciones de caimanes distribuidas en las grandes extensiones de campos agrícolas se encuentran expuestas a las sucesivas aplicaciones de las FA. Como organismos semi-acuáticos, se han avistado hembras reproductoras inmersas en canales de agua lindantes a zonas de cultivo, así como nidos de caimanes próximos a estas áreas (Figura 5-A). Además, el período del año de máxima aplicación de plaguicidas coincide a su vez, con la temporada reproductiva de esta especie, implicando un riesgo de contaminación, principalmente para los embriones en desarrollo y neonatos (Figura 5-B; Poletta y col*.,* 2009). En este contexto, resulta relevante evaluar el impacto generacional de la exposición crónica materna sobre el metabolismo lipídico de sus respectivos neonatos.



Figura 5. A: adulto de *Caiman latirostris* en un canal de agua lindante a un campo agrícola. B: nido de *Caiman latirostris* próximo a un cultivo agrícola. Fotografía: Gisela L. Poletta.

C. latirostris es considerado un excelente organismo centinela para evaluar y monitorear el impacto del estrés ambiental. En las últimas dos décadas, el grupo de investigación donde se realizó el presente trabajo de tesis ha desarrollado y adaptado una amplia gama de biomarcadores de respuesta temprana para evaluar el estado de salud de las poblaciones naturales de caimanes. Estos incluyen genotoxicidad, citotoxicidad, inmunotoxicidad, estrés oxidativo y expresión de genes relacionados con vías metabólicas de interés (Poletta y col., 2008; 2009; 2011; 2017; Latorre y col., 2013; Siroski y col., 2016; López González y col., 2017; Chacón y col., 2021; Odetti y col., 2020; 2023a, b). La estandarización de estas técnicas en sangre periférica de caimanes y otros reptiles fue el principal desafío debido a la ausencia de informes y metodologías previas. Estos avances permitieron optimizar el monitoreo de poblaciones silvestres, especialmente aquellas que habitan en sitios vulnerables, ya que las muestras de sangre pueden obtenerse sin daño a los animales. Además, algunos de estos biomarcadores (genotoxicidad, estrés oxidativo) constituyó el primer reporte sobre los efectos tóxicos de plaguicidas en el orden Crocodylia y, en ciertos casos, representó el primer antecedente documentado para el grupo de los reptiles (Poletta y col., 2008).

Recientemente, nuestro grupo de investigación avanzó en la aplicación de nuevas técnicas moleculares que permitieron realizar un estudio transcriptómico en muestras de sangre e hígado de *C. latirostris* juveniles expuestos agudamente a GLI y cipermetrina (CIP) (Poletta y col., 2018; 2019). Los resultados de este estudio indicaron una expresión

diferencial de genes asociados con el metabolismo y la degradación de lípidos, receptores de lipoproteínas, metabolismo del colesterol (CL) y la vía de señalización de los *ppars* (Poletta y col., 2018, 2019). A partir de este primer reporte, y considerando que los lípidos son la principal fuente energética para la reproducción, se inició una nueva línea de investigación orientada a dilucidar cómo los estresores ambientales, en particular la contaminación con agroquímicos formulados, afectan la regulación metabólica lipídica y, en consecuencia, la dinámica reproductiva de caimanes y otros reptiles nativos. Comprender estos procesos, desde el nivel molecular hasta el sistémico, es clave no solo para evaluar los mecanismos fisiológicos de respuesta, sino también para desarrollar herramientas de diagnóstico temprano que contribuyan a la conservación de estas especies. En este contexto, resulta de gran importancia evaluar de qué manera la exposición a contaminantes ambientales de relevancia en la región del litoral, como son los plaguicidas de amplio uso en cultivos extensivos, puede incidir en el metabolismo lipídico del yacaré overo y en la fisiología reproductiva a largo plazo a fin de estimar el impacto transgeneracional en crías nacidas de hembras ambientalmente expuestas en forma crónica.

1.3. Estado del arte del metabolismo lipídico y su aplicación en el estudio del impacto ambiental de agroquímicos formulados

Los lípidos son un grupo heterogéneo de macromoléculas con funciones fisiológicas muy importantes tanto en el reino animal como en el vegetal (Ferre y Foufelle, 2007). Considerando que son componentes esenciales de las membranas biológicas, participan en el transporte de vitaminas liposolubles, en procesos de señalización intra- y extracelular, en la transducción de señales y en la amplificación de cascadas regulatorias, su estudio resulta de especial interés (Koelmel y col., 2020). Además, dado que contienen el doble de calorías por gramo (g) en comparación con las proteínas o carbohidratos, los lípidos actúan como moléculas de reserva primaria y fuente de energía para los seres vivos (Ferre y Foufelle, 2007). Por estas razones, la homeostasis metabólica de los lípidos es esencial para mantener todos los procesos básicos y vitales de la vida de un organismo.

Existen varios estudios ecotoxicológicos sobre el metabolismo lipídico en especies silvestres, incluidos peces (Teng y col., 2019; Huang y col., 2022), anfibios (Lin y col., 2023; Zhao y col., 2023), aves (Kou y col., 2020; Seewagen y col., 2022) y mamíferos

(Huang y col., 2020; Zhang y col., 2023). En relación con el grupo de los saurópsidos no aviares, el metabolismo lipídico se ha estudiado en algunas especies de serpientes (Santos y Llorente, 2004), tortugas (Lawniczak y Teece, 2009; Clyde-Brockway y col., 2021) y lagartos (Tian y col., 2022; Yu y col., 2022); aunque estos estudios no son aplicados a la ecotoxicología. En cuanto a organismos cocodrilianos, los estudios realizados hasta el momento hacen referencia a la composición del perfil lipídico en individuos criados en cautiverio y provenientes de ambientes naturales (Lance y col., 2001; Campbell y col., 2008).

Las investigaciones sobre el almacenamiento y uso de lípidos en relación con ciertos parámetros ambientales (disponibilidad de alimentos, precipitación, temperatura y estrés ambiental) brindan información valiosa para el desarrollo de planes estratégicos de conservación (Price y col., 2016). Algunos estudios han demostrado que la exposición a compuestos químicos ambientales puede alterar drásticamente el perfil lipídico de un organismo; por lo tanto, es relevante evaluar el riesgo ecotoxicológico basado en los lípidos como indicadores de salud (Chen y col., 2019; Koelmel y col., 2020).

1.3.1. Metabolismo lipídico y éxito reproductivo en saurópsidos

La reproducción es un proceso que demanda una gran cantidad de energía y tiene un efecto crítico sobre el metabolismo lipídico, ya que la energía se obtiene a través de la movilización de reservas grasas (Hansen y col., 2013). Diversos factores median el proceso de regulación del metabolismo lipídico desde el desarrollo del ovocito, incluyendo la disponibilidad de sustratos en el medio, la actividad de los sistemas de transporte en la membrana plasmática y la regulación y expresión enzimática (Sirard, 2011). El suministro de energía al complejo cúmulo-ovocito mediante la β-oxidación de ácidos grasos (OAG) satisface la demanda metabólica de la maduración del ovocito y de las células del cúmulo circundantes, lo que determina la competencia de desarrollo del ovocito y afecta su calidad (Dunning y col., 2014).

El crecimiento y la maduración folicular involucran la síntesis y posterior depósito de grandes cantidades de vitelo estimulado por estrógenos en el ovocito en desarrollo (Jones y col., 2011). En la mayoría de los saurópsidos no aviares, el proceso de vitelogénesis ocurre de manera estacional y puede ser extenso o relativamente breve en los aligátores,

durando aproximadamente 5-6 semanas (Lance y col., 2003). Al inicio de la vitelogénesis, se produce un aumento en la masa hepática y en el contenido lipídico, junto con un incremento en los triglicéridos (TG), glicerofosfolípidos (GF) y CL plasmáticos en las hembras, debido a la movilización materna de estos recursos almacenados (Duggan y col., 2003; Hamann y col., 2002; Jones y col., 2011).

Durante este proceso, las células foliculares responden a la gonadotropina circulante produciendo estradiol (E2). Además, bajo la estimulación estrogénica, se produce una regulación positiva de los receptores de estrógenos (ER) hepáticos, y el hígado sintetiza dos precursores principales del vitelo: vitelogenina (VTG) y lipoproteínas (LP) de muy baja densidad (VLDL; Price y col., 2016). El desarrollo y crecimiento posterior de los ovocitos ocurre mediante la transferencia de proteínas plasmáticas maternas y lípidos transportados por VTG y VLDL, respectivamente, que son estimulados por esteroides ováricos y hormonas hipofisarias como la hormona del crecimiento (GH; Duggan y col., 2001, 2003; Hamann y col., 2002). La VTG y las VLDL pueden internalizar los lípidos utilizando el mismo receptor del ovocito mediante endocitosis (Price y col., 2016). El perfil lipídico del ovocito es dinámico y dependerá en gran medida del entorno folicular en el que se desarrolla (Sutton y col., 2003).

Múltiples hormonas modulan el progreso de la vitelogénesis, y otros esteroides ováricos y hormonas hipofisarias regulan las funciones del E2 durante este período (Jones y col., 2011). En aligatóridos, se han observado altos niveles de E2 en hembras con grandes folículos vitelogénicos y niveles crecientes de progesterona (P) y testosterona (T) durante su crecimiento (Lance y col., 2009). Probablemente, el papel de la T en saurópsidos no aviares sea necesario para el desarrollo completo del oviducto, mientras que la P parece estar presente en niveles elevados durante la ovulación (Guillette y col., 1997; Lance, 2009). Además, tanto los folículos ováricos como los cuerpos lúteos tienen la capacidad de sintetizar prostaglandinas (PG; Guillette y col., 1997). Se ha sugerido que estas hormonas no esteroides podrían tener un papel en la promoción de la vitelogénesis y la ovulación en saurópsidos no aviares (Perry, 2021).

En el vitelo de los huevos de cocodrilos, entre el 22 % y el 60 % son lípidos totales, de los cuales los ácidos grasos (AG) proporcionan la principal energía química para el desarrollo embrionario (Leiva y col., 2018). En estos organismos, existen dos etapas en

el uso de lípidos durante el desarrollo embrionario: una etapa temprana, caracterizada por la diferenciación celular y la organogénesis, con un nivel bajo de utilización de lípidos (Speake y Thompson, 1999); y una etapa posterior, donde se movilizan mayores cantidades de lípidos desde el vitelo, indicando una tasa más alta de hidrólisis y utilización de lípidos (Speake y col., 2003). Existe evidencia de que el patrón de consumo de energía por parte del embrión podría predecir un "embrión sano" en diversas especies (McKeegan y Sturmey, 2011).

Se ha observado un aumento en los AG libres en el vitelo de varios saurópsidos no aviares durante el desarrollo tardío, cuando el uso de lípidos es extenso (Speake y col., 2003; Lawniczak y Teece, 2009). Luego, ocurre la reesterificación y reensamblaje de TG, fosfolípidos (FFL) y ésteres de CL por una variedad de enzimas aciltransferasas, junto con la síntesis de apolipoproteínas (Apos), formando así lipoproteínas como las VLDL (Thompson y col., 2002).

Las VLDL se liberan posteriormente en la circulación embrionaria para su transporte al embrión (Thompson y col., 2002). El vitelo de los saurópsidos contiene hormonas esteroides que se depositan durante la vitelogénesis mediante transferencia materna, cuyas concentraciones cambian a lo largo del desarrollo embrionario (Jones, 2011). Además de nutrientes y hormonas, se incorporan factores de crecimiento secretados en el tracto reproductor femenino, estableciéndose que este proceso de inversión materna puede proporcionar información sobre la salud y el estado metabólico de la madre (Nelson y col., 2010). Finalmente, los materiales restantes suministrados en el vitelo de los saurópsidos que no se utilizan para el crecimiento y desarrollo embrionario pueden almacenarse como vitelo residual o absorberse como grasa corporal después de la eclosión (Thompson y col., 2002).

1.3.2. Vías metabólicas de los lípidos y su regulación: características conservadas en saurópsidos

La movilización de lípidos a través de la circulación sistémica requiere complejos macromoleculares como las LPs, que entregan lípidos insolubles en agua a diferentes tejidos para su almacenamiento o uso como fuente de energía (Jonas y Phillips, 2008). Las LPs, sintetizadas principalmente en el hígado y el intestino cumplen funciones

esenciales en la solubilización de lípidos, el reconocimiento de receptores y la regulación enzimática. La dinámica de los lípidos mediada por las LPs, junto con las vías metabólicas de lipólisis, OAG, lipogénesis y síntesis de CL constituye un conjunto de procesos esenciales que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis lipídica. Por lo tanto, para el desarrollo óptimo de un organismo, se requiere la adecuada expresión y regulación de las enzimas asociadas con tales vías. En saurópsidos, los lípidos se almacenan principalmente en la grasa corporal abdominal y el hígado (Huchzermeyer, 2003). El tejido hepático es esencial para el metabolismo de los lípidos porque es responsable de la oxidación, almacenamiento y síntesis de lípidos y LPs (Huang y col., 2017). El músculo es otro tejido que almacena lípidos como gotas de TG intramusculares, aunque su uso está asociado con demandas de energía a corto plazo que complementan las fuentes extramusculares de TGs (Price y col., 2016). En estos organismos, debido a su baja tasa metabólica, la energía liberada se invierte principalmente durante el ayuno (Azeez y col., 2017), la reproducción (Thompson y col., 2002), la vitelogénesis y el desarrollo embrionario (Duggan y col., 2003).

La lipoproteína lipasa (LPL) es la principal enzima en el proceso de lipólisis que hidroliza los TGs de los tejidos de almacenamiento (endógenos) y la dieta (exógenos) en tres AG libres y una molécula de glicerol cuando los tejidos necesitan energía. Una vez hidrolizados, los TGs deben ser movilizados a los tejidos diana por las LPs (Jonas y Phillips, 2008). La enzima lipolítica LPL es un miembro de la familia de las lipasas, que incluye la lipasa pancreática, hepática y endotelial (Fielding y Fielding, 2008). Al igual que en los mamíferos, se ha reportado actividad hidrolítica de LPL en peces (Chen y col., 2012, 2013), aves (Chen y col., 2023) y saurópsidos no aviares (Duggan y col., 2001; Griffith y col., 2013; Lin y col., 2020). Además del proceso de lipólisis, el suministro de energía para el metabolismo también resulta de la β-oxidación y la lipogénesis (Kersten y col., 2001).

La actividad metabólica de los lípidos está estrechamente vinculada a la dieta. En mamíferos, la lipogénesis ocurre tanto en el hígado como en el tejido adiposo debido a su alimentación rica en carbohidratos, mientras que, en cocodrilos, su dieta carnívora favorece una lipogénesis limitada, principalmente hepática (Ferre y Foufelle, 2007; Staton y col., 1990).

La biosíntesis de AG requiere, al igual que la OAG, una regulación estricta de la vía metabólica para proporcionar una fuente endógena de AG (Fielding y Fielding, 2008). El principal complejo enzimático que regula ambos procesos es la acetil-Coenzima A carboxilasa (ACC). Otras dos enzimas lipogénicas esenciales son la enzima málica (ME) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH), que proporcionan NADPH a partir de NADP+, reductores necesarios para la biosíntesis de AG a través de la descarboxilación irreversible del malato a piruvato, y la vía de las pentosas fosfato, respectivamente. El complejo multienzimático ácidos grasos sintasa (FAS) cataliza la síntesis de AG a partir de acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH, y está compuesto por dos subunidades idénticas pero enfrentadas, cada una con tres dominios que albergan enzimas específicas (Ferre y Foufelle, 2007). Este complejo enzimático se ha reportado en varios taxones (Maradonna y col., 2015; Azeez y col., 2019; Kou y col., 2020). La FAS sintetiza predominantemente ácidos grasos saturados (AGS) con cadenas de 16 C (ácido palmítico) que luego se alargan a AG de cadena larga (18 o más C de longitud; Ferre y Foufelle, 2007).

El metabolismo del CL es otro proceso esencial para el mantenimiento de las funciones biológicas y el desarrollo normal de un organismo. Promueve la síntesis de hormonas esteroides, que posteriormente afectan la diferenciación sexual y el desarrollo, la reproducción, el metabolismo, el comportamiento y la respuesta al estrés (Milnes, 2011; Jones, 2011). La síntesis de CL es sustancial para los tejidos que no pueden obtenerlo de las LPs plasmáticas de alta densidad (HDL), como el cerebro (Fielding y Fielding, 2008). El exceso de CL se elimina a través de HDL por el hígado y contribuye al equilibrio de la colesterolemia en el cuerpo, ya que las células periféricas no pueden descomponer el CL (Fielding y Fielding, 2008). Los sitios asociados con la síntesis de CL son el hígado, el intestino delgado, los riñones y los órganos endocrinos (Fielding y Fielding, 2008).

La regulación del metabolismo lipídico es un proceso fisiológico complejo y altamente dinámico de varias vías metabólicas que se cruzan en algún punto. Esta regulación incluye la activación o restricción de genes específicos a través de factores de transcripción que pueden verse influenciados por condiciones ambientales, nutricionales y hormonales, dependiendo de las necesidades metabólicas del organismo (Horton y col., 2002; Joseph y col., 2002).

Los factores de transcripción lipogénicos como los receptores activados por *proliferadores de peroxisomas* (*ppars*), las *proteínas de unión al elemento regulador de esteroles* (*srebps*) y el *receptor X hepático* (*lxr*) juegan un papel clave en la homeostasis lipídica al orquestar la transcripción genética de las enzimas involucradas en el metabolismo (Ferre y Foufelle, 2007). Regulan la expresión de muchos genes que codifican enzimas dedicadas a la síntesis y captación de CL, AG, TG y FFL, así como el cofactor NADPH, necesario para sintetizar estas moléculas (Horton y col., 2002; Joseph y col., 2002). Entre los genes que codifican enzimas reguladoras se mencionan *acc*, *fas*, *me*, *g-6-pdh* y *6-fosfogluconato deshidrogenasa* (*6pgdh*; Horton y col., 2002; Joseph y col., 2002). Al mismo tiempo, estos sensores lipídicos pueden ser regulados por señales intracelulares, ya que ciertos lípidos como el CL, los AG y sus derivados metabólicos ejercen efectos importantes sobre la fisiología (Park y col., 2005). Un resumen de los mecanismos que contribuyen a la homeostasis lipídica y su asociación con la reproducción se muestra en la Figura 6.

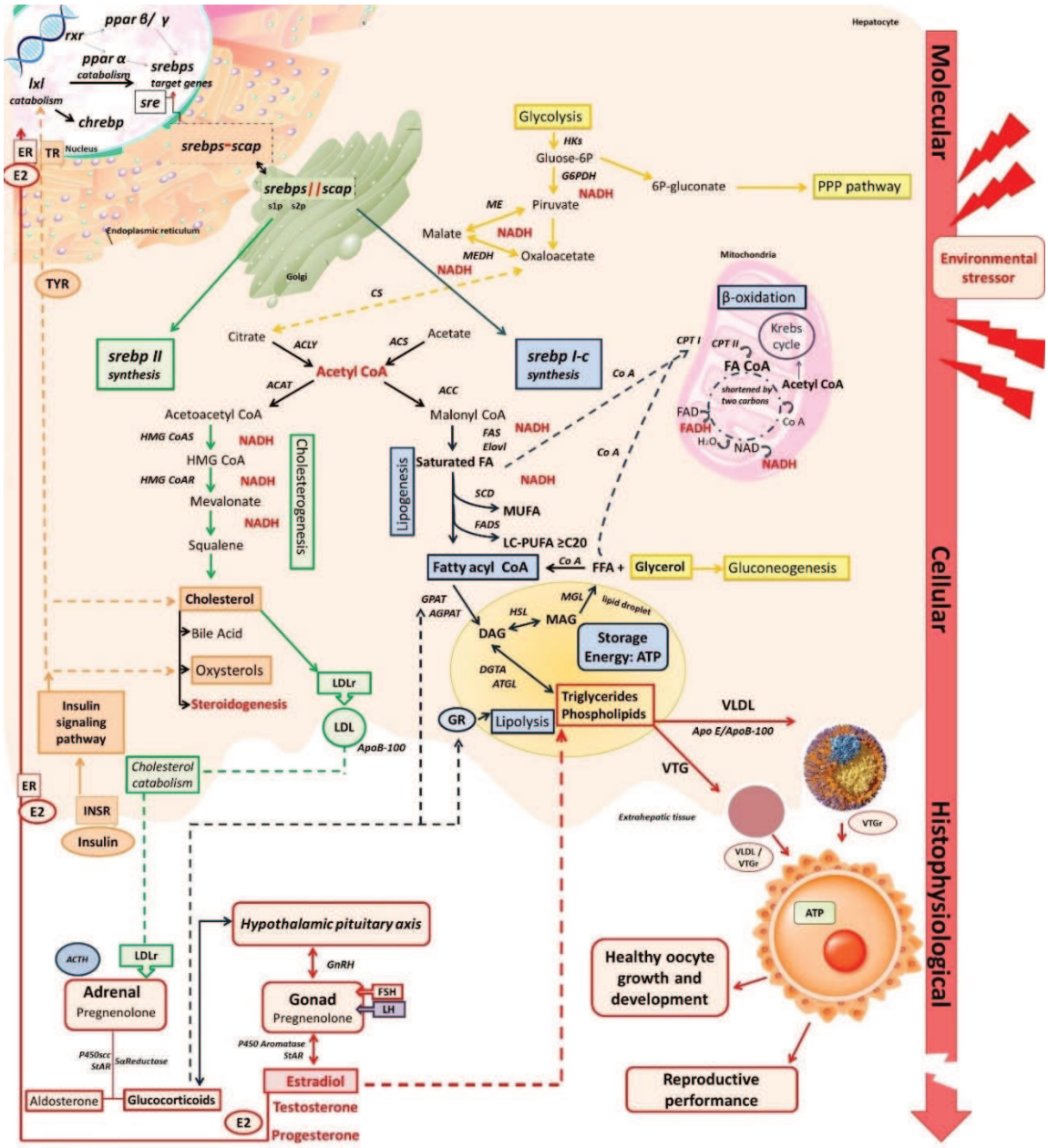

Figura 6. Regulación del metabolismo de lípidos: interacción compleja entre los factores de transcripción del *receptor activado por proliferadores de peroxisomas* (*ppar*), el *receptor X de retinoides* (*rxr*) y los *receptores X hepáticos* (*lxr*).

Se destaca el papel central del complejo *ppar* y *rxr* en la gestión de los recursos energéticos mediante la regulación de diversas proteínas involucradas en procesos como la lipólisis, la hidrólisis, la β-oxidación y la adipogénesis (vía azul). La actividad transcripcional de los *lxr* responde a niveles elevados de colesterol celular (CL) y controla genes relacionados con la absorción, el transporte, la salida y la conversión del CL en ácidos biliares (vías verdes). La activación de los *lxr* puede influir en la esteroidogénesis en la corteza suprarrenal promoviendo la salida de CL (vías rojas). Los *lxr* desempeñan un papel crucial en el metabolismo de los ácidos grasos (FA) regulando la *proteína de unión al elemento regulador de esteroles-1c* (*srebp-1c*) y genes responsables de la elongación y desaturación de los AG (vía azul). El *srebp-2* se enfoca en genes relacionados con la síntesis y la captación de CL (vías verdes y naranjas). Otras vías están asociadas con la glucosa (vías amarillas). Las líneas punteadas representan las rutas que pueden seguir los diferentes compuestos representados.

1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (AGPAT); 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG CoAR); 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMG CoAS); 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH); Acetil-coa carboxilasa (ACC); Acetil-Coenzima A aciltransferasa (ACAA); Acil-CoA aciltransferasa (ACAY); Acil-CoA sintetasa (ACS); Lipasa de triglicéridos en adipocitos (ATGL); Hormona adrenocorticotrópica (ACTH); Proteína quinasa activada por AMP alfa (AMPKα); Andrógenos (A); Apolipoproteínas (APOs); ATP citrato liasa (ACLY); proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (chrebp); Carnitina palmitoiltransferasa I y II (CPT I y CPT II); Citrato sintasa (CS); Enzima de escisión de la cadena lateral del citocromo P450 (P450sccc); Diacilglicerol (DAG); Diacilglicerol aciltransferasas (DGAT); Elongación de proteínas de ácidos grasos de cadena muy larga (ELOVL); Estradiol (E2); Receptores de estrógeno (ER); Sintasa de ácidos grasos (FAS); Ácidos grasos (AG); Flavina adenina dinucleótido (FAD); Hormona foliculoestimulante (FSH); Ácidos grasos libres (FFA; siglas en inglés); Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6P-DH); Glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT); Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); Hexoquinasas (HKS); Lipasa sensible a hormonas (HSL); Receptor de insulina (INSR); Peroxidación lipídica (LPO); Lipasa de lipoproteínas (LPL); Sintetasas de acil-CoA de cadena larga (ACSL); Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-AGPI); Lipoproteína de baja densidad (LDL); Receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR); Hormona luteinizante (LH); Malato deshidrogenasa (MEDH); Enzima málica (ME); Monoacilglicerol (MAG); Lipasa de monoacilglicerol (MGL); Ácidos grasos monoinsaturados (MUFA); Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida) (NADH); Ruta de las pentosas fosfato (PPP; siglas en inglés); Receptor de estrógenos (ER); Receptor de glucocorticoides (GR); Desaturasa de estearoil-coa (SCD); Proteína reguladora aguda esteroidogénica (STAR); Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HPG); Receptor de hormona tiroidea (TR); Tiroidea (TYR); Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL); Vitelogenina (VTG); Receptor de vitelogenina (VTGr). Autoría propia, tomado de Chacón y col. (2024).

Los factores de transcripción *srebps* son altamente conservados en vertebrados, con tres isoformas principales identificadas: *srebp-1a*, *1c* y *srebp-2* (Osborne y col., 2009). Los s*rebp-1a* y *1c* son reguladores importantes de la síntesis de AG en el hígado, y se codifican a partir de un solo gen, pero con sitios de inicio de transcripción alternativos (Horton y col., 2002). Por el contrario, codificado por un gen diferente, *srebp-2* activa los genes del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y varios genes necesarios para la homeostasis de CL en el hígado (Osborne y col., 2009). La regulación transcripcional de *srebps* está asociada con los receptores nucleares *lxrs* que forman heterodímeros con los *receptores de retinoides X* (*rXrs*; Horton y col., 2002). Cuando los esteroles se agotan o aumentan en las células, la regulación transcripcional del complejo *scap/srebp* y el elemento de respuesta a esteroles presente en los promotores de cada gen, activa o restringe la transcripción de todos los genes objetivo (Horton y col., 2002). Un mecanismo adicional de regulación es el control de la expresión génica de *srebps* por la regulación hormonal y el estado nutricional a través de las señales de insulina y glucagón (Repa y col., 2000). En el hígado y el tejido adiposo, el nivel de *srebp-1c* se reduce durante

el ayuno, suprimiendo la insulina y aumentando los niveles de glucagón, lo cual se revierte con la re-alimentación (Horton y col., 2002; Osborne y col., 2009).

Los *lxr* son receptores nucleares activados por oxisteroles que regulan el metabolismo de lípidos y colesterol, con funciones también antiinflamatorias (Figura 6). En el hígado, promueven la lipogénesis al inducir genes como *srebp-1c*, *fas* y *scd*, tanto de forma directa como mediante estimulación dependiente de insulina (Chen y col., 2007; Jakobsson y col., 2012). El factor estimulante aguas arriba (USF, por sus siglas en inglés) y *srebp-1* actúan sinérgicamente para activar el promotor de *fas* y otros genes lipogénicos (Jakobsson y col., 2012). El factor de transcripción *lxr* regula la lipogénesis a través de la activación de genes asociados a la biosíntesis de lípidos, función conservada en mamíferos y peces (Repa y col., 2000). Además, participa en la homeostasis del CL y puede influir en la gluconeogénesis y la oxidación de AG (Jakobsson y col., 2012).

Los *ppars* regulan la expresión de genes involucrados en la degradación y biosíntesis de lípidos, siendo esenciales para el control transcripcional del metabolismo lipídico (Fielding y Fielding, 2008). Existen tres isoformas de *ppar*: *pparα*, *β* y *γ*, todas codificadas por genes separados y con diferentes patrones de distribución tisular, aunque todas regulan la homeostasis lipídica según las necesidades de cada tejido (Chacón y col., 2025). El ligando endógeno para *pparα* son los AGs, por lo que participa en el control de la oxidación de lípidos, regulando la expresión de genes involucrados en las vías de oxidación mitocondrial y peroxisomal en tejidos con altas tasas de catabolismo (Fielding y Fielding, 2008). El receptor nuclear *pparα* también tiene efectos sobre la respuesta inflamatoria (Bougarne y col., 2019). La isoforma *pparγ* se encuentra principalmente en los adipocitos y macrófagos, contribuyendo al almacenamiento de grasa y diferenciación, y aparentemente también mejora la absorción de glucosa (GLUC) en sangre (Bougarne y col., 2019). En el músculo esquelético, *pparγ* actúa como mediador en el transporte y oxidación de AG; mientras que en el hígado tiene numerosos roles en el metabolismo de AG y GLUC (Lehrke y col., 2005). La expresión génica de *lpl* en el tejido adiposo es aumentada por *pparγ*, mientras que, en las células musculares, es estimulada por *lxr* y *rxr* (Fielding y Fielding, 2008).

1.4. Análisis del metabolismo de lípidos como biomarcador de estrés ambientales: Implicancias biológicas en especies silvestres

Una gran variedad de productos químicos antropogénicos puede causar efectos adversos para la salud al alterar el sistema metabólico (Grün y Blumberg, 2007; Heindel y col., 2017; Sun, 2017; Galoppo y col., 2020; Yuan y col., 2020). Estos productos químicos disruptores del metabolismo (DM) tienen la capacidad de promover cambios en el metabolismo de los lípidos a diferentes niveles, que incluyen alteraciones a nivel molecular, celular y sistémico (Braeuning y col., 2023). Dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición, la respuesta a estos productos químicos puede ocasionar efectos adversos, desde alteraciones en la expresión genética y la actividad enzimática hasta perturbaciones en los tejidos celulares, además de desequilibrios fisiológicos en el organismo expuesto (Heindel y col., 2017; Braeuning y col., 2023).

La alteración en la expresión génica debido a la exposición a contaminantes es el objeto de estudio en la toxicogenómica, que se ha convertido en un campo importante que integra información de diferentes *ómicas*, incluyendo transcriptómica, proteómica, metabolómica y lipidómica. Por otro lado, evaluar y monitorear los efectos dañinos de los productos químicos sobre la vida silvestre a nivel molecular es el campo de la ecotoxicogenómica (Snape y col., 2004). En varios taxones, se ha reportado la sensibilidad de los genes involucrados en el metabolismo de los lípidos frente a estresores ambientales y cómo estas alteraciones pueden afectar el metabolismo general (Kou y col., 2020; Huang y col., 2022; Yu y col., 2022; Zhao y col., 2023). La Tabla 2 resume algunos estudios sobre la expresión de genes que codifican enzimas asociadas al metabolismo de lípidos, cambios en el perfil lipídico y daño histológico como respuestas a la exposición a estresores ambientales en diferentes saúropsidos. Estos estudios reportan alteraciones en los niveles de expresión de los factores de transcripción *srebp-1c*, *pparα*, *pparγ*, proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (*chrebp*) y *lxr*. Dado que estos factores regulan la expresión de genes involucrados en las vías metabólicas de lípidos, CL, GL y GLUC, su sobreexpresión o subexpresión está directamente asociada con un aumento o disminución en el almacenamiento de metabolitos (Chen y col., 2013; Huang y col., 2013; Huang y col., 2020). Sin embargo, el impacto sobre el metabolismo lipídico varía según la especie (Levesque y col., 2002; Chai y col., 2017), y también puede depender de factores estacionales y del sexo (Hagenaars y col., 2013).

Tabla 2. Estudios sobre el metabolismo de lípidos en saurópsidos (embriones y adultos) tras la exposición a contaminantes ambientales.

Estresor ambiental	Taxa	Especie	Desórdenes del metabolismo lipídico	Referencia
Metales pesados				
Plomo (Pb)	Aves	*Coturnix japonica*	Cambios en los niveles relativos de expresión de ARNm de *ampkα I*, *lxrα*, *fas*, *me*, *scd I*, *cpt I* y *II*, *chrebp*, *srebp-1c*, *acc*. Daño histológico en hígado.	Kou y col., 2020
Plomo (Pb)	Aves	*C. japonica*	Alteración en el perfil lipídico. Cambios en los niveles relativos de expresión de ARNm de *cpt I* y *II*, *fas*, *pparα apo-B*, *acsl*, *acaa II*, *dgat II.* Daño histológico en hígado.	Wang y col., 2021
Mercurio (Hg)	Aves	*Setophaga coronata*	Baja oxidación de AG, expresión de transportadores de AG y regulación negativa de la expresión de *pparγ.*	Seewagen y col., 2023
Microplásticos				
	Testudines	*Emys orbicularis*	Alteración de GOT, GPT y alteración del perfil lipídico en plasma.	Banaee y col., 2021
	Aves	*Gallus gallus*	Alteración de GOT y GPT. Alteración del perfil lipídico en plasma e hígado. Daño histológico en hígado. Elevada LPO. Cambios en los niveles relativos de expresión	Yin y col., 2022

			de ARNm de *cpt I* y *II*, *fas*, *pparα*, *srebp-1c*, *scd*, *acac*, other.	
Formulaciones de pesticidas				
Cipermetrina y miclobutanil	Squamata	*Eremias argus*	Elevada LPO in suero, hígado, riñón, cerebro y gónadas.	Chen y col., 2019
Ácido perfluorooctanoico	Squamata	*E. argus*	Alteración del perfil lipídico en hígado. Elevada LPO. Daño histológico en gónadas. Disrupción endócrina. Daño en huevos.	Zhang y col., 2020
Clorantraniliprole	Squamata	*E. argus*	Alteración del perfil lipídico en suero. Disrupción endrócrina.	Yu y col., 2022
Sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas	Testudines	*Emydura macquarii macquarii*	Alteración del perfil lipídico en suero e hígado. Elevada LPO.	Beale y col., 2022a
Sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas	Testudines	*E. macquarii macquarii*	Alteración del perfil lipídico y otros metabolitos en yema de huevo.	Beale y col., 2022b
Vinclozolina	Testudines	*Pelodiscus sinensis*	Alteración del perfil metabólico en hígado, perfil de AG y CL en neonatos. Diminución del tamaño corporal.	Lu y col., 2022
Cipermetrina	Aves	*Gallus domesticus*	Alteración de GOT, GPT y alteración del perfil lipídico en suero. Daño histológico en hígado.	Anwar y Shakoori, 2010

Ácido perfluorooctanosulfónico	Aves	*G. domesticus*	Alteración del perfil lipídico en hígado. Elevada LPO en embriones.	Geng y col., 2018
Glifosato	Aves	*G. domesticus*	Alteración de GOT, GPT y alteración del perfil lipídico en suero en neonatos. Daño histológico en hígado. Elevada LPO.	Fathi, y col., 2019
Mezclas de contaminantes	Crocodylia	*Crocodylus niloticus*	Alteración del perfil lipídico en suero, hígado y tejido graso. Daño histológico en hígado.	Azeez y col., 2017

acaa II: acetil-CoA aciltransferasa 2; acac: acetil-CoA carboxilasa; acc: acetil-CoA carboxilasa; acsl: sintetasa de acil-CoA de cadena larga; GOT: transaminasa glutámico-oxalacética; ampkα I: proteína quinasa activada por amp alfa I; Apo-B: apolipoproteína B; GPT: glutamato-piruvato-transaminasa; chrebp: proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos; CL: colesterol; cpt I y II: carnitina palmitoiltransferasa I y II; dgat II: diacilglicerol aciltransferasa II; FA: ácidos grasos; fas: ácidos grasos sintasa; lxrα: receptor X hepático alfa; peroxidación lipídica (LPO); me: enzima málica; pparα y γ: receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa y gamma; scd I: desaturasa de estearoil-coa I; srebp-1c: proteína de unión al elemento regulador de esteroles I-c.

Varios contaminantes pueden promover la transformación redox de lípidos en especies reactivas de oxígeno (EROs), causando daño tisular debido a la peroxidación lipídica (LPO; Chen y col., 2019). Las funciones de las EROs como marcadores fisiológicos a lo largo del ciclo reproductivo están bien establecidas; durante la ovulación, se requieren en las células de la granulosa para romper las paredes foliculares (Miyamoto y col., 2010) y, antes de la luteólisis, inducen la apoptosis de las células luteales (Minegishi y col., 2002). En algunas especies de cocodrilos, se desarrollaron técnicas para evaluar la peroxidación lipídica debido al estrés oxidativo, como las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS; Dzul-Caamal y col., 2016; Poletta y col., 2016). La aplicación de este biomarcador a neonatos de *C. latirostris* expuestos a FA durante el período embrionario demostró una respuesta altamente sensible a la detección de LPO (Poletta y col., 2016; Burella y col., 2018; Odetti y col., 2020; 2023a, b).

El hígado ha recibido una atención especial en las investigaciones toxicológicas debido a sus funciones como órgano desintoxicante y su participación en el equilibrio energético y la homeostasis lipídica (Ferre y Foufelle, 2007). Hígado graso, vacuolización, congestión, núcleos picnóticos en los hepatocitos y desorganización del parénquima son algunos de los hallazgos histopatológicos en el hígado de saurópsidos y otras especies silvestres después de la exposición a xenobióticos (Chai y col., 2017; Kou y col., 2020; Tian y col., 2022; Chen y col., 2023).

En las especies de amniotas, la condición materna y la inversión de la hembra en la actividad reproductiva tienen una gran influencia en el tamaño, la viabilidad y la aptitud de la descendencia (Thompson y Speake, 2004). Los cambios en la composición de los AG y los TG en sangre debido al estrés y al estado nutricional materno alteran simultáneamente la composición de AG y TG en el líquido folicular ovárico (Dunning y col., 2010; McKeegan y Sturmey, 2011). Al mismo tiempo, estas alteraciones impactan en la composición de AG en los huevos y el desarrollo de un embrión saludable (Thompson y Speake, 1999; Dunning y col., 2010). Además, los xenobióticos y agentes infecciosos a los que las hembras están expuestas pueden influir en el rendimiento reproductivo a través de diferentes mecanismos. Estos agentes pueden ser transferidos a través de la yema y disminuir la viabilidad del huevo/embrión, afectando a las generaciones siguientes (Rauschenberger y col., 2004, 2009; Keller, 2019; Nilsen y col., 2020). Investigaciones previas en cocodrilos han demostrado que algunos contaminantes

en el material de anidación pueden ser transferidos a los huevos en incubación; por lo tanto, la transferencia materna no sería la única fuente de contaminación (Nilsen y col., 2020).

Recientemente, se reportó que los efectos del estrés ambiental sobre la salud de los cocodrilos se reflejan en variaciones del perfil lipídico y composiciones diferenciales de AG en sus tejidos, mediante un estudio lipidómico (Koelmel y col., 2019). Los principales metabolitos que indican la variación del lipidoma en los cocodrilos son el CL, los TGs, la composición de AG, VLDL y HDL (Lance y col., 2001; Huang y col., 2017). Asimismo, los cambios en el nivel de expresión de cualquiera de los sensores lipídicos antes mencionados debido a la exposición a xenobióticos pueden alteran la actividad metabólica, produciendo un efecto en cascada que podría llevar al desarrollo de enfermedades o estrés toxicológico en cocodrílidos y otros organismos. Estas características respaldan el potencial del análisis lipídico como un biomarcador sensible y eficaz para la detección temprana de estresores ambientales, además de contribuir a la identificación de vías bioquímicas alteradas.

Los cocodrílidos tienen un valor ecológico especial como componentes integrales de los humedales y su distribución está inevitablemente confinada a esos ambientes (Larriera y col., 2008). Más aún, como depredador tope, la salud de los caimanes refleja directamente la del ecosistema en el que habitan, ya que su rol ecológico contribuye a mantener el equilibrio trófico mediante la regulación de poblaciones de mesopredadores, tales como roedores, anfibios, entre otros. Estos organismos han demostrado ser centinelas de la contaminación ambiental, y se reconocen como modelos biológicos silvestres, en contraste con los modelos convencionales de laboratorio, lo que los vuelve especialmente valiosos en estudios de ecotoxicología bajo escenarios reales de exposición (Guillette y col., 1997; Poletta y col., 2008; Stoker y col., 2008). Sin embargo, el metabolismo lipídico en saurópsidos no aviarios, incluidos los cocodrílidos, sigue siendo en gran medida inexplorado, a pesar de sus funciones conservadas. Hasta el momento, no se han registrado investigaciones en especies de cocodrilos que integren la respuesta molecular con alteraciones en cascada a nivel de biomarcadores bioquímicos y daño tisular. Asimismo, hay una notable falta de información sobre la relación entre el metabolismo lipídico, la exposición a estresores ambientales y el desarrollo embrionario en cocodrílidos. Dado que muchas especies silvestres se encuentran en riesgo de exposición

a FA que se liberan al ambiente como mezclas, la interacción entre sus p.a. puede potenciar la toxicidad y provocar efectos impredecibles sobre la salud de los organismos expuestos.

En este contexto, resulta de gran relevancia evaluar cómo los FA y sus mezclas en concentraciones ambientalmente relevantes, pueden modular las respuestas moleculares involucradas en la homeostasis del metabolismo lipídico durante el desarrollo embrionario, desencadenando alteraciones estructurales y funcionales que pueden manifestarse como daños tisulares y, a largo plazo, traducirse en efectos negativos sobre la dinámica reproductiva de las poblaciones naturales de caimanes.

1.5. Hipótesis y Objetivos

1.5.1. Hipótesis

"La exposición a contaminantes ambientales, en particular a agroquímicos formulados, genera alteraciones sobre los mediadores, vías de señalización y genes implicados en el metabolismo lipídico del yacaré overo (Caiman latirostris), con consecuencias en la fisiología reproductiva, generando un impacto a nivel poblacional en los ambientes naturales, así como en los programas de uso sustentable de la especie".

1.5.2. Objetivo general

El aumento y la dispersión de contaminantes químicos en el medio ambiente generan un gran impacto sobre las especies expuestas, que puede manifestarse a distintos niveles de organización biológica e influir en la dinámica reproductiva de los organismos a largo plazo, amenazando la viabilidad de las poblaciones naturales más vulnerables. Atendiendo a esta problemática, el objetivo principal de este trabajo es determinar el efecto generado por la exposición a agroquímicos formulados sobre los mediadores, vías de señalización y genes implicados en el metabolismo lipídico del yacaré overo (*Caiman latirostris).* Asimismo, la presente tesis pretende aportar nuevos conocimientos sobre los efectos de la exposición a plaguicidas en el metabolismo de los lípidos, su implicancia a largo plazo sobre la dinámica reproductiva de la especie y el posible impacto sobre su conservación, manejo y uso sustentable.

1.5.3. Objetivos específicos

1- Determinar el perfil lipídico basal en yemas de huevos provenientes de un área sin exposición directa a agroquímicos formulados.

2- Determinar el perfil lipídico, su metabolismo e indicadores de actividad hepática en neonatos provenientes de huevos no expuestos y expuestos a formulaciones de glifosato, 2,4-D, clorantraniliprole, imidacloprid y mezclas de ellas, bajo condiciones controladas en concentraciones de uso a campo, y relacionar los resultados obtenidos con el perfil lipídico basal previamente establecido en yemas.

3- Evaluar el daño oxidativo a lípidos en sangre de neonatos expuestos a plaguicidas en condiciones experimentales como indicador del desbalance en el metabolismo lipídico.

4- Analizar y evaluar la histoarquitectura del hígado, gónadas e intestino en neonatos expuestos a plaguicidas en condiciones experimentales como indicador de posibles alteraciones funcionales.

5- Realizar un seguimiento de los neonatos para evaluar a largo plazo el efecto de la exposición a agroquímicos formulados sobre los niveles plasmáticos de hormonas sexuales, e identificar posibles modificaciones de la histoarquitectura gonadal como indicadores de infertilidad.

6- Realizar las mismas evaluaciones planteadas en los objetivos 1-5 pero en huevos y neonatos de nidos provenientes de zonas expuestas ambientalmente a mezclas de plaguicidas y otros de zonas control sin exposición directa.

7- Analizar el perfil lipídico, los indicadores de metabolismo lipídico y de actividad hepática en sangre de hembras adultas de áreas naturales expuestas y no expuestas, y relacionarlos con los datos obtenidos de los huevos y neonatos de su correspondiente nidada.

2. Materiales y métodos

2.1. Comité de ética

El manejo de los animales se realizó minimizando el estrés y sufrimiento de los mismos mediante métodos de manejo de rutina, de acuerdo con las pautas éticas para el cuidado y uso de animales en investigación. La captura, toma de muestras de sangre y eutanasia de los animales se realizaron siguiendo métodos basados en el trato humanitario para especies de cocodrilianos (Manolis y Webb, 2016) y fueron sometidos a la evaluación y aprobación del Comité Asesor de ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNL bajo el número de protocolo 626/20 (Acta Nº 72).

2.2. Formulaciones de agroquímicos

Se utilizaron en este estudio las siguientes formulaciones comerciales de plaguicidas: GLI Panzer® Gold [60,8% herbicida sal de dimetilamina N-(fosfonometil) glicina, $C_3H_8NO_5P$, CAS N° 1071-83-6]; 2,4-D Deferon Hexil® - Adama [50%; herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético ($C_8H_6Cl_2O_3$), CAS N° 94-75-7]; CAP Coragen® [20%;, insecticida ácido 3-bromo-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-pirazol-5-carboxílico, $C_{18}H_{14}BrCl_2N_5O_2$, CAS N° 500008-45-7] (PubChem, 2024) y IMI Imistar [35%; insecticida [1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilidenamina,1-[(6-cloro-3-piridinil) metil]-N-nitro-2-imidazolidinimina, $C_9H_{10}ClN_5O_2$, CAS N° 13826-41-3].

2.3. Etapa 1: Ensayos experimentales

2.3.1. Exposición a formulaciones de agroquímicos durante el desarrollo embrionario de *C. latirostris*

Los huevos empleados para los ensayos experimentales en el laboratorio se colectaron dentro de los 4 días luego de su postura en la Reserva Natural Manejada "El Fisco" (Departamento de San Cristóbal, Santa Fe, Argentina; Figura 7). Esta es un Área Natural Protegida (Ley 12.930, 2008) y ha sido utilizada como área de control en varias ocasiones por nuestro grupo de investigación, debido a la ausencia de actividades antrópicas potencialmente contaminantes en su interior, y habiéndose realizado determinaciones de

residuos de plaguicidas en agua y nidos (López González y col., 2017, 2019, 2021a, 2022; Odetti y col., 2020, 2023b; Figura 7).

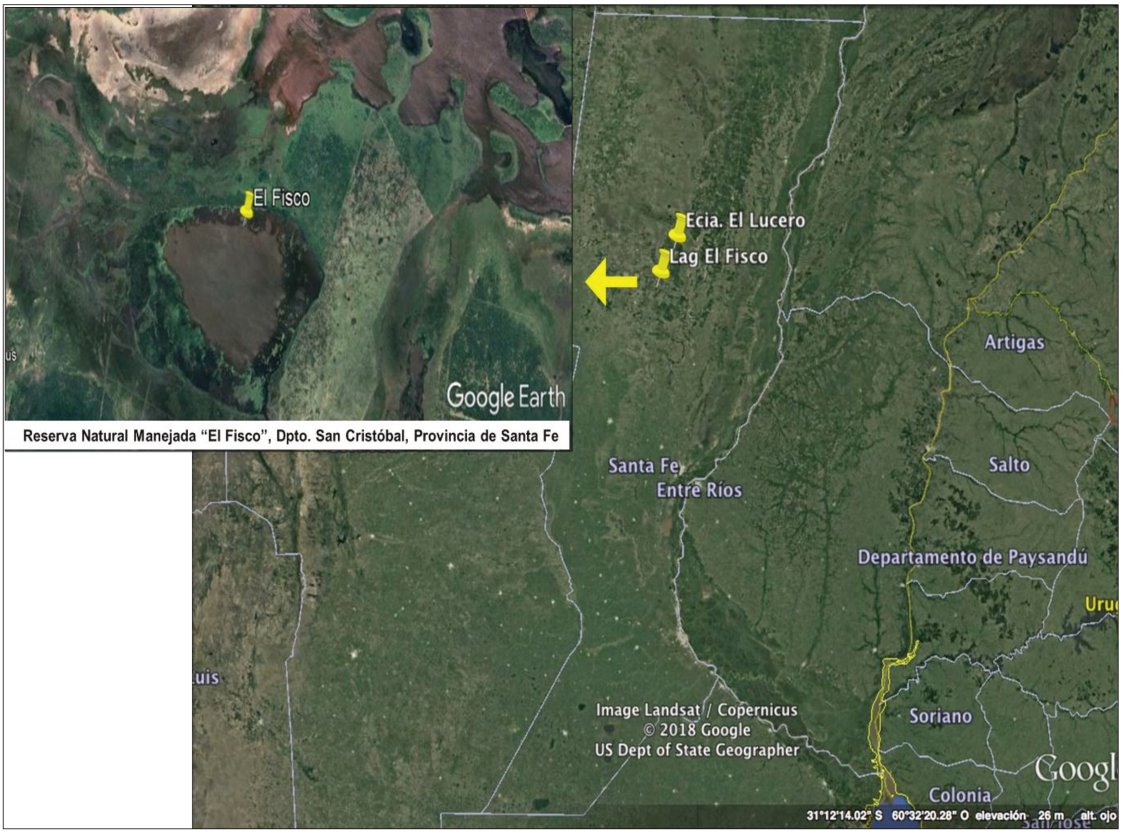

Figura 7. Imagen satelital de la Reserva Natural Manejada "El Fisco". Recuadro: imagen de la laguna principal (Laguna Fisco), donde se colectan los huevos de *Caiman latirostris*.

Imagen tomada de Google Earth el día 26 de octubre del año 2025.

Los huevos fueron marcados en la misma posición en la que se encontraban en el nido y colocados de igual manera en los recipientes, utilizando parte del material del nido para protegerlos durante el traslado (Figura 8).

.



Figura 8. Colecta de huevos en nidos de *Caiman latirostris* en el Área Natural Protegida El Fisco.

Luego fueron transportados según procedimientos de rutina a las instalaciones del Centro de Rescate, Investigación e Interpretación de Fauna "La Esmeralda" (CRIIF), Santa Fe. Los huevos fueron mantenidos en la sala de incubación a una temperatura de 31,5 ± 0,5 ˚C y una humedad del 95 %, condiciones adecuadas para la especie (Larriera y col., 2008).

Una de las principales causas de variabilidad en especies de cocodrilianos es el *efecto nido*, esto es, la influencia de la carga genética y fenotípica transmitida por los reproductores al embrión y al contenido del huevo, asociado también a la influencia del entorno de incubación de los huevos (Verdade, 1997). Para controlar dicho efecto, se emplearon huevos provenientes de diferentes nidos con el mismo tiempo estimado de postura como se describe en la próxima sección. Además, previo a la iniciación del ensayo de exposición a las FA, se verificó la viabilidad de los huevos a través del análisis de la banda opaca de calcificación por translucencia mediante ovoscopía (Donayo y col., 2002; Figura 9).



Figura 9. Ovocoscopía de huevos de *Caiman latirostris*.

2.3.1.1. Diseño experimental y tratamientos

Los huevos de seis nidos diferentes (36 huevos por nido) se distribuyeron equitativamente en doce (12) grupos experimentales (GE), cada uno con 3 réplicas de 6 huevos (total N = 216, Tabla 3; Figura 10). Luego fueron colocados en bandejas plásticas utilizando vermiculita como sustrato, cubriéndolos con material vegetal similar al del nido, libre de cualquier sustancia exógena. Las soluciones de plaguicidas se aplicaron sobre el material del nido, tomando como referencia las concentraciones utilizadas en cultivos de soja para cada compuesto (Tabla 3). El cálculo para la preparación de las soluciones se realizó considerando la superficie de la bandeja plástica como área a pulverizar (0,034 m^2) en un volumen fijo de 500 µL con agua potable declorada por cada tratamiento, simulando la posible llegada por deriva de las soluciones rociadas sobre los cultivos en un nido construido por la hembra de yacaré en un campo lindante, como se muestra en la Figura 5).

Tabla 3. Grupos experimentales de *Caiman latirostris* expuestos *in ovo* a GLI, 2,4-D, CAP, IMI y sus mezclas durante el desarrollo embrionario.

Tratamiento	Compuestos	Concentración % (L/100 L H_2O/ha)	N° de huevos por tratamiento
CN	Agua declorinada	--	18
GLI 1 %	Panzer Gold (60,8 %)	1 %	18
GLI 2 %		2 %	18
2,4-D 0, 06 %	Deferon Hexil® - Adama® (50 %)	0,06 %	18
2,4-D 0,12 %		0,12 %	18
CAP 0,015 %	Coragen® (20 %)	0,015 %	18
CAP 0,03 %		0,03 %	18
IMI 0,1 %	Imistar® (35 %)	0,1 %	18
IMI 0,2 %		0,2 %	18
M1	GLI + 2,4-D	1 % + 0,06 %	18
M2	CAP + IMI	0,015 % + 0,1 %	18
M3	GLI+ 2,4-D + CAP + IMI	1 % + 0,06 % + 0,015 % + 0,1 %	18

CN: Control negativo; GLI: Formulación de glifosato al 1 y 2 %; 2,4-D: Formulación de ácido 2,4-diclorofenoxiacético al 0,06 y 0,12 %; CAP: Formulación de clorantraniliprole al 0,015 y 0,03 %; IMI: Formulación de imidacloprid al 0,1 y 0,2 %; M1: Mezcla de las dos formulaciones a la mitad de las concentraciones de campo GLI + 2,4-D; M2: Mezcla de las dos formulaciones a la mitad de las concentraciones de campo CAP + IMI; M3: Mezcla de las cuatro formulaciones a la mitad de las concentraciones de campo GLI + 2,4-D + CAP + IMI.



Figura 10. Bandejas plásticas para incubación (23 x 17 cm = 0,034 m^2) con 6 huevos de *Caiman latirostris* (N de cada tratamiento = 18; N total = 216).

La exposición de los huevos a los contaminantes se realizó una única vez, en una etapa temprana del desarrollo embrionario (dentro de los 5 días posteriores a la postura por parte de la hembra), teniendo en cuenta que el período de máxima aplicación de plaguicidas en las áreas de distribución de la especie coincide con su temporada reproductiva (Figura 5; Poletta y col., 2009). La exposición se llevó a cabo mediante un pulverizador manual con el contaminante correspondiente (Figura 11).



Figura 11. Imagen de la aplicación de las soluciones de agroquímicos formulados por pulverización sobre el material vegetal que cubre los huevos de *Caiman latirostris*.

El ensayo de exposición *in ovo* antes descripto se llevó a cabo durante dos temporadas consecutivas: temporada 2021 (T2021) y temporada 2022 (T2022). Una semana antes de la fecha estimada de eclosión, los huevos fueron envueltos en tul para asegurar la individualización de los mismos en caso de nacimiento simultaneo de dos huevos de diferente nido en el mismo tratamiento. En caso de que los neonatos comenzaran a vocalizar dentro de los huevos, los mismos se retiraban de la incubadora y, si el nacimiento no ocurría espontáneamente durante las siguientes 24 h, se los asistía (Larriera y col., 2008).

En la T2021, sólo se analizaron las variables: éxito de eclosión, parámetros de crecimiento, parámetros asociados al estado metabólico de los lípidos y concentración de hormonas. Mientras que, en la T2022, se evaluaron todas estas variables y además aquellas determinadas en yema residual, hígado, gónada e intestino, que se describen más adelante.

Durante marzo del año 2022, mientras estábamos atendiendo los nacimientos de esa cohorte y a la espera de finalizar con esa actividad para realizar las mediciones correspondientes al año de vida de la cohorte 2021, los animales mantenidos en cautiverio bajo condiciones controladas en las instalaciones del CRIIF “La Esmeralda”, comenzaron a manifestar signos clínicos compatibles con un cuadro infeccioso. A pesar de la implementación inmediata de medidas de soporte intensivo y de la aplicación de tratamientos específicos de desinfección y manejo sanitario, la enfermedad progresó rápidamente, provocando la muerte de numerosos individuos en el transcurso de pocos días, casi la totalidad de la cohorte 2021 y varios de los neonatos recién nacidos que ya habían sido trasladados a las piletas de cría. Un grupo reducido de animales, que aún se encontraban en sector de nacedora a la espera de ser trasladados o que no habían eclosionado aun, no se vio afectado. Estos ejemplares fueron aislados a un sector separado del CRIIF, donde continuaron en crianza, permitiendo su seguimiento para mediciones de crecimiento y toma de muestras a largo plazo.

Como consecuencia de esto, el número de individuos sobrevivientes resultó insuficiente para obtener resultados estadísticamente analizables en los muestreos a largo plazo planificados para el ensayo de exposición *in ovo*. Por tal motivo, se decidió plantear un nuevo ensayo experimental de exposición sub-crónica *in vivo* en juveniles de seis meses

de edad, el cual se describe en la siguiente sección. Aunque este diseño difiere del original, su inclusión permitió generar información complementaria relevante dentro del marco temporal de la presente Tesis Doctoral, fortaleciendo la interpretación integral de los resultados obtenidos.

2.3.2. Exposición *in vivo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas en pichones de *C. latirostris*

Considerando que el nacimiento de las crías del yacaré overo en Santa Fe, Argentina, ocurre entre febrero y marzo, existe la posibilidad de que la exposición a los plaguicidas en áreas agrícolas no se limite únicamente al desarrollo embrionario, sino que también ocurra durante el período neonatal. En esta etapa, las crías presentan una alta vulnerabilidad, similar a la de los embriones, ya que permanecen mayormente en cuerpos de agua someros. Estos ambientes, cuando están próximos a zonas cultivadas, pueden estar contaminados y funcionar como sitios de depósito de residuos provenientes de las actividades agrícolas circundantes (López González y col., 2022).

2.3.2.1. Diseño experimental y tratamientos

Animales de seis meses nacidos de huevos recolectados en la Reserva Natural Manejada "El Fisco" (Departamento de San Cristóbal, Santa Fe, Argentina), provenientes de tres nidos diferentes, fueron distribuidos equitativamente en ocho GE (total N = 48, 16 animales de cada nido Tabla 4).

Los animales de cada GE fueron mantenidos en bateas de plásticos (55 x 35 cm, 27 cm de altura; área de 0,20 m²). Las bateas fueron ubicadas en un ambiente calefaccionado (30 ± 2 °C) y posicionados en un ángulo para proporcionar un 60 % de superficie con agua y un 40% de superficie seca, con un volumen fijo de 5 L (agua potable declorinada; Figura 12). Las exposiciones se realizaron mediante inmersión voluntaria, agregando los compuestos a los contenedores con agua.



Figura 12. Ensayo de exposición de crías de *Caiman latirostris* por inmersión voluntaria.

Las soluciones de plaguicidas fueron calculadas en función del área de la base de la batea (0,20 m^2) y luego diluidas en un volumen fijo de agua (5 L). Las concentraciones de plaguicidas utilizadas en este estudio se basaron en concentraciones de referencia para cultivos de soja para cada uno de los compuestos (Tabla 4). Se llevó adelante una exposición sub-crónica durante 60 días, con renovación de las soluciones de FA cada 48 h, luego de la alimentación (*ad libitum*) y limpieza.

Tabla 4. Grupos experimentales de *Caiman latirostris* expuestos *in vivo* a formulaciones de plaguicidas de GLI, 2,4-D, CAP, IMI y sus mezclas.

Tratamiento	Compuestos	Concentración % (L/100 L H_2O/ha)	N° de animales
CN	Agua declorinada	--	6
GLI 2 %	Panzer Gold ® (60,8 %)	2 %	6
2,4-D 0,12 %	Deferon Hexil® -Adama ® (50 %)	0,12 %	6
CAP 0,03 %	Coragen® (20 %)	0,03 %	6
IMI 0,2 %	Imistar® (35 %)	0,2 %	6
M1	GLI + 2,4-D	1 % + 0,06 %	6
M2	CAP + IMI	0,015 % + 0,1 %	6
M3	GLI+ 2,4-D + CAP + IMI	1 % + 0,06 % + 0,015 % + 0,1 %	6

CN: Control negativo; GLI: Formulación de glifosato al 2 %; 2,4-D: Formulación de ácido 2,4-diclorofenoxiacético al 0,12 %; CAP: Formulación de clorantraniliprole al 0,03 %; IMI: Formulación de imidacloprid al 0,2 %; M1: Mezcla de las dos formulaciones a la mitad de las concentraciones de campo GLI + 2,4-D; M2: Mezcla de las dos formulaciones a la mitad de las concentraciones de campo CAP + IMI; M3: Mezcla de las cuatro formulaciones a la mitad de las concentraciones de campo GLI + 2,4-D + CAP + IMI.

2.4. Etapa 2: Monitoreo de poblaciones silvestres

Para el monitoreo de poblaciones silvestres de *C. latirostris*, se procedió a la colecta de huevos de nidos presentes en áreas expuestas a plaguicidas próximos a cultivos agrícolas (Estancia "El Lucero", 29° 54' S; 50° 21'O, Dpto. San Cristóbal, Prov. de Santa Fe; Figura 13) y de áreas consideradas sin exposición directa (Reserva Natural Provincial Manejada "El Fisco", Dpto. San Cristóbal, Prov. de Santa Fe).

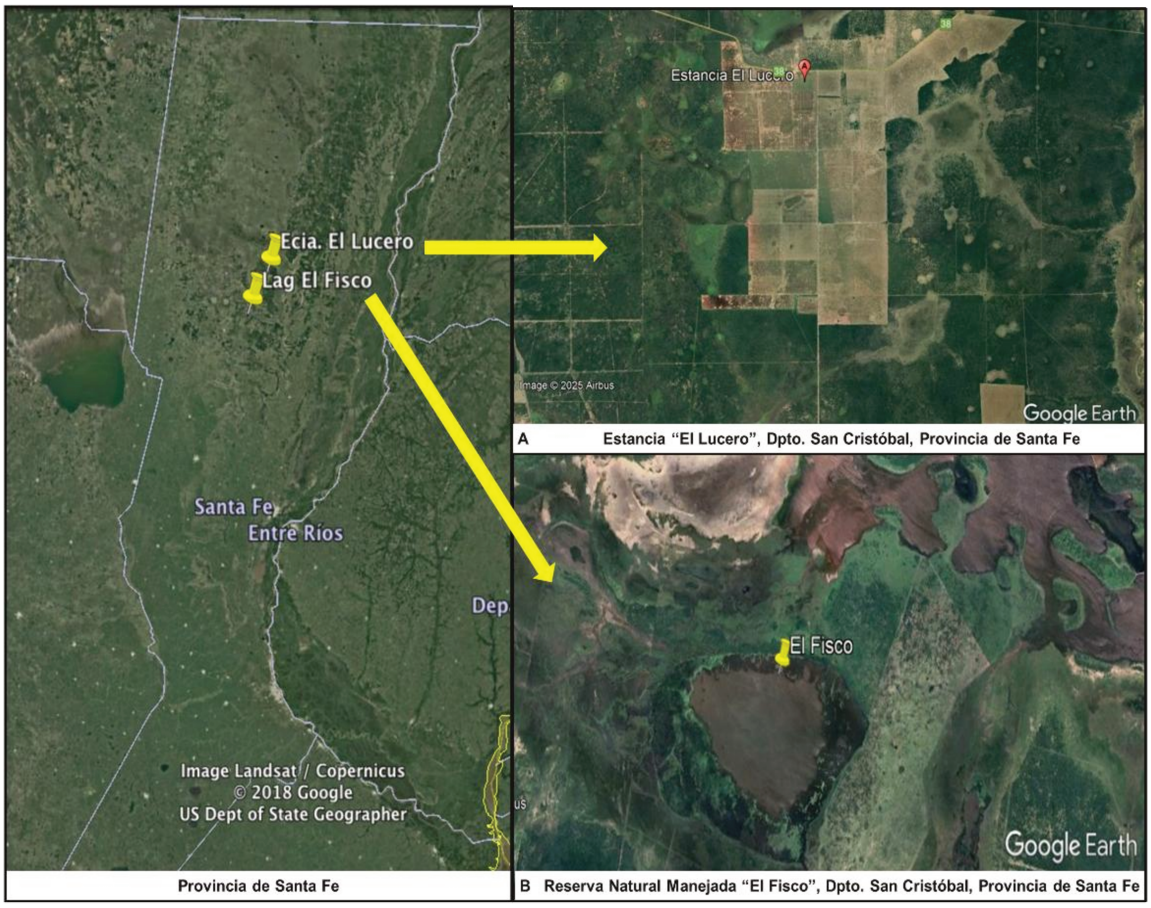

Figura 13. Imagen satelital de la Provincia de Santa Fe y las áreas de colección de huevos de *Caiman latirostris*. Recuadros: Estancia "El Lucero" (A); Laguna Fisco de la Reserva Natural Manejada "El Fisco" (B).

Imagen tomada de Google Earth el día 26 de octubre del año 2025.

Asimismo, se realizaron capturas de hembras adultas que se encontraran cuidando los respectivos nidos en las áreas naturales antes mencionadas mediante lazos de captura fijos y móviles. Luego de inmovilizar al animal, se realizó la extracción de sangre del seno la vena espinal (Myburgh y col., 2014) y se lo liberó inmediatamente en el mismo sitio, siguiendo metodologías apropiadas para la especie (Webb y Manolis, 2016). Las muestras de sangre y los huevos en ambas fueron transportados según procedimientos de rutina a las instalaciones del CRIIF, Santa Fe. Una vez allí, se procesaron las muestras de sangre obtenidas de hembras adultas, mientras que los huevos fueron acomodados en la sala de incubación como fue descripto previamente.

Cuando los neonatos comenzaron a vocalizar dentro de los huevos, se retiraron de la incubadora y, si el nacimiento no ocurría espontáneamente durante las siguientes 24 h, se les asistía (Larriera y col., 2008).

2.5. Variables registradas

2.5.1. Cuantificación de plaguicidas en el material de nido y en agua

La determinación y cuantificación de plaguicidas en el material de nido y en el agua utilizada para las exposiciones *in ovo* e *in vivo*, respectivamente, se llevó a cabo mediante servicios analíticos tercerizados en el marco del Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos (PRINARC) de la Facultad de Ingeniería Química (UNL). La determinación de GLI, 2,4-D, CAP e IMI se realizó mediante extracción en fase sólida (SPE) y cromatografía líquida de ultra alta performance acoplada a espectrometría de masas en tándem con triple cuadrupolo (UHPLC-MS/MS). Las muestras para la determinación de GLI, AMPA fueron previamente derivatizadas con FMOC-Cl. El límite de detección fue de 0,60 µg/L para GLI y de 0,10 µg/L para 2,4-D, CAP e IMI.

2.5.2. Éxito de eclosión y malformaciones externas

Estas variables fueron analizadas en el ensayo de exposición *in ovo* de Etapa 1 y en el monitoreo de poblaciones silvestres de la Etapa 2. Se registró el éxito de eclosión de cada GE y nido de áreas naturales como cantidad de pichones nacidos del total de huevos viables (identificados por ovoscopia) ingresados a la incubadora. Por otra parte, se observó si existía alguna malformación externa en los pichones y, en caso de existir, se registró el tipo de malformación.

2.5.3. Tamaño corporal y crecimiento a corto y largo plazo (OE5)

El peso y la longitud de los animales se analizó en los ensayos experimentales y en los animales nacidos de nidos provenientes de áreas naturales. En el caso de los neonatos, inmediatamente luego del nacimiento los mismos fueron medidos en longitud total (LT) y longitud hocico-cloaca (LHC) con cinta métrica de 0,1 cm de precisión y se pesaron con balanza (OHAUS® *Compact scale* CS200) de 0,1 gr de precisión. El índice de

condición corporal (CC) se calculó como la relación entre el peso y la LHC: CC (g/cm) = peso (g) / LHC (cm), siguiendo los criterios propuestos por Moleón y col. (2022).

Para la identificación de cada individuo, cada ejemplar se identificó por una combinación única de cortes de verticilos dobles y simples que indican el nido y el individuo (Larriera y col., 2008; Figura 14).

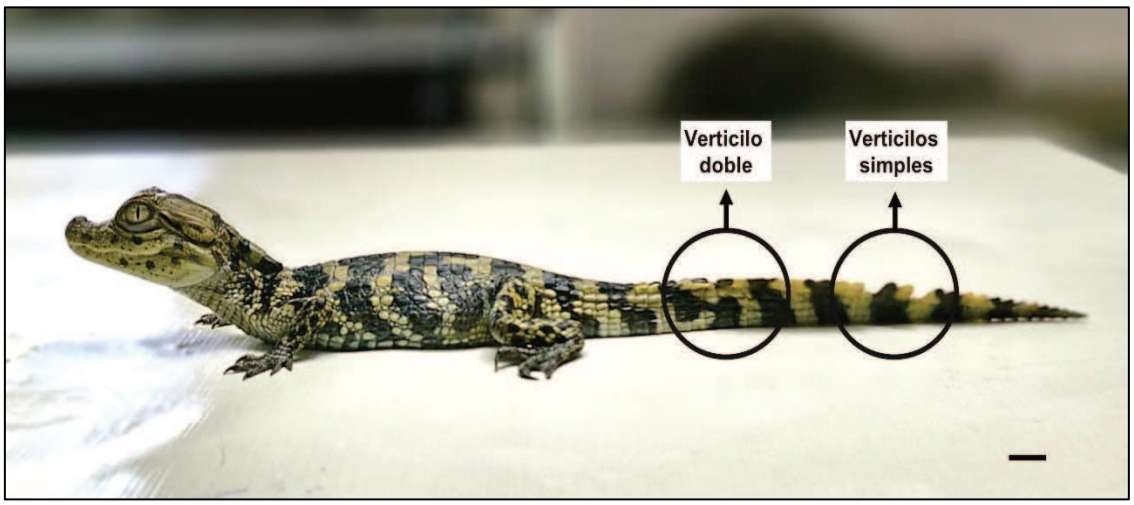

Figura 14. Ejemplar de *Caiman latirostris* luego de su individualización mediante corte de verticilos caudales. Barra = 1 cm.

Posteriormente, los neonatos fueron trasladados a las piletas de cría del CRIIF, en las cuales se mantuvieron en condiciones controladas a temperatura constante de aproximadamente 29 ºC y se alimentaron *ad libitum* con una mezcla húmeda de 60 % de cabeza de pollo molida y 40 % de balanceado para reptiles (Larriera y col., 2008). Las mediciones se repitieron luego de 1 año después de la exposición.

En el ensayo de exposición *in vivo* de crías de 6 meses, los animales fueron medidos (LT y LHC) y pesados al inicio y al final del experimento para evaluar el crecimiento (tamaño final - tamaño inicial) de los mismos durante el ensayo experimental. Con las medidas morfométricas tomadas al inicio y al final del experimento, se realizó el índice de diferencia en la CC (Δ CC g/cm): Δ peso (peso final – peso inicial) y Δ LHC (LHC final

– LHC inicial). El valor de Δ CC se obtuvo como Δ peso / Δ LHC como fue descripto previamente.

2.5.4. Determinación del perfil lipídico basal en yema de huevo de *C. latirostris* (OE1)

Se realizó la determinación del perfil lipídico basal de 3 huevos en diferentes estadios del desarrollo embrionario provenientes de 3 nidos diferentes colectados en la Reserva Natural Provincial Manejada "El Fisco". Se procedió a la apertura de la cáscara del huevo y a la posterior eutanasia de los embriones mediante dislocación cervical (Manolis y Webb, 2016). La extracción de las yemas se realizó mediante una disección longitudinal ventral de los embriones, y una vez extraídas, las yemas fueron homogeneizadas, alicuotadas y conservadas en freezer (-20 °C) hasta el momento de su procesamiento.

Se llevó a cabo la determinación del perfil de ácidos grasos saturados (AGS), monosaturados (AGMI), poliinsaturados (AGPI), concentración de colesterol (CLy) y tocoferoles (TCy). La determinación de estos metabolitos se realizó mediante cromatografía planar instrumental (HPTLC). El análisis fue realizado por el Laboratorio de Bromatología y Nutrición (FBCB-UNL), garantizando estándares de calidad mediante el uso de controles y estándares certificados.

2.5.5. Extracción y separación de muestras de sangre

Inmediatamente después de la eclosión, se extrajo 1 mL de sangre periférica de la vena espinal de cada animal utilizando una jeringa heparinizada y una aguja de 25G x 5/8" para el caso de los neonatos, mientras que, para las hembras reproductoras, se emplearon jeringas 21G x 1 1/2" (Myburgh y col., 2014).

Cada muestra de sangre extraída fue fraccionada en dos partes. Una alícuota fue procesada para la determinación de los parámetros bioquímicos, enzimáticos y daño oxidativo. Para ello, cada muestra se centrifugó y se separó el plasma del paquete globular.

La segunda alícuota se destinó a la extracción de ARN para el análisis de expresión de genes asociados al metabolismo lipídico.

2.5.6. Determinación del perfil lipídico e indicadores de actividad hepática en plasma (OE2)

Estos parámetros se determinaron para todos los ensayos antes descriptos de la Etapa 1 y para los nidos y hembras provenientes de la Etapa 2.

2.5.6.1. Determinación plasmática de metabolitos lipídicos

Se procedió a la separación del plasma de la sangre entera mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 min. Se realizaron las siguientes determinaciones: triglicéridos (TG), colesterol (CL), proteínas totales (PT), glutamato-piruvato-transaminasa (GPT) y transaminasa glutámico-oxalacética (GOT). Todas las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro (Jenwey®, Geneva) usando kits comerciales específicos para cada parámetro (Wiener Lab®) y aplicando la longitud de onda adecuada para cada medición según protocolos correspondientes.

Para el ensayo de exposición *in vivo*, los parámetros bioquímicos se determinaron mediante dos extracciones de sangre por individuo, realizadas al inicio y al final del periodo de exposición sub-crónica de 60 días. La primera extracción se realizó a los 6 meses de edad (4/08/2023), previo al inicio del tratamiento. La segunda extracción se efectuó al concluir el ensayo (03/10/2023), teniendo en ese momento los animales 8 meses de edad. Ambas extracciones se realizaron para el total de los animales en el mismo día y en un rango de 2 h desde el primer al último ejemplar, separándose el plasma inmediatamente luego de la extracción. Las determinaciones realizadas fueron: TG, CL, PT, GPT, GOT, y albúmina (ALB), GLUC, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Estos parámetros se analizaron con el autoanalizador semiautomático CM 250 (Wiener Lab®) y kits comerciales específicos para cada parámetro bioquímico (Wiener Lab®) en el Centro de Medicina Comparada (IciVet-CONICET/UNL).

2.5.6.2. Determinación molecular de genes asociados al metabolismo lipídico

2.5.6.2.1. Extracción de ARN.

De cada muestra de sangre entera se tomaron 250-300 µL fue homogeneizada con 1200 µL de TRIzol® LS Reagent (1:4, Ambion, Life Technologies) e inmediatamente almacenadas en nitrógeno líquido y luego en ultrafreezer (-80 °C) para su posterior procesamiento (López González y col., 2021b).

2.5.6.2.2. Identificación de productos de PCR convencional

Dado que hasta el momento no existían registros de estudios sobre los genes de interés en la especie estudiada, se decidió corroborar previo al análisis de sus niveles de expresión, la presencia/ausencia de los genes *g-6-pdh, fas, me, lpl, pparα*, *pparγ* y *srebp-1c* en sangre, hígado, bazo, gónada e intestino a través de una PCR convencional (Chacón y col., 2025). Para este paso inicial, se utilizaron muestras de tejidos de un banco realizado por nuestro laboratorio a partir de juveniles de dos años de edad nacidos de nidos colectados en la Reserva Natural Provincial Manejada "El Fisco", almacenadas a -80 °C. Se procesaron 3 muestras de cada tejido de 3 ejemplares diferentes.

La extracción de ARN se realizó a partir de muestras de tejido (75-100 mg) y de sangre entera (1:4) utilizando TRIzol® LS Reagent (Ambion, Life Technologies). Se evaluó la pureza e integridad del material obtenido mediante el lector multimodo CLARIOstar® (BGM LABTECH), mientras que la calidad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, 10,000x). Para prevenir la contaminación con ADN genómico, las muestras de ARN (100 ng/µL) se trataron con DNasa libre de RNasa (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. El tratamiento con DNasa se realizó utilizando 1 µg de ARN en un volumen final de 10 µL y, posteriormente, se procedió a la retrotranscripción del ARN a su ADN complementario (ADNc; MMLV Invitrogen). El ADNc obtenido tuvo un volumen final de 20 µL y una concentración de 50 ng/µL.

Los cebadores se diseñaron a través de la página de *Integrated DNA Technologies* (IDT - https://www.idtdna.com/pages ; Tabla 5), utilizando el genoma de la especie,

recientemente secuenciado mediante NGS (Next Generation Sequencing) y disponible en forma restringida en CoGe: Comparative genomics (https://genomevolution.org/coge/), así como el genoma de otras especies de Alligatóridos disponibles en forma pública en *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - https://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabla 5. Información de genes estudiados y cebadores utilizados en PCR convencional.

Gen	Forward (F) y Reverse (R) sequence (5′–3′)	Amplicón (pb)	T*m* (°C)	T*a* (°C)
	Gen de referencia			
β-actina	F: TCACGAGACCACTTTCAACTC R: AGGGCTGTGATTTCCTTCTG	138	62	57
	Genes de interés			
g-6-pdh	F: TACCGCATCGACCACTATCT R: CTTCAGCACCTTCACCTTCTC	291	62	57
fas	F: CTGTCGTGGGAGGAATGTAAG R: GTAGACCGAAGCAGATGAAGAG	717	62	57
me	F: CTACTGCCACCTTGCTTTCT R: CATCATAGGCTTGACCTCTCAC	541	62	57
lpl	F: CTAGAGCCCAGCAACACTATC R: GTCCACCATTCTGTCCAACT	922	62	57
pparα	F: AGGGAGCTTTGTCCACTTAC R: CAACGAGCATCCCATCTTTATTC	982	62	58
pparγ	F: GACCAGCTAAACCCTGAATCT R: GCCAGGTCACTGTCATCTAAT	551	61	58
srebp-1c	F: ACGCAGGTCCAGAATGTTT R: CAGGAAGCGGATGTAGTCAAT	504	62	58

T*m*: Temperatura de melting; T*a*: Temperatura experimental de annealing.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 µL que contenía 5 µL de ADNc y 16 µL de una mezcla de reacción: 0,3 µM de cada uno de los primers específicos para el gen (Tabla 5), 0,25 mM de dNTPs y el buffer suministrado con la Phire Hot Start II ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific®). Las condiciones de ciclado de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98 °C durante 3 min, seguidas de 40 ciclos de: 98 °C durante 5 segundos (s), annealing (Tabla 5) durante 20 s, 72 °C durante 20 s y finalmente 72 °C durante 10 min. El gen *β-actina* se utilizó como referencia interna para normalizar la expresión de los genes objetivo (Odetti y col., 2023; Chacón y col., 2025).

Para identificar los productos amplificados, se analizaron 4 µL de cada producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, y el tamaño de los mismos se estimó en relación con el marcador molecular de ADN (100 pb; Thermo Fisher Scientific®). Los productos de PCR fueron visualizados utilizando un transiluminador UV (Safe Imager™, Invitrogen) y las imágenes fueron registradas con una cámara de 108 MP (Chacón y col., 2025).

I. Semicuantificación relativa de genes objetivo

Para evaluar la expresión relativa de cada gen identificado en los diferentes tejidos, se realizó una semicuantificación. La densidad de las bandas de PCR se midió utilizando el software ImageJ, analizando el área bajo el pico para cada tejido. La semicuantificación relativa se presenta como la relación entre la señal del gen objetivo sobre la señal de *β-actina*.

II. Secuenciación, alineación múltiple y análisis bioinformático

Los amplicones obtenidos en las reacciones de PCR con cDNA de hígado fueron secuenciados por Macrogen Inc. Las secuencias obtenidas fueron analizadas a través de Genbank utilizando BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para confirmar la identificación de los genes objetivo. Tras la confirmación, las secuencias nucleotídicas fueron depositadas en la base de datos NCBI BioProject bajo el número de acceso PRJNA1214741. En el mismo servidor, se seleccionaron secuencias de cinco saurópsidos diferentes para realizar un alineamiento múltiple de cada una de las secuencias

nucleotídicas obtenidas y un árbol filogenético utilizando la región conservada de cada gen objetivo mediante el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 6.0 (Tamura y col., 2013; Datos suplementarios). Se calculó un árbol consensuado para resumir las características comunes de los árboles de entrada utilizando la función de consenso del paquete "*ape*" de R (Paradis y col., 2019). El árbol consensuado representa clados respaldados por al menos el 50% de los árboles de entrada. La especie fuera de grupo utilizada para el enraizamiento fue *Gallus gallus*, utilizando la función "*root*" del paquete "*ape*" (Paradis y col., 2019).

Las secuencias nucleotídicas fueron analizadas en la base de datos Conserved Domain Database (CDD) de NCBI (Wang y col., 2023) para identificar dominios conservados o regiones funcionales presentes en la secuencia, aceptando solo resultados con un valor e inferior a 0,1 y aplicando los parámetros predeterminados.

2.5.6.2.3. qPCR Real Time

La metodología de extracción de ARN y su posterior retrotranscripción a ADNc fueron descriptas previamente.

Esta determinación, se realizó para las muestras obtenidas de los dos ensayos *in ovo* de la Etapa 1 (T2021 y T2022) y de los nidos y hembras provenientes de la Etapa 2.

Una vez confirmada la identidad de cada gen objetivo, se procedió al diseño de cebadores específicos para qPCR Real Time en las regiones más conservadas según la secuencia nucleotídica obtenida por Macrogen Inc. El diseño de los cebadores se realizó utilizando el programa IDT previamente mencionado. En la Tabla 6 se describen las características de los cebadores utilizados.

Tabla 6. Información de genes estudiados y cebadores utilizados en qPCR Real Time

Gen	Forward (F) y Reverse (R) sequence (5′–3′)	Amplicón (pb)	T*m* (°C)	T*a* (°C)
	Gen de referencia			
β-actina	F: TCACGAGACCACTTTCAACTC R: AGGGCTGTGATTTCCTTCTG	138	62	57
	Genes de interés			
g-6-pdh	F: ACAATGTGGCCTGTGTCAT R: ATCTGCAGCAGGTGGTTC	118	62	60
fas	F: TTCCTAGCCACCCTGAAGAA R: GCAAGCGCCTCCATGAAATA	92	63	60
me	F: GGACCTTGGCAGTTATGGAA R: ATCCAGCATTACAGGCAGAC	103	62	60
lpl	F: CACAACGGATGAGAGAGAGAAC R: CACCAATATCCACCTCTGTGTAA	98	62	60
pparα	F: GAATTCAGAACAAGGAAGCAGAAG R: GGTTTGAGAAGCCAGGGATAG	114	62	60
pparγ	F: TGGAGGCAGTGCAAGAAAT R: GACACCATACTTCAGCAGAGTT	98	62	60
srebp-1c	F: CTCCTCCATCAACGACAAGATT R: CAGGAAGCGGATGTAGTCAAT	504	62	60

T*m*: Temperatura de melting; T*a*: Temperatura experimental de annealing.

La expresión de estos genes se analizó mediante la utilización del equipo para qPCR QS3 (Thermo Fisher Scientific), detectándose la cantidad de producto amplificado en cada ciclo mediante el monitoreo basado en la emisión de fluorescencia, utilizando SYBR® Green I (Invitrogen) como fluoróforo. La cuantificación se realizó con el software QuantStudio™ v1.5.2, y se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para determinar el nivel de expresión relativo de los genes elegidos como biomarcadores respecto al control endógeno *b-actina* (Livak y Schmittgen, 2001).

Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 µL que contenía 4 µL de ADNc y 16 µL de una mezcla de reacción: 0,3 µM de cada uno de los primers específicos para el gen (Tabla 6), 0,25 mM de dNTP, 1 µL de SYBR Green I, 4 µL de buffer Phire 5X y 0,05 µL y enzima Phire Hot Start II ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific®).

Las condiciones de ciclado de la qPCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98 °C durante 3 min, 40 ciclos de 98 °C durante 5 s, annealing (Tabla 5) durante 20 s, extensión y lectura de fluorescencia a 72 °C durante 20 s. Cada muestra se analizó por duplicado y se incluyeron controles de plantilla de ADN negativos en todos los ensayos de PCR. La pureza del producto se demostró mediante curvas de disociación.

2.5.7. Determinación de eicosanoides plasmáticos

Un grupo particular de lípidos son los eicosanoides, cuyo principal precursor es el ácido araquidónico, un ácido graso poliinsaturado (Hanna y Hafez, 2018). Los eicosanoides son mensajeros lipídicos bioactivos que modulan diversos procesos fisiológicos y patológicos; median la inflamación y la respuesta del sistema inmune, por lo que la mayoría de los tejidos, si no todos, responden a ellos (Loomba y col., 2015). Dado que los eicosanoides y sus precursores son ligandos fisiológicos de los *ppar*, y que estos, al mismo tiempo, pueden ser no-targets específicos de los AF, se realizó una lipidómica dirigida a eicosanoides (eicosanómica) mediante en cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Este análisis se realizó únicamente para los GE: CN, GLI 2 %, 2,4-D 0,12 % y M1 (GLI 1 % + 2,4-D 0,06 %) del ensayo *in vivo*; en colaboración con el Laboratorio del Dr. Bowden en el Departamento de Ciencias Fisiológicas / Centro de Toxicología Humana y Ambiental de la Universidad de Florida (Gainesville, Florida, Estados Unidos). La selección de estos GE se debió a la imposibilidad de transportar las muestras de todos los GE en condiciones de temperatura a -30 °C hacia la Universidad de Florida. Las muestras fueron acompañadas por los permisos de importación y exportación requeridos.

Las soluciones madre primarias de los 9 analitos y 8 estándares internos deuterados (IS, del inglés *internal standards*) se prepararon en metanol (MeOH). Las soluciones de trabajo de los 8 IS deuterados (dIS) se prepararon a una concentración final de 0,2 µL/mL en MeOH. Los estándares de calibración se prepararon frescos diluyendo la solución estándar de trabajo a concentraciones finales de 0,08, 0,065, 0,05, 0,037, 0,028, 0,02, 0,015, 0,01, 0,008, 0,004, 0,0005, 0,00033 ng/mL. Para la preparación de las muestras de control de calidad (QC; del inglés *quality control*), se combinaron 5 muestras de *Alligator mississippiensis* que estaban almacenadas en el laboratorio.

Las muestras de plasma (300 µL) se diluyeron con 1 mL de MeOH, seguido de la adición de 10 µL de IS. La mezcla se homogeneizó brevemente y se centrifugó a 20,000 × g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se transfirió a viales y se diluyó con 3 mL de ácido fórmico al 0,032 % en agua. La extracción SPE se realizó utilizando cartuchos Oasis® HLB (1 mL, 10 mg). Previo a la extracción, los cartuchos SPE se preacondicionaron para preparar la fase sólida y optimizar la retención de los compuestos de interés. Este paso consistió en el paso de 150 µL de MeOH y luego, 1 mL de ácido fórmico al 0,032 % en agua. Durante el proceso, se aplicó vacío controlado para facilitar el flujo de los solventes, abriéndolo brevemente entre etapas para evitar que el cartucho se secara. Las muestras se cargaron en los cartuchos bajo vacío, se lavaron de manera secuencial con 1 mL de ácido fórmico al 0,032% en agua, seguido de 1 mL de etanol al 15% en ácido fórmico al 0,032%. La elución se realizó con 2000 µL de MeOH. El eluido se evaporó utilizando un evaporador al vacío y se resuspendió en 50 µL de MeOH.

Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (UHPLC-MS/MS), equipado con una fuente de ionización por electrospray (HESI II). La separación cromatográfica se logró utilizando una columna de fase reversa (columna Phenomenex Kinetex C18; 100 x 2,1 mm, tamaño de partícula de 2,6 µm, sin capuchón final), con una velocidad de flujo de 0,4 mL/min y el autosampler se mantuvo a 4 °C. Para las fases móviles A y B, se utilizaron ácido fórmico al 0,12 % en agua y acetonitrilo, respectivamente. La temperatura de la columna se estableció a 40 °C. El espectrómetro de masas se operó en modo de monitoreo de reacciones seleccionadas (SRM). Para el nebulizador y el gas de secado y para la disociación inducida por colisiones, se utilizaron gases de nitrógeno y argón, respectivamente.

El procesamiento de los datos se realizó utilizando el software Xcalibur. Se utilizó Quan Browser para cuantificar todos los eicosanoides identificados. Para la validación analítica, se realizó una curva estándar. Posteriormente, se utilizó un análisis de regresión lineal de las razones de respuesta (área del pico del analito / área del pico del IS) obtenidas de la curva de calibración para calcular las cantidades correspondientes de eicosanoides en las muestras desconocidas. Además, se evaluó la reproducibilidad del ensayo de determinación de eicosanoides mediante el coeficiente de variación (CV %) de los QC.

2.5.8. Determinación de corticosterona plasmática

Esta variable se determinó únicamente en los neonatos expuestos a formulaciones de agroquímicos y mezclas durante el desarrollo embrionario en la T2022.

La cuantificación de corticosterona en plasma de *Caiman latirostris* se llevó a cabo mediante cromatografía liquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS). Se utilizaron los siguientes estándares: estándar analítico de corticosterona (VETRANAL; pureza 99,2 %, Sigma– Aldrich, N° de producto: 46148; Batch: BCCC8243), y cortisol como estándar interno (pureza 100 %, Sigma- Aldrich, N° de producto: H4001, Batch: SLBR8225V).

El análisis se realizó en un sistema de cromatografía líquida Shimadzu UFLC XR acoplado a un espectrómetro de masas AB Sciex 3200 Q Trap, equipado con fuente de ionización por electrospray. Previo al análisis, las muestras de plasma fueron sometidas a una extracción liquido – liquido con metil terbutil éter (MTBE). Posteriormente, el extracto se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se reconstituyó en solvente compatible con la fase móvil para su inyección directa en el sistema LC-MS/MS.

2.5.9. Peroxidación lipídica (OE3, 6 y 7)

Esta variable se evaluó en los dos ensayos de la Etapa1 y de la Etapa 2, para los neonatos provenientes de áreas no expuestas y expuestas, así como de sus respectivas madres.

Los glóbulos rojos separados luego de la centrifugación y extracción del plasma fueron lavados 2 veces con solución fisiológica, diluidos 1:5 con agua bidestilada fría y luego mantenidos a -20 ºC hasta su análisis. Se utilizó el método de TBARS (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico) adaptado para su aplicación en *C. latirostris* (Poletta y col., 2016) que mide la intensidad del color producido durante la reacción del ácido tiobarbitúrico con malondialdehido, principal producto de la peroxidación lipídica. La absorbancia de la muestra se determinó por espectrofotómetro (Jenwey®, Geneva) a 535 nm, la concentración de TBARS se calculó usando el coeficiente de extinción: 1.56 x 105 M-1 cm-1 y referenciada a la cantidad de proteínas de la muestra. Se utilizó el Kit Proti U/LCR (Wiener Lab®) para la determinación de PT a partir del mismo hemolizado.

2.5.10. Extracción de yema residual e histología de hígado, gónadas e intestino (OE4 y 6)

Estas variables se evaluaron en los neonatos de la T2022 de la Etapa 1 y aquellos provenientes de áreas sin exposición y ambientalmente expuestas de la Etapa 2.

Luego de la exposición a FA, 3 animales por GE y 3 animales de cada área natural evaluada fueron eutanasiados mediante el método de dislocación cervical (Manolis y Webb, 2016). Se extrajeron diferentes tejidos utilizando instrumental quirúrgico y en condiciones de asepsia: yema residual, gónadas (hembra y macho), hígado e intestino.

2.5.10.1. Determinación del perfil de ácidos grasos, tocoferoles y colesterol de yema residual de *C. latirostris*

La extracción de la yema residual se realizó mediante la misma metodología descripta en OE1. La determinación de estos marcadores se realizó en el Laboratorio de Bromatología y Nutrición (FBCB-UNL).

2.5.10.2. Histología de hígado, gónadas e intestino

Los tejidos se colocaron en cajas plásticas de histología, lavados en buffer fosfato salino (PBS), y fijados en formol bufferado al 10 % durante 8 h a temperatura ambiente, respetando la proporción recomendada de fijador/muestra (20:1) con el fin de asegurar una adecuada preservación morfológica. Luego de la fijación, se realizaron dos lavados de 10 min cada uno y las muestras se conservaron en solución de etanol al 70 % hasta su procesamiento. La inclusión de las muestras en parafina se realizó según el protocolo descrito por Junqueira (1983), que consiste en la deshidratación progresiva en soluciones de etanol de concentración creciente, clarificación mediante sucesivas inmersiones por xilol y posterior inclusión en parafina. Para la identificación de las estructuras celulares y sus componentes asociados se empleó bibliografía de histología general (Mescher, 2024) y específica de crocodílidos (van Wilpe, 2012; Borges y col., 2018), la cual permitió reconocer y describir todas las estructuras observadas en el hígado y el intestino.

Se realizaron cortes histológicos de 5 µm de espesor en micrótomo que se montaron en portaobjetos previamente tratados con adhesivo tisular (3-aminopropil trietoxysilano,

Sigma-USA) y se secaron en estufa a 37 ºC durante 24 h. Se utilizó la coloración de hematoxilina-eosina (H-E) siguiendo el método de Junqueira (1983). En gónadas femeninas, los estadios ovocitarios, la morfología general, las estructuras celulares y los componentes asociados se identificaron según los criterios propuestos por Uribe y Guillette (2000) e Iungman (2011) para especies de cocodrílidos. En gónadas de machos, la identificación de las estructuras celulares y la morfología general se realizó según los autores Iungman (2011) y Rey y col. (2009). Todos los cortes histológicos fueron visualizados bajo microscopio óptico convencional Olympus CX31; Nikon Eclipse E200.

I. Evaluación de los cambios en la histoarquitectura y porcentaje de lípidos en tejido hepático de neonatos de *C. latirostris*

La evaluación histopatológica del hígado se realizó mediante un sistema semicuantitativo de puntaje que permite transformar observaciones morfológicas cualitativas en información sistemática y comparable (Gibson-Corley y col., 2013; Barboza y col., 2023). En cocodrilianos, al igual que en otros reptiles silvestres, aún no existen valores de referencia consensuados que delimiten con claridad los cambios fisiológicos de las alteraciones patológicas en el hígado (Barboza y col., 2023). Por ello, se elaboró un sistema de gradación estandarizado para abordar esta evaluación, realizado en función de las lesiones observadas en las muestras y siguiendo los criterios propuestos por Gibson-Corley y col. (2013). El puntaje establecido, considera la severidad y distribución de la degeneración vacuolar hepatocelular (DV). La severidad se determinó en una escala de 0 a 3, donde 0 = ausencia de lesión, 1 = lesión leve, 2 = lesión moderada y 3 = lesión severa. La distribución se describió como Focal (F), Focal Extensa (FE), Multifocal (M) o Difusa (D), de acuerdo con la extensión del compromiso tisular observado en el parénquima hepático.

Se evaluó la vacuolización lipídica de hepatocitos como marcador de carga grasa hepática en neonatos de *C. latirostris*. Esta lesión "*background*" es frecuente en reptiles por sus características metabólicas y nutricionales (Starck y col., 2007; Barboza y col., 2023). Se tomaron imágenes microscópicas digitalizadas con una cámara en color Nikon DS-Fi2 montada en un microscopio óptico convencional Olympus CX31; Nikon Eclipse E200. La resolución de las imágenes fue de 1600 x 1200 píxeles. El análisis de las imágenes obtenidas se realizó utilizando el software Image Pro-Plus 3.0.1 (Media Cybernetics;

Rockville, MD, USA). Se capturaron 10 imágenes por muestra, seleccionadas al azar, con una magnificación de 40X bajo el microscopio óptico. En cada imagen se definió un umbral para identificar las vacuolas lipídicas (color blanco) y se calculó el porcentaje de área grasa sobre el área total de hepatocitos. Finalmente, estos valores se sometieron a análisis estadístico para comparar los distintos tratamientos.

II.Caracterización histológica de ovarios en neonatos de *C. latirostris*

A continuación, se representa gráficamente la disposición de las gónadas en los neonatos de *C. latirostris,* su morfología externa y el tipo del corte realizado para poder realizar el taco con parafina y finalmente, visualizarlo bajo microscopio óptico (Figura 15).

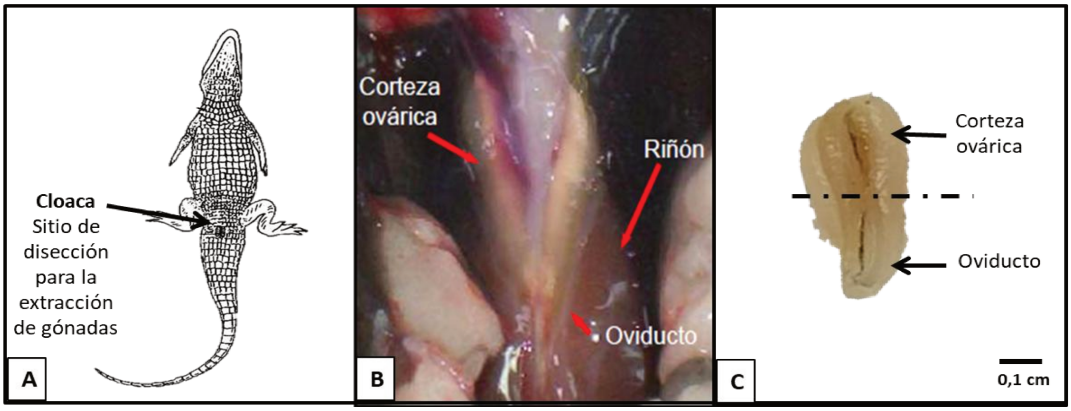

Figura 15. Caracterización histológica de ovarios en neonatos de *Caiman latirostris.*

A: Disposición ventral del neonato de *Caiman latirostris* al momento de la disección y localización de la cloaca para la extracción de las gónadas. B: Disposición de las gónadas en el momento de la disección. C: Gónada luego de su fijación y previa su disposición en el taco de parafina. Note: los cortes son transversales (línea negra punteada).

Las estructuras gonadales en neonatos de yacaré overo son muy pequeñas (1 cm), y se encuentran unidas un complejo gónada-adrenal-mesonefro (GAM), por lo que se diseccionan las gónadas como parte del complejo GAM (Iungman y col., 2011).

Se realizaron cortes histológicos transversales de las gónadas, los cuales permitieron identificar las estructuras sexuales luego de la coloración con H-E. Las características histológicas observadas en las hembras incluyeron la presencia del oviducto, el desarrollo de la corteza ovárica y atrofia de la médula (Figura 16-A); mientras que, en los machos,

se identificaron túbulos seminíferos bien definidos en la médula, acompañados de atrofia de la corteza (Figura 16-B).

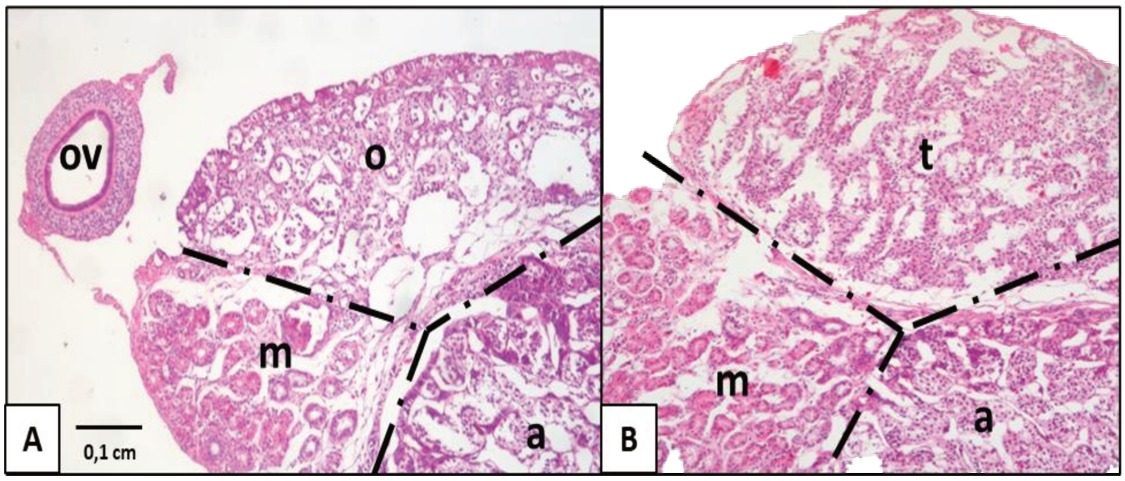

Figura 16. Cortes transversales del complejo gónada-adrenal-mesonefro de hembras (A) y machos (B) de neonatos de *Caiman latirostris.*

Líneas punteadas indican la separación de ovario (o) o testículo (t) del mesonefro (m) y glándula adrenal (a). Note: el oviducto (ov) en la figura A. H-E; 10X.

Para evaluar histológicamente las gónadas de hembras al momento de la eclosión, se elaboró un listado de criterios orientados a identificar posibles daños tisulares inducidos por la exposición a xenobióticos (Tabla 7). Dicho listado fue diseñado a partir de la información bibliográfica proporcionada por Stoker y col. (2003), Moore y col. (2008) e Iungman (2011).

A continuación, se detallan las observaciones registradas:

Tabla 7. Criterios histológicos para la identificación de posibles alteraciones tisulares en la gónada femenina de *Caiman latirostris* asociadas a la exposición a xenobióticos.

Alteración	Descripción
Atrofia cortical y desorganización de la arquitectura ovárica	Disminución del espesor de la corteza, pérdida o reducción de nidos de oogonias, disposición irregular del parénquima.
Difusión del límite córtex-médula	Se pierde la distinción entre estas regiones durante la reorganización de la membrana basal y las células tecales.
Lagunas medulares anómalas	Mayor espacio intersticial en la médula ovárica, formación de lagunas amplias.
Vacuolización citoplasmática de células germinales y/o epiteliales	Presencia de vacuolas claras en oocitos, células epiteliales o células del estroma.
Alteración o discontinuidad del epitelio cortical	Fragmentación, adelgazamiento o interrupciones en el epitelio superficial.
Infiltrado inflamatorio focal o intersticial	Focos de células mononucleares o leucocitos en médula o alrededor de estructuras oocíticas.

En etapas tempranas del desarrollo (neonatal y postnatal temprana), el oviducto es una estructura delgada tiene una apariencia macroscópica tubular (Figura 15-B y C). Para la caracterización y análisis del oviducto, se delinearon manualmente los límites basal y apical del epitelio del oviducto en todo el recorrido comprendido en la imagen (Figura 17). La altura del epitelio se calculó automáticamente como el promedio de la longitud de los segmentos perpendiculares a las dos líneas trazadas en cada punto del recorrido.

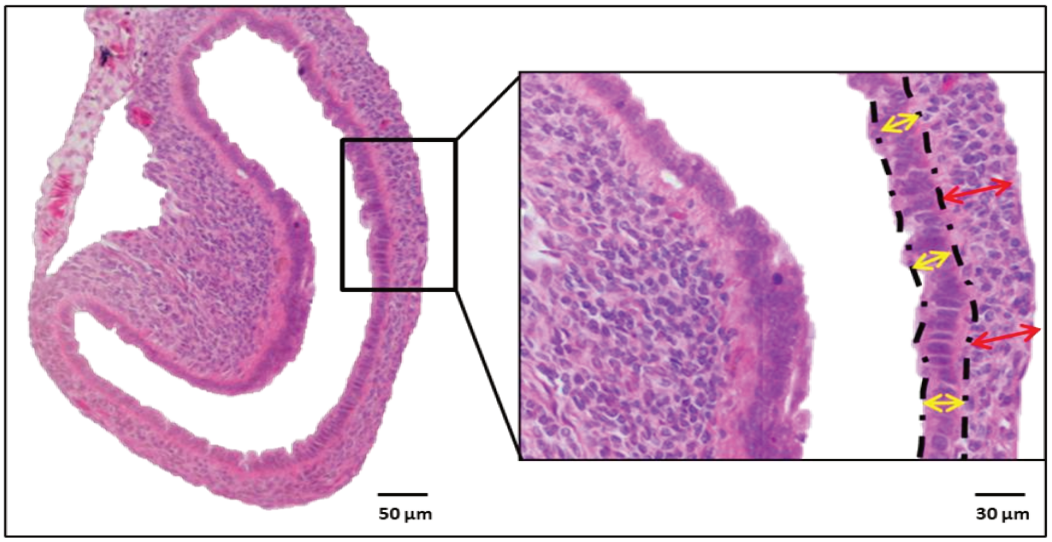

Figura 17. Micrografía del oviducto de neonatos de *Caiman latirostris.*

Epitelio luminal (flechas amarillas). Delimitación de los bordes apical y basal del epitelio luminal (líneas punteadas negras). Estroma subepitelial (flechas rojas) H-E; 40 y 60X.

Asimismo, con el objetivo de describir comparativamente las características histológicas de esta región entre los distintos tratamientos, y evaluar si dichas características responden a un patrón compatible con daño inducido por xenobióticos, se aplicó el criterio propuesto por Tavalieri y col. (2024; Figura 18), previamente adaptado para la especie en estudio.

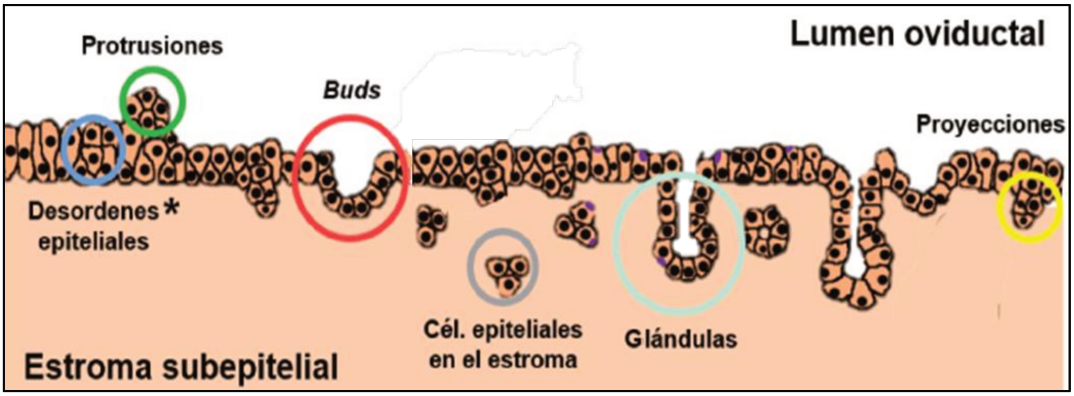

Figura 18. Esquema representativo de alteraciones epiteliales observadas en el oviducto de hembras recién nacidas de *Caiman latirostris.*

Se ilustran distintas lesiones en el epitelio luminal y en el estroma subepitelial, incluyendo: desórdenes epiteliales (círculo azul), protrusiones celulares hacia la luz (círculo verde), brotaciones o *buds* epiteliales (círculo rojo), células epitelioides localizadas en el estroma (círculo

gris), formación de glándulas (círculo celeste) y proyecciones subepiteliales en forma de hileras o columnas (círculo amarillo). Tomado y modificado de Tavalieri y col., (2024).

III.Caracterización histológica de testículos en neonatos de *C. latirostris*

Se realizó un análisis morfológico descriptivo de los túbulos seminíferos en cortes histológicos (Figura 19). La identificación de las estructuras se llevó a cabo en imágenes digitalizadas con una magnificación de 10X, registrándose de forma cualitativa las características generales del parénquima testicular y del tejido intersticial. El área del estroma, también denominada área intersticial, se analizó en términos de su disposición y proporción relativa respecto a los túbulos seminíferos, sin realizar mediciones cuantitativas, dado el carácter exploratorio de la observación (Figura 19).

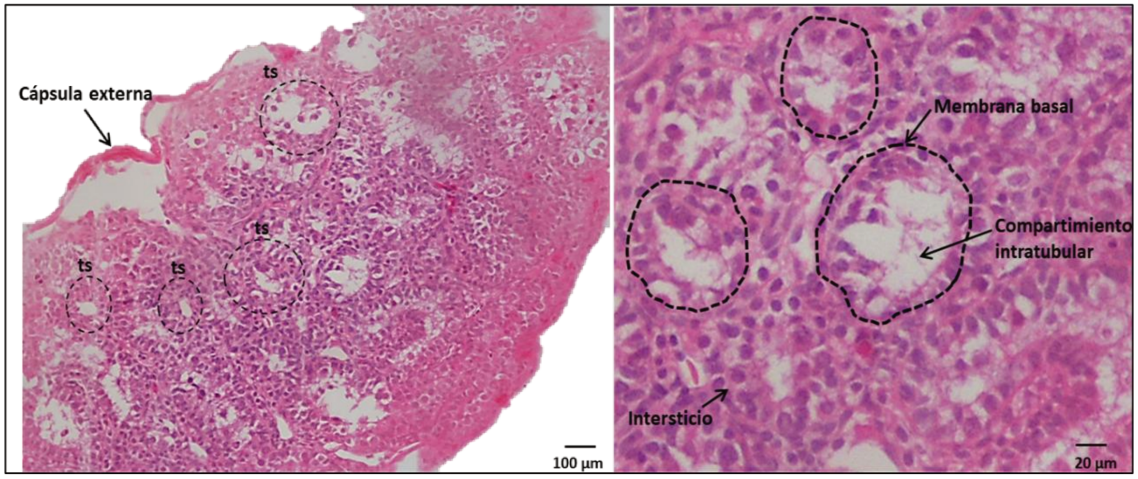

Figura 19. Micrografía de testículo de neonatos de *Caiman latirostris.*

Se observa la cápsula externa con una coloración más intensa. Los túbulos seminíferos (ts) indican con el círculo punteado en color negro. Se observan ts delimitados por sus membranas basales, separados entre sí por espacio intersticial. H-E; 40 y 60X.

IV.Caracterización histológica de intestino en neonatos de *C. latirostris*

Para realizar la caracterización del tejido intestinal de neonatos de *C. latirostris*, se procedió a la realización de un corte transversal en tres porciones diferentes del intestino (Figura 20).

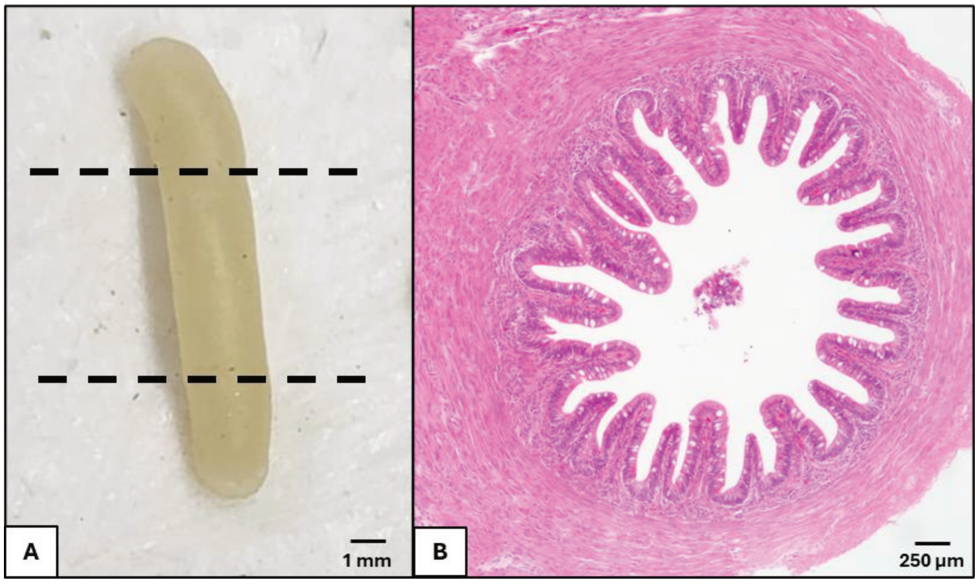

Figura 20. Sección del intestino de neonatos de *Caiman latirostris.*

A: imagen macroscópica, líneas punteadas indican los cortes transversales realizados a diferentes alturas del intestino. B: Micrografía del intestino con vista transversal. H-E; 40X.

2.5.11. Determinación de hormonas sexuales en animales de 1 año (OE5)

Se determinó la concentración plasmática de Progesterona (P), Estradiol (E2) y Testosterona (T) en animales expuestos durante el desarrollo embrionario luego de 1 año post-exposición. Las extracciones de sangre se realizaron de manera individualizada al alcanzar los 365 días post-eclosión, llevándose a cabo durante el mes de marzo de 2023. La medición prevista para los dos años de vida no pudo llevarse a cabo por las razones previamente expuestas en el punto **2.3.1.1**. En el caso de las crías expuestas *in vivo* a los 6 meses de edad, se pudo determinar la concentración de E2 y T también a los 14 meses de vida de los animales (6 meses luego de finalizada la exposición). Dado que el periodo de tratamiento concluyó el 3 de octubre de 2023, esta segunda instancia de muestreo

hormonal se llevó a cabo el 4 de abril de 2024, todos en el mismo día y en un lapso de 2 h desde el primer al último ejemplar. Las determinaciones hormonales analíticas en muestras de plasma se llevaron a cabo por cromatografía líquida / espectrometría de masas en el Laboratorio Alkemy- Santa Fe, mediante servicios de terceros.

2.6. Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando R Core Team (2024). Se aplicó un modelo lineal generalizado (MLG), considerando a cada parámetro medido como variable dependiente y el GE como variable predictora, utilizando la función "*glm*" del paquete "*stats*" de R (R Core Team, 2024). Para el análisis crecimiento de los individuos, se realizó un MLG mixto (MLGM), donde cada animal (ID) se indicó como variable aleatoria y las mediciones morfométricas como variables explicativas. Para la evaluación del éxito de eclosión se incluyeron todos los individuos del diseño experimental (N = 216). Para el diseño experimental de exposición embrionaria, los análisis de metabolitos plasmáticos, lipoperoxidación y expresión génica en sangre se realizaron sobre una submuestra de 6 individuos por GE (N = 72). En tanto, los análisis de expresión génica hepática, contenido lipídico hepático y perfil lipídico de la yema residual se efectuaron en los 3 individuos eutanasiados por GE correspondientes a la máxima concentración evaluada, incluyendo las mezclas y el CN (N = 24). Para el ensayo de exposición *in vivo*, la determinación de metabolitos plasmáticos y parámetros de crecimiento fueron determinados en la totalidad de los individuos expuestos (N = 48).

Para los análisis realizados sobre las muestras histológicas, en los que se obtuvieron múltiples mediciones por individuo, se aplicó un MLGM, considerado apropiado dada la estructura jerárquica de los datos. Cada ID aportó varias observaciones: se tomaron 10 microfotografías por individuo para el cálculo del porcentaje de grasa hepática y 20 mediciones por individuo para la altura epitelial del oviducto. Esta repetición de mediciones dentro de un mismo individuo genera dependencia entre las observaciones, lo que viola el supuesto de independencia asumido por los modelos lineales tradicionales. Para resolver esta limitación, se incorporó el identificador individual (ID) como efecto aleatorio en el modelo, lo que permitió capturar la variación intraindividual y separar dicha variabilidad de la atribuible a los tratamientos. Los GE fueron considerados como efecto fijo, con el objetivo de evaluar su influencia sobre cada variable respuesta. Para

ello, se utilizó la función "*glmmTMB*" del paquete "*glmmTMB*" de R (R Core Team, 2024).

Todos los parámetros de ajuste de cada modelo, tales como la dispersión y la distribución de los errores, fueron evaluados utilizando el paquete "*DHARMa*". Los resultados se expresaron como media ± error estándar (EE) para cada variable y tratamiento. Los datos se presentan en tablas o gráficos de barras, estos últimos generados mediante la función "*ggplot*" del paquete "*ggplot2*" de R. Los modelos ajustados para cada variable de respuesta fueron sometidos a un análisis de devianza Tipo III (Wald χ^2) para evaluar el efecto del tratamiento. Los resultados se reportaron mediante los valores de χ^2 y p. Cuando el efecto global resultó significativo ($p < 0,05$), se efectuaron comparaciones post hoc con el fin de determinar las diferencias entre tratamientos. Estas comparaciones se efectuaron a partir de las medias marginales estimadas utilizando la función "*emmeans*" en el paquete "*emmeans"*, que calcula los contrastes mediante la prueba de Benjamini-Hochberg, considerando un nivel de significancia de $p < 0,05$.

Para analizar de manera conjunta los indicadores de metabolismo lipídico, actividad hepática y evaluar patrones de variación entre individuos provenientes de áreas no expuestas y ambientalmente expuestas, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Este análisis se llevó a cabo utilizando el paquete "*FactoMineR"*, mediante la función "*PCA"*, y la inspección de la varianza explicada se obtuvo con la matriz de autovalores generada por dicho procedimiento. La visualización de los resultados se realizó con el paquete "*factoextra"* a través de la función "*fviz_pca_ind"*, y posteriormente se ajustaron las figuras utilizando "*ggplot2*" de R para la representación de individuos, elipses de confianza y diferenciación por condición ambiental. Para explorar el estado metabólico de las hembras con su respectiva nidada, se realizó una proyección suplementaria de los valores de las hembras sobre el espacio multivariado definido por el PCA construido exclusivamente con los neonatos.

3. Resultados

3.1. Etapa 1: Ensayos experimentales

3.1.1. Exposición a formulaciones de agroquímicos durante el desarrollo embrionario de *C. latirostris*

3.1.1.1. Cuantificación de plaguicidas en el material de nido

GLI, 2,4-D, IMI y CAP fueron detectados en el material de nido de los grupos experimentales luego de su aspersión en concentraciones de 148,8 mg/kg, 31 mg/kg, 25,6 mg/kg y 3,9 mg/kg, respectivamente, confirmando la presencia de los compuestos en las condiciones de exposición establecidas. En contraste, en el material de nido del grupo control negativo (CN) no se registró la presencia de plaguicidas (Odetti y col., 2023b).

3.1.1.2. Resultados obtenidos de la temporada 2021

3.1.1.2.1. Éxito de eclosión de neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE2)

Los resultados del análisis del éxito de eclosión indicaron que el factor tratamiento no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el éxito de eclosión ($p = 0,0808$; Tabla 8).

Tabla 8. Éxito de eclosión (media ± EE e IC) de los huevos de *Caiman latirostris* durante el ensayo de exposición embrionaria de la T2021.

Tratamiento	Éxito de eclosión %	IC inferior	IC superior
CN	80,00 ± 7,13	64,71	95,29
GLI 1 %	64,29 ± 11,83	38,73	89,85
GLI 2 %	86,67 ± 4,36	77,31	96,03
2,4-D 0,06 %	86,67 ± 7,13	71,38	101,95
2,4-D 0,12%	66,67 ± 7,97	49,58	83,76
CAP 0,015 %	66,67 ± 7,97	49,58	83,76
CAP 0,03 %	73,33 ± 6,67	59,03	87,63
IMI 0,1 %	66,67 ± 9,76	45,74	87,60
IMI 0,2 %	93,33 ± 3,56	85,69	100,98
M1	66,67 ± 7,97	49,58	83,76
M2	73,33 ± 10,39	51,05	95,62
M3	86,67 ± 4,36	77,31	96,03

IC: Intervalo de confianza.

3.1.1.2.2. Tamaño corporal de neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE2)

No se encontraron diferencias significativas en las variables LT, LHC, Peso y CC al nacer entre los individuos de diferentes tratamientos luego del ensayo de exposición *in ovo* de la T2021 ($p > 0,05$; Tabla 9).

Tabla 9. Longitud total (LT), longitud hocico-cloaca (LHC), peso y condición corporal (CC; media ± EE) de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición embrionaria a agroquímicos formulados en la T2021.

Tratamiento	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)	CC (g/cm)
CN	21,87 ± 0,13	10,71 ± 0,13	44,26 ± 1,26	4,14 ± 0,10
GLI 1 %	22,79 ± 0,10	11,11 ± 0,16	44,88 ± 1,51	4,12 ± 0,11
GLI 2 %	22,12 ± 0,12	10,89 ± 0,11	44,13 ± 1,35	4,05 ± 0,09
2,4-D 0,06 %	22,14 ± 0,10	10,90 ± 0,16	43,20 ± 1,61	3,96 ± 0,12
2,4-D 0,12%	22,65 ± 0,11	10,91 ± 0,15	44,93 ± 1,22	4,19 ± 0,13
CAP 0,015 %	22,16 ± 0,09	10,95 ± 0,06	43,73 ± 1,45	4,05 ± 0,10
CAP 0,03 %	22,35 ± 0,12	10,77 ± 0,15	44,71 ± 1,62	4,20 ± 0,12
IMI 0,1 %	22,39 ± 0,13	11,06 ± 0,15	45,08 ± 1,65	4,16 ± 0,13
IMI 0,2 %	22,36 ± 0,11	10,78 ± 0,18	43,66 ± 1,53	4,05 ± 0,11
M1	21,86 ± 0,10	10,64 ± 0,14	41,79 ± 1,23	3,93 ± 0,10
M2	22,20 ± 0,07	10,86 ± 0,13	41,64 ± 1,13	3,83 ± 0,07
M3	22,75 ± 0,13	11,22 ± 0,12	44,76 ± 1,63	4,02 ± 0,13

3.1.1.2.3. Determinación del perfil lipídico e indicadores de actividad hepática en plasma en neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE2)

3.1.1.2.3.1. Determinación plasmática de metabolitos lipídicos

Los resultados obtenidos de la concentración de TGs, CL, PT, GPT y GOT en neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* (T2021) se detallan en la Tabla 10.

Se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de TGs entre los tratamientos evaluados (χ^2 = 19,611; p = 0,0048). La concentración de TGs en los tratamientos GLI 2 %, CAP 0,03 %, IMI 0,2 %, M2 y M3 fue significativamente menor a la observada en el CN (p = 0,0491, p = 0,0042, p = 0,0264, p = 0,0482 y p = 0,0140, respectivamente). Respecto a las mezclas, se encontró una mayor concentración de TGs en el tratamiento CAP 0,015 % respecto a la M3 (p = 0,0492; Tabla 10).

El tratamiento tuvo un efecto significativo sobre las concentraciones de CL (χ^2 = 23,788; p < 0,0001). Los valores medios de la concentración de CL plasmático en los tratamientos GLI 1 %, CAP al 0,015 y 0,03 % fueron significativamente mayores comparado con el grupo CN (p = 0,0418, p = 0,0423 y p = 0,0498, respectivamente). No hubo diferencias significativas entre las mezclas y sus constituyentes individuales (p > 0,05).

El análisis reveló diferencias significativas en los niveles de PT entre los tratamientos evaluados (χ^2 = 48,044; p < 0,0001). Se encontraron niveles de PT significativamente menores en los tratamientos GLI 1 %, 2,4-D al 0,06 y 0,12 %, CAP 0,015 %, IMI al 0,1 y al 0,2 %, M1, M2 y M3 comparado con el CN (p = 0,0159, p = 0,0050; p = 0,0476, p = 0,0101, p = 0,0297, p = 0,0037, p = 0,0001, p = 0,0117 y p = 0,0001, respectivamente). Respecto a las mezclas, se observó una mayor concentración de PT en los tratamientos GLI al 1 y 2 % y en 2,4-D 0,12 % respecto a la M1 (p = 0,0007, p = 0,0177 y p = 0,0011, respectivamente); y en los tratamientos GLI al 1 y 2 %, 2,4-D 0,12 %, CAP al 0,015 y 0,03 % e IMI al 0,1 y 0,2 % comparado a la M3 (p < 0,0001, p = 0,0003, p < 0,0001, p < 0,0001, p < 0,0001, p = 0,0008, p = 0,0037 y p = 0,0489, respectivamente; Tabla 10).

Las concentraciones de GPT variaron significativamente entre los tratamientos evaluados (χ^2 = 29,323; p = 0,0020). Los resultados mostraron una actividad de la enzima GPT significativamente mayor en los tratamientos GLI al 1 y 2 %, 2,4-D al 0,12 % y M2 comparado al CN (p = 0,0409, p = 0,0011, p = 0,0006 y p = 0,0189, respectivamente). Respecto a las mezclas, se observó mayor actividad de GPT en el tratamiento GLI 2% respecto a la mezcla M1 (p = 0,0467); mientras que en los tratamientos CAP 0,03 % e IMI 0,2 % se observó una disminución de su actividad respecto a la M2 (p = 0,0241 y p = 0,0149, respectivamente); contrariamente, se registró un incremento de la actividad de GPT en los tratamientos GLI 2 % y 2,4-D 0,12 % comparado a la M3 (p = 0,0129 y p = 0,0149, respectivamente; Tabla 10).

No se evidenciaron diferencias significativas en la actividad enzimática GOT entre los tratamientos respecto al CN, como así tampoco entre las mezclas y los tratamientos con los compuestos individuales (p > 0,05).

Tabla 10. Determinaciones bioquímicas (media ± EE) en neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición embrionaria a diferentes formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2021.

TG:

Tratamientos	TG (g/L)	CL (g/L)	PT (mg/dL)	GPT (U/L)	GOT (U/L)
CN	2,04 ± 0,26	7,18 ± 0,35	18,40 ± 5,09	9,80 ± 1,19	42,50 ± 3,82
GLI 1 %	1,31 ± 0,11	**9,11 ± 0,52** *	**9,60 ± 0,62** *#×	**16,80 ± 3,22** *	S/D
GLI 2 %	**1,25 ± 0,17** *	8,58 ± 0,45	**10,50 ± 1,36** #×	**24,10 ± 5,40** *#×	31,80 ± 4,17
2,4-D 0,06 %	1,71 ± 0,33	8,23 ± 0,44	**8,30 ± 0,86** *	19,00 ± 6,73	36,10 ± 5,55
2,4-D 0,12%	1,30 ± 0,28	8,71 ± 0,33	**10,40 ± 0,99** *#×	**18,80 ± 1,93** *×	36,70 ± 10,50
CAP 0,015 %	**1,75 ± 0,36** ×	**9,36 ± 0,24** *	**9,09 ± 0,64** *×	10,70 ± 3,12	S/D
CAP 0,03 %	**1,00 ± 0,19** *	**9,02 ± 0,32** *	**10,40 ± 1,32** ×	**10,30 ± 1,11** +	30,70 ± 4,02
IMI 0,1 %	1,36 ± 0,25	7,92 ± 0,48	**9,26 ± 1,64** *×	12,70 ± 1,19	S/D
IMI 0,2 %	**1,13 ± 0,15** *	8,60 ± 0,49	**8,06 ± 0,96** *×	**10,50 ± 0,62** +	25,30 ± 1,51
M1	1,58 ± 0,27	7,90 ± 0,25	**7,00 ± 0,41** *	14,00 ± 1,70	22,70 ± 4,62
M2	**1,23 ± 0,16** *	8,30 ± 0,60	**8,82 ± 1,08** *	**18,70 ± 4,22** *	38,70 ± 4,04
M3	**1,09 ± 0,13** *	7,69 ± 0,71	**6,35 ± 0,23** *	11,30 ± 1,68	35,80 ± 7,56

Triglicéridos; CL: Colesterol; PT: Proteínas totales; GPT: Glutamato piruvato transaminasa; GOT: Glutamato oxalacetato transaminasa. S/D: sin datos. Diferencias significativas $p < 0,05$: respecto al control (*); respecto a la M1 (#); respecto a la M2 (+) y respecto a la M3 (×).

3.1.1.2.3.2. Determinación molecular de genes asociados al metabolismo lipídico

I. Identificación y semicuantificación relativa de genes objetivo

Los resultados del análisis por PCR convencional demostraron la presencia de los genes de interés en los diferentes tejidos evaluados (Figura 21).

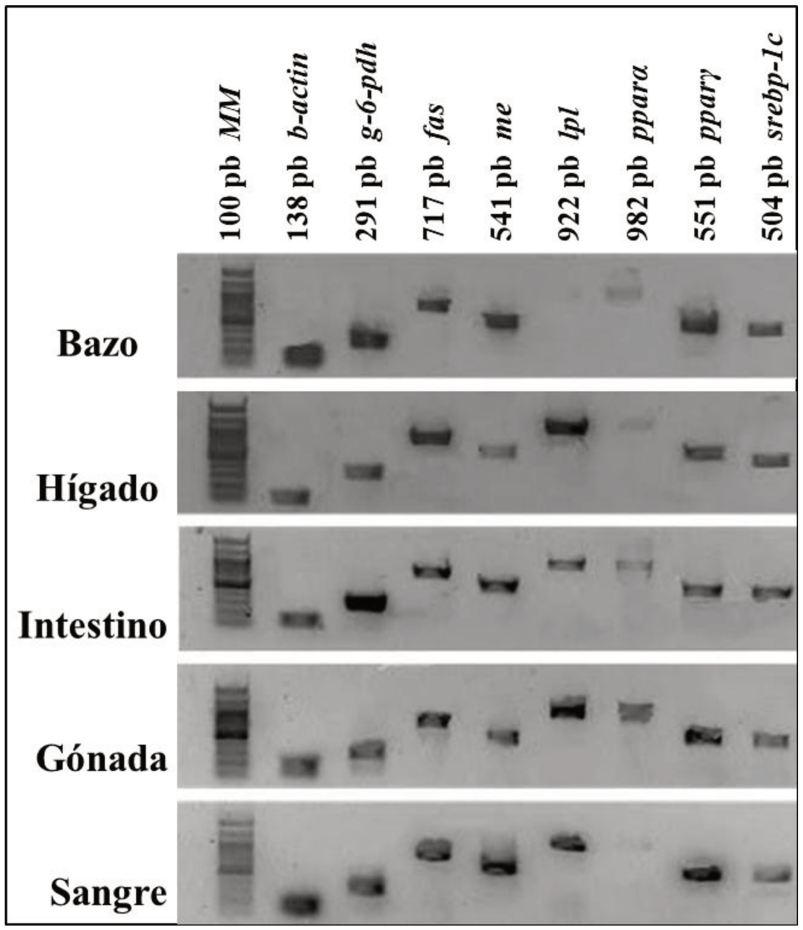

Figura 21. Identificación de genes involucrados en el metabolismo lipídico en diferentes tejidos de juveniles de *Caiman latirostris* (n = 3).

MM (marcador molecular): 100 pb; β-actina: 138 pb; g-6-pdh (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa): 291 pb; fas (ácido graso sintasa): 717 pb; me (enzima málica): 541 pb; lpl (lipoproteína lipasa): 922 pb; pparα (receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa): 982 pb; pparγ (receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma): 551 pb y srebp-1c (proteína de unión al elemento regulador de esterol-1c): 504 pb.

Todos los genes analizados presentaron un nivel relativo diferencial de ARNm entre tejidos (Figura 22). El nivel de expresión de *g-6-pdh* fue estadísticamente mayor en el intestino en comparación con todos los demás tejidos ($p < 0,001$; Figura 22-A), seguido por la gónada, el hígado y el bazo, y finalmente la sangre. Asimismo, el nivel de expresión en sangre fue estadísticamente diferente respecto a todos los demás tejidos ($p < 0,001$; Figura 22-A).

El nivel de expresión de *me* fue alto en la gónada, seguido por el intestino y luego el hígado, la sangre y el bazo. Las comparaciones múltiples revelaron diferencias significativas entre la gónada y todos los demás tejidos, así como entre el intestino y el resto ($p < 0,01$ Figura 22-B).

Para *lpl*, el hígado fue el tejido con mayor expresión, seguido por el intestino, la gónada, la sangre y el bazo. La comparación múltiple muestra diferencias estadísticamente significativas entre todos los tejidos ($p < 0,001$; Figura 22-C), excepto entre el intestino y la gónada ($p = 0,2829$).

El gen *fas* muestra una expresión significativamente mayor en el hígado en comparación con los otros tejidos evaluados ($p < 0,001$; Figura 22-D), seguido por el intestino, la sangre, el bazo, y finalmente la gónada. Las comparaciones múltiples demuestran diferencias estadísticamente significativas entre todos los tejidos ($p < 0,001$; Figura 22-D), excepto entre el bazo y la sangre ($p = 0,1449$).

Los niveles de expresión del factor de transcripción *pparα* resultaron ser significativamente mayores en el hígado, la sangre y el intestino que en el bazo y la gónada. También se observó una diferencia significativa entre el bazo y la gónada ($p < 0,0001$; Figura 22-E), pero no se encontraron diferencias en la comparación entre el hígado, el intestino y la sangre ($p > 0,05$).

En el caso de *pparγ*, el hígado fue el tejido con mayor expresión, seguido por la sangre y luego los otros tres. El contraste múltiple demuestra diferencias estadísticamente significativas en el hígado respecto a todos los demás tejidos, así como en la sangre en comparación con el intestino y el bazo ($p < 0,001$; Figura 22-F), pero no se observaron

diferencias significativas en la gónada respecto de sangre, bazo o intestino ($p > 0,05$). Asimismo, tampoco se encontraron diferencias entre bazo e intestino ($p > 0,05$).

Para el factor de transcripción *srebp-1c*, el hígado mostró un nivel de expresión superior en comparación con el resto, seguido por la gónada y el intestino, y luego por el bazo y la sangre ($p < 0,0001$; Figura 22-G). No se observaron diferencias entre la gónada y el intestino ni entre el bazo y la sangre ($p > 0,05$).

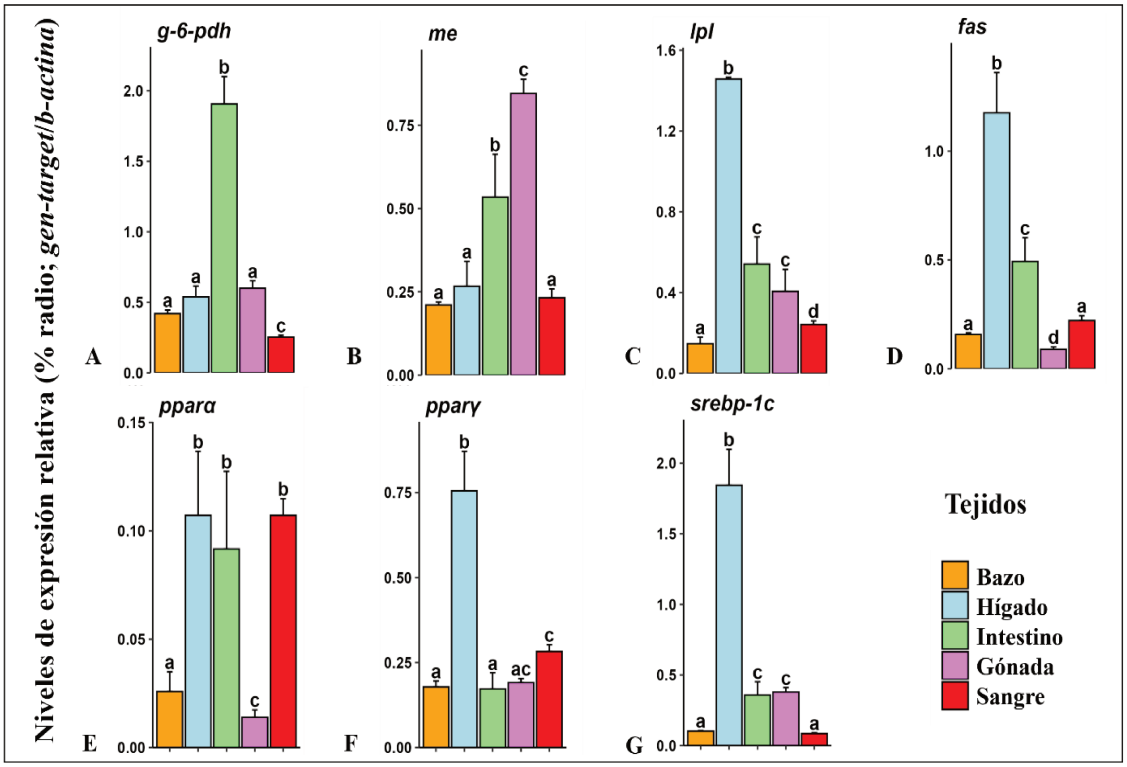

Figura 22. Niveles de expresión relativas en diferentes tejidos de juveniles *Caiman latirostris* (n = 3).

g-6-pdh (deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato), me (enzima málica), lpl (lipoproteína lipasa), fas (ácido graso sintasa), pparα (receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa), pparγ (receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma) y srebp-1c (proteína de unión al elemento regulador de esterol-1c). Los niveles de expresión se calcularon en relación con la expresión de β-actina como gen normalizador. Diferencias significativas: $p < 0,01$.

II. Secuenciación, alineación múltiple y análisis bioinformático

Los resultados obtenidos tras la secuenciación mostraron diferentes secuencias: 260 pb para *g-6-pdh;* 668 pb para el gen *fas*; 504 pb para *me*; 897 pb para *lpl*; 944 pb para *pparα*; 528 pb para *pparγ* y 476 pb para *srebp-1c*. La cobertura de la secuencia consenso fue del 95 % para todos los genes objetivo.

Los alineamientos locales (BLASTn) y múltiples demuestran que los códigos de secuencia de *C. latirostris* son homólogos para g-*6-pdh, fas, me, lpl, pparα, pparγ* y *srebp-1c* entre los diferentes saurópsidos comparados, exhibiendo porcentajes de identidad específicos descritos en los datos suplementarios.

El árbol filogenético se realizó mediante la reconstrucción de un árbol de vecino cercano (N-J) basado en el alineamiento de secuencias nucleotídicas obtenidas para *C. latirostris* y de otros saurópsidos. Las secuencias de *C. latirostris* se ubicaron junto con el grupo de la familia Alligatoridae en el árbol consenso con un 98 % de confianza (Figura 23). El análisis filogenético muestra un árbol consenso enraizado en *G. gallus*, que se separa aproximadamente desde hace 275 millones de años (Mya; Shaney y col., 2014), tal como indica la barra.

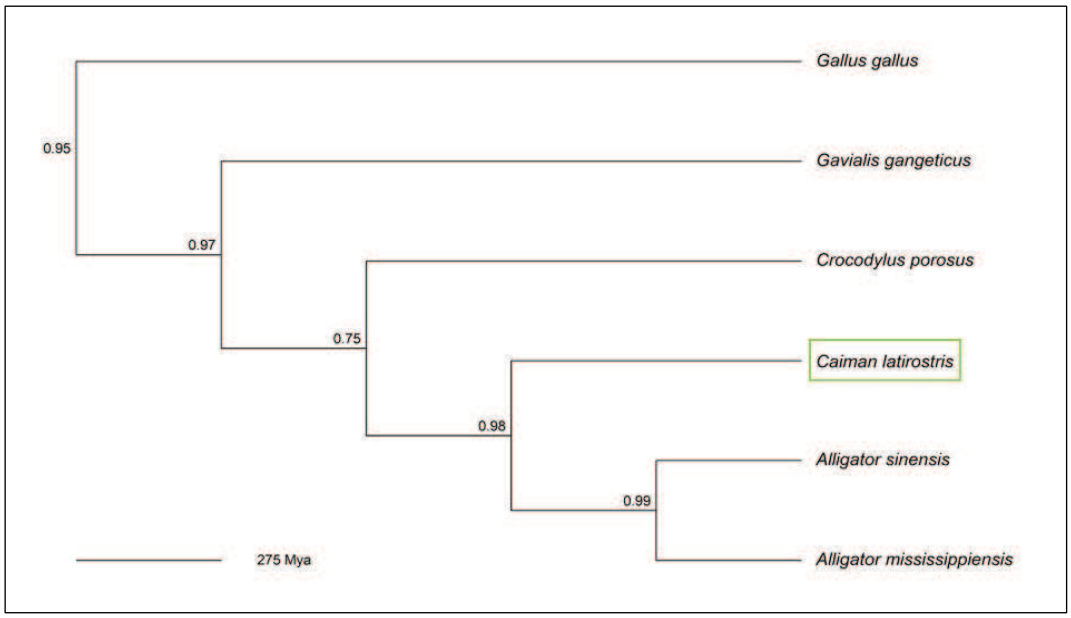

Figura 23. Árbol de consenso de *Caiman latirostris.*

Construido a partir de siete árboles filogenéticos basados en diferentes secuencias nucleotídicas (*g-6-pdh, fas, me, lpl, pparα, pparγ y srebp-1c*), utilizando la función de consenso en R. El árbol

se enraíza en *Gallus gallus* (barra: tiempo de divergencia 275 millones de años). Las etiquetas de los nodos indican los valores de soporte bootstrap. Barra = 275 Mya, millones de años.

3.1.1.2.3.3. Expresión génica en sangre de neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas

En sangre de neonatos de *C. latirostris* expuestos *in ovo* (T2021), la expresión relativa del gen *g-6-pdh* difirió significativamente entre los tratamientos evaluados ($\chi^2 = 206,440$; $p < 0,0001$). Se hallaron valores significativamente menores en los tratamientos con 2,4-D 0,12 %, CAP 0,03 % e IMI 0,2 % comparado con el grupo control ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ y $p = 0,0351$, respectivamente), mientras que la mezcla M3 presentó niveles significativamente mayores en comparación con el grupo CN ($p = 0,0002$; Figura 24-A). Además, en el análisis de las mezclas se evidenció una mayor expresión relativa de *g-6-pdh* en la M1 en comparación con 2,4-D 0,12 % ($p = 0,0007$); en la M2 respecto a CAP 0,03 % ($p = 0,0071$); y en la M3 frente a todos los compuestos individuales (GLI 2 %, 2,4-D 0,12 %, CAP 0,03 % e IMI 0,2 %; $p < 0,0001$; Figura 24-A).

La expresión relativa del gen *me* difirió significativamente entre los tratamientos evaluados ($\chi^2 = 30,864$; $p < 0,0001$). En particular, se observó una mayor expresión relativa del gen *me* en el tratamiento M2 en comparación con el grupo CN ($p = 0,0226$; Figura 24-B). En relación con la comparación entre las mezclas con sus respectivos compuestos individuales, no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$; Figura 24-B).

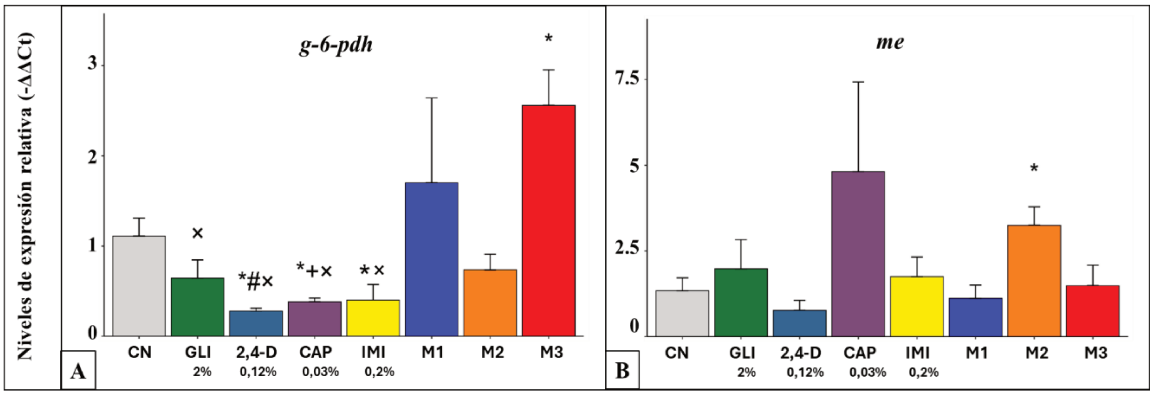

Figura 24. Expresión relativa (media ± EE) de los genes *g-6-pdh* (*deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato-A*) y *me* (*enzima málica*-B) en sangre de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2021.

Tratamientos: CN (control negativo); GLI 2 % (formulación de glifosato al 2 %); 2,4-D 0,12 % (formulación de 2,4-D al 0,12 %); CAP 0,03 % (formulación de clorantraniliprole al 0,03 %); IMI 0,2 % (formulación de imidacloprid al 0,2 %); M1 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 %); M2 (mezcla compuesta por CAP 0,015 % + IMI 0,1 %); M3 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). Diferencias significativas $p < 0,05$: respecto CN (*); respecto a la M1 (#); respecto a la M2 (+); respecto a la M3 (×).

3.1.1.2.4. Peroxidación lipídica en neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE3)

El análisis reveló diferencias significativas en los niveles de lipoperoxidación entre los tratamientos evaluados ($\chi^2 = 23,644$; $p < 0,0051$). Se evidenció un incremento en los niveles de TBARS (nmol/g de PT) en los tratamientos IMI 0,2 %, M1, M2 y M3 comparado con el grupo control ($p = 0,0496$, $p = 0,0436$, $p = 0,0423$ y $p = 0,0478$, respectivamente; Figura 25). En relación con las mezclas, no se observaron diferencias significativamente en comparación con sus constituyentes individuales ($p > 0,05$; Figura 25).

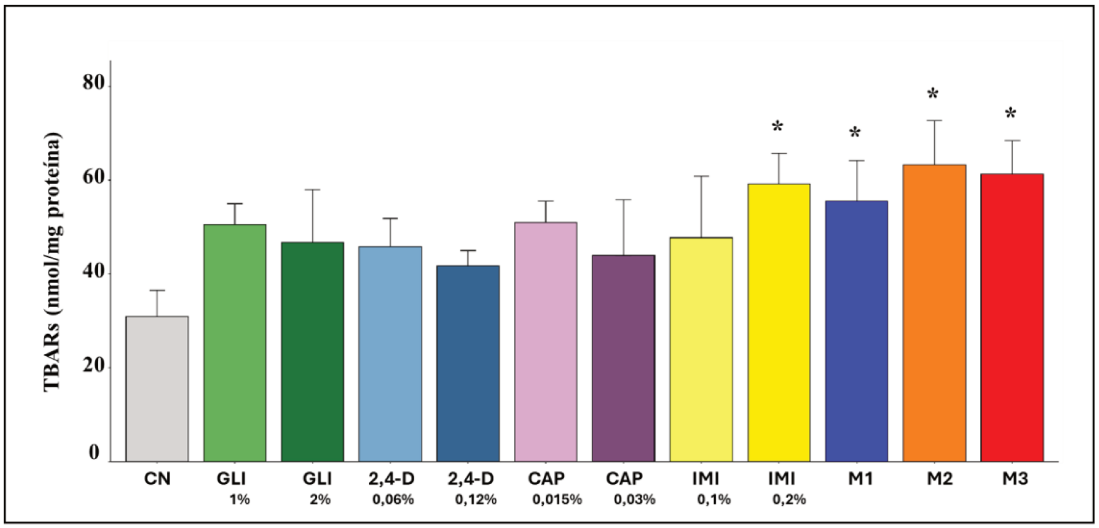

Figura 25. Niveles de TBARS (nmol/mg de proteína; media ± EE) en neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2021.

Tratamientos: CN (control negativo); GLI 1 % (formulación de glifosato al 1 %); GLI 2 % (formulación de glifosato al 2 %); 2,4-D 0,06 % (formulación de 2,4-D al 0,06 %); 2,4-D 0,12 % (formulación de 2,4-D al 0,12 %); CAP 0,015 % (formulación de clorantraniliprole al 0,015 %); CAP 0,03 % (formulación de clorantraniliprole al 0,03 %); IMI 0,1 % (formulación de imidacloprid al 0,1 %); IMI 0,2 % (formulación de imidacloprid al 0,2 %); M1 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 %); M2 (mezcla compuesta por CAP 0,015 % + IMI 0,1 %); M3 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). Diferencias significativas $p < 0,05$: respecto a CN (*); respecto a la M1 (#).

3.1.1.3. Resultados obtenidos de la temporada 2022

3.1.1.3.1. Éxito de eclosión de neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE2)

El análisis evidenció un efecto significativo del tratamiento sobre el éxito de eclosión ($\chi^2 = 47,894$; $p < 0,0001$). Los resultados mostraron una disminución significativa del éxito de eclosión en los tratamientos 2,4-D 0,06 %, CAP 0,03 % e IMI 0,2 % comparado con el grupo CN ($p = 0,0128$, $p = 0,0330$ y $p = 0,0497$, respectivamente). Respecto a las mezclas, el éxito de eclosión fue significativamente menor en los tratamientos 2,4-D 0,06 % y CAP 0,03 % en comparación con la M3 ($p = 0,0057$ y $p = 0,0030$, respectivamente; Tabla 11).

Tabla 11. Éxito de eclosión (media ± EE e IC) de los huevos de *Caiman latirostris* durante el ensayo de exposición embrionaria de la T2022.

Tratamiento	Éxito de eclosión %	IC inferior	IC superior
CN	98,10 ± 1,31	95,36	100,83
GLI 1 %	90,00 ± 2,96	83,80	96,20
GLI 2 %	84,21 ± 5,01	73,68	94,74
2,4-D 0,06 %	**73,68 ± 6,84** *×	59,31	88,06
2,4-D 0,12%	84,21 ± 3,92	75,97	92,45
CAP 0,015 %	77,78 ± 8,94	58,92	96,63
CAP 0,03 %	**83,33 ± 6,17** *×	70,31	96,36
IMI 0,1 %	90,00 ± 3,50	82,67	97,33
IMI 0,2 %	**80,00 ± 4,19** *	71,23	88,77
M1	84,21 ± 3,92	75,97	92,45
M2	88,89 ± 3,81	80,85	96,93
M3	94,44 ± 3,01	88,09	100,80

IC: Intervalo de confianza. Diferencias significativas $p < 0,05$: respecto a CN (*); respecto a la M3 (×).

3.1.1.3.2. Tamaño corporal de neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE2)

No se encontraron diferencias significativas en las variables LT, LHC, Peso y CC entre los tratamientos luego del ensayo de exposición *in ovo* de la T2022 ($p > 0,05$; Tabla 12).

Tabla 12. Longitud total (LT), longitud hocico-cloaca (LHC), peso y condición corporal (CC; media ± EE) de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición embrionaria a agroquímicos formulados en la T2022.

Tratamiento	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)	CC (g/cm)
CN	21,87 ± 0,13	10,71 ± 0,13	44,26 ± 1,26	4,14 ± 0,10
GLI 1 %	22,79 ± 0,10	11,11 ± 0,16	44,88 ± 1,51	4,12 ± 0,11
GLI 2 %	22,12 ± 0,12	10,89 ± 0,11	44,13 ± 1,35	4,05 ± 0,09
2,4-D 0,06 %	22,14 ± 0,10	10,90 ± 0,16	43,20 ± 1,61	3,96 ± 0,12
2,4-D 0,12%	22,65 ± 0,11	10,91 ± 0,15	44,93 ± 1,22	4,19 ± 0,13
CAP 0,015 %	22,16 ± 0,09	10,95 ± 0,06	43,73 ± 1,45	4,05 ± 0,10
CAP 0,03 %	22,35 ± 0,12	10,77 ± 0,15	44,71 ± 1,62	4,20 ± 0,12
IMI 0,1 %	22,39 ± 0,13	11,06 ± 0,15	45,08 ± 1,65	4,16 ± 0,13
IMI 0,2 %	22,36 ± 0,11	10,78 ± 0,18	43,66 ± 1,53	4,05 ± 0,11
M1	21,86 ± 0,10	10,64 ± 0,14	41,79 ± 1,23	3,93 ± 0,10
M2	22,20 ± 0,07	10,86 ± 0,13	41,64 ± 1,13	3,83 ± 0,07
M3	22,75 ± 0,13	11,22 ± 0,12	44,76 ± 1,63	4,02 ± 0,13

3.1.1.3.3. Determinación del perfil lipídico e indicadores de actividad hepática en plasma en neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE2)

3.1.1.3.3.1. Determinación plasmática de metabolitos lipídicos

Los resultados obtenidos de la concentración de TGs, CL, PT, GPT y GOT en neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* (T2022) se detallan en la Tabla 13.

Se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de TGs entre los tratamientos evaluados (χ^2 = 17,154; p = 0,0018). Las concentraciones medias de TGs fueron significativamente menores en los tratamientos GLI al 1 % y 2 %, 2,4-D al 0,06 %, CAP al 0,015 % y 0,03 %, IMI al 0,2 % (p = 0,0167, p = 0,0177, p = 0,0055, p = 0,0405, p = 0,0372 y p = 0,0362, respectivamente), así como en las mezclas M1 y M3, en comparación con el grupo CN (p = 0,0114 y p = 0,0458, respectivamente). Respecto a las mezclas, no se encontraron diferencias significativas comparado con sus respectivos compuestos individuales (p > 0,05; Tabla 13).

El tratamiento tuvo un efecto significativo sobre las concentraciones plasmáticas de CL (χ^2 = 23,936; p = 0,0013). Se evidenciaron valores significativamente mayores de CL en los animales de los tratamientos GLI al 1 % y 2 %, 2,4-D a 0,12 %, CAP a 0,03 %, IMI a 0,2 % (p = 0,0179, p = 0,0031, p = 0,0172, p = 0,0267 y p = 0,0471, respectivamente), y en las mezclas M1 y M2, en comparación con el grupo CN (p = 0,0085 y p = 0,0227, respectivamente). Asimismo, en lo referente a las mezclas, los tratamientos individuales con GLI al 1 % y 2 %, 2,4-D a 0,12 %, CAP a 0,03 % e IMI a 0,2 % presentaron concentraciones de CL significativamente mayores que la obtenida en la M3 (p = 0,0157, p = 0,0022, p = 0,0151 y p = 0,0462, respectivamente; Tabla 13).

El análisis reveló diferencias significativas en los niveles de PT entre los tratamientos evaluados (χ^2 = 24,569; p = 0,0105). La determinación de PT evidenció una concentración significativamente baja en CAP 0,03 % en comparación con el grupo CN (p = 0,0281). De manera similar, se observó una disminución significativa de PT en el tratamiento CAP 0,03 % respecto a la mezcla M2 (p = 0,0048); contrariamente, se registró mayor

concentración de PT en los tratamientos GLI 1 % e IMI 0,1 % en comparación con la mezcla M3 ($p = 0,0261$ y $p = 0,0022$, respectivamente; Tabla 13).

Las concentraciones de GPT variaron significativamente entre tratamientos testeados ($\chi^2 = 175,411$; $p < 0,0001$). En comparación con el CN, los resultados revelaron un aumento en la actividad cinética de GPT en los tratamientos con GLI al 1 % y 2 % y en CAP 0,03 % ($p < 0,0001$), mientras que en los tratamientos M2 y M3 se observó una actividad significativamente menor que el control CN ($p = 0,0025$ y $p < 0,0001$, respectivamente). En cuanto a las mezclas, se registró menor actividad de GPT en M1 respecto a los tratamientos con GLI al 1 y 2 % y en 2,4-D al 0,012 % ($p < 0,001$), en M2 en comparación con CAP 0,03 % ($p < 0,001$), y en M3 respecto a GLI al 1 % y 2 %, 2,4-D al 0,06 % y 0,12 %, CAP 0,03 % e IMI 0,2 % ($p < 0,0001$; Tabla 13).

Las concentraciones de GOT variaron significativamente entre los tratamientos evaluados ($\chi^2 = 53,751$; $p < 0,0001$). Se registró mayor actividad cinética de GOT en los tratamientos GLI al 1 %, CAP a 0,03 %, IMI a 0,2 % y en M1 comparado con el grupo CN ($p = 0,0295$, $p = 0,0061$, $p = 0,0072$ y $p = 0,0250$, respectivamente). Además, al evaluar las mezclas, la actividad de GOT resultó significativamente mayor en los tratamientos CAP a 0,03 % e IMI a 0,2 % frente a las mezclas M2 y M3 ($p < 0,01$; Tabla 13).

Tabla 13. Determinaciones bioquímicas (media ± EE) en neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición embrionaria a diferentes formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022.

Tratamientos	TG (mg/L)	CL (mg/L)	PT (mg/mL)	GPT (U/L)	GOT(U/L)
CN	2,88 ± 0,29	4,58 ± 0,60	5,93 ± 0,81	31 ± 1,49	23,13 ± 4,12
GLI 1 %	**1,41 ± 0,18** *	**7,59 ± 0,43** *×	**6,44 ± 0,84** ×	**58,5 ± 7,56** *#×	**45,69 ± 11,57** *
GLI 2 %	**1,41 ± 0,18** *	**8,39 ± 0,64** *×	4,63 ± 0,44	**64,2 ± 8,04** *#×	28,13 ± 6,39
2,4-D 0,06 %	**1,21 ± 0,27** *	6,24 ± 0,90	4,6 ± 0,65	**30,1 ± 2,70** ×	30,38 ± 1,86
2,4-D 0,12%	1,87 ± 0,45	**7,6 ± 0,61** *×	5,58 ± 0,45	**49,6 ± 9,48** #×	32,88 ± 2,44
CAP 0,015 %	**1,41 ± 0,53** *	5,81 ± 0,70	5,7 ± 1,05	12,8 ± 4,55	15,83 ± 2,49
CAP 0,03 %	**1,50 ± 0,21** *	**7,38 ± 1,11** *×	**3,95 ± 0,60** *+	**60,20 ± 7,99** *+×	**50,78 ± 10,80** *+×
IMI 0,1 %	1,59 ± 0,33	6,73 ± 0,97	**6,36 ± 0,47** ×	29 ± 6,24	26,19 ± 2,93
IMI 0,2 %	**1,49 ± 0,17** *	**7,08 ± 0,69** *×	5,03 ± 0,76	**39,7 ± 9,60** ×	**45,40 ± 7,00** *+×
M1	**1,34 ± 0,19** *	**7,94 ± 0,83** *	5,43 ± 0,43	24,4 ± 4,22	**38,41 ± 5,22** *
M2	2,17 ± 0,55	**7,47 ± 0,92** *	6,73 ± 0,89	**21 ± 2,57** *	31,86 ± 1,95
M3	**1,62 ± 0,18** *	4,82 ± 0,82	4,69 ± 0,38	**15,7 ± 1,89** *	28,52 ± 1,68

TG: Triglicéridos; CL: Colesterol; PT: Proteínas totales; GPT: Glutamato piruvato transaminasa; GOT: Glutamato oxalacetato transaminasa. Diferencias significativas $p < 0,05$: respecto al control (*); respecto a la M1 (#); respecto a la M2 (+) y respecto a la M3 (×).

3.1.1.3.3.2. Expresión génica en hígado de neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas

En hígado de neonatos de *C. latirostris* expuestos *in ovo* (T2022), la expresión relativa del gen *g-6-pdh* difirió significativamente entre los tratamientos evaluados ($\chi^2 = 241{,}901$; $p < 0{,}0001$). Se hallaron valores estadísticamente mayores en los tratamientos con GLI 2 %, M1, M2 y M3 comparado al grupo CN ($p = 0{,}0029$, $p = 0{,}0051$, $p = 0{,}0157$ y $p < 0{,}0001$, respectivamente); mientras que el tratamiento CAP 0,03 % mostró niveles significativamente menores respecto al CN ($p = 0{,}0048$; Figura 26-A). Respecto a las mezclas, los niveles de expresión de *g-6-pdh* fueron significativamente menores en el tratamiento CAP 0,03 % comparado con la mezcla M2 ($p < 0{,}0001$); y, de manera similar, en los tratamientos GLI 2 %, 2,4-D 0,12 %, CAP 0,03 % e IMI 0,2 % comparado con la mezcla M3 ($p = 0{,}0086$, $p = 0{,}0001$, $p < 0{,}0001$ y $p < 0{,}0001$, respectivamente; Figura 26-A).

La expresión relativa del gen *me* difirió significativamente entre tratamientos evaluados ($\chi^2 = 194{,}010$; $p < 0{,}0001$). Los niveles de expresión génica de *me* en hígado fueron significativamente mayores en neonatos de *C. latirostris* expuestos *in ovo* a GLI al 2 %, CAP al 0,03 %, IMI al 0,2 % y a las mezclas M1, M2 y M3, en comparación con el grupo control CN ($p < 0{,}0001$). En cuanto a las mezclas, se observaron niveles de expresión de *me* significativamente más bajos en los tratamientos GLI 2% y 2,4-D 0,12%, comparado con la mezcla M1 ($p = 0{,}0047$ y $p < 0{,}0001$, respectivamente); y, de manera similar, en los tratamientos con 2,4-D al 0,12 %, IMI al 0,2% y CAP al 0,03%, comparado con la mezcla M3 ($p < 0{,}001$; Figura 26-B).

Se detectó un efecto significativo del tratamiento sobre la expresión relativa del gen *lpl* ($\chi^2 = 870{,}271$; $p < 0{,}0001$). Comparado con el grupo CN, los niveles de expresión hepática fueron significativamente menores en el tratamiento con 2,4-D al 0,12 % ($p = 0{,}0012$), mientras que en los tratamientos con IMI al 0,2 %, M1 y M3 se registraron niveles significativamente mayores de expresión de este gen ($p < 0{,}0001$ y $p = 0{,}0317$ y $p = 0{,}0007$, respectivamente; Figura 26-C). En cuanto a las comparaciones entre mezclas y sus respectivos compuestos individuales, se observaron niveles de expresión significativamente menores en 2,4-D al 0,12 % en comparación con la mezcla M1 ($p <$

0,0001), y en CAP al 0,03 % respecto a la mezcla M2 ($p = 0,0021$). En contraste, IMI al 0,2 % presentó niveles significativamente mayores que M2 ($p < 0,0001$). Asimismo, en relación con la mezcla M3, los tratamientos con 2,4-D al 0,12 % y CAP al 0,03 % exhibieron niveles de expresión de *lpl* significativamente menores ($p < 0,0001$), mientras que IMI al 0,2 % mostró un aumento significativo en la expresión en comparación con dicha mezcla ($p = 0,0264$; Figura 26-C).

Los niveles de expresión relativa del gen *fas* presentaron diferencias significativas entre tratamientos evaluados ($\chi^2 = 117,905$; $p < 0,0001$). Los resultados indicaron niveles de expresión hepática significativamente menores en el tratamiento CAP al 0,03 % en comparación con el grupo CN ($p = 0,0139$). Además, este mismo tratamiento al igual que IMI 0,2 %, presentaron niveles significativamente menores a los observados en las mezclas M2 y M3 ($p < 0,001$; Figura 26-D).

La expresión relativa del gen *pparα* en hígado de neonatos de *C. latirostris* varió significativamente entre los tratamientos evaluados ($\chi^2 = 450,253$; $p < 0,0001$; Figura 26-E). En comparación con el CN, se observó una expresión significativamente menor en los tratamientos GLI 2 %, CAP 0,03 % e IMI 0,2 % ($p = 0,0417$, $p < 0,0001$ y $p < 0,0001$, respectivamente). Asimismo, el tratamiento M2 presentó un incremento significativo en la expresión de este gen respecto al grupo CN ($p = 0,0075$), siendo el valor más elevado entre todos los tratamientos evaluados. En cuanto a las comparaciones entre las mezclas y sus respectivos constituyentes individuales, se detectaron diferencias significativas menores en la expresión de *pparα* entre CAP 0,03 % e IMI 0,2 % con respecto a las mezclas M2 y M3 ($p < 0,001$; Figura 26-E).

Para el caso de del gen *pparγ*, se observaron variaciones significativas en su expresión en función del tratamiento ($\chi^2 = 331,730$; $p < 0,0001$). Se registraron mayores niveles en su expresión en hígado en los tratamientos GLI 2 %, IMI 0,2 %, M1, M2 y M3 en comparación con el CN ($p < 0,001$). En relación con las mezclas, GLI 2 % presentó niveles de expresión significativamente mayores que los observados en M1 y M3 ($p = 0,0005$ y $p = 0,0157$, respectivamente), mientras que el tratamiento con 2,4-D 0,12 % mostró niveles significativamente menores respecto a esas mismas mezclas ($p < 0,001$). De manera similar, CAP 0,03 % presentó una expresión significativamente menor en comparación con M2 y M3 ($p < 0,0001$; Figura 26-F).

La expresión relativa del gen *srebp1-c* en hígado de neonatos de *C. latirostris* mostró variaciones entre los tratamientos evaluados (χ^2 = 868,571; p < 0,0001). En comparación con el grupo CN, se observó una expresión significativamente menor en el tratamiento CAP 0,03 % (p = 0,0002); mientras que la M3 presentó niveles significativamente más altos (p = 0,0008; Figura 26-G). En cuanto a las mezclas, se registró un nivel de expresión significativamente menor en CAP 0,03 % respecto a la M2 (p < 0,0001), y en GLI 2 %, 2,4-D 0,12 %, CAP 0,03 % e IMI 0,2 % en relación con M3 (p < 0,0001; Figura 26-G).

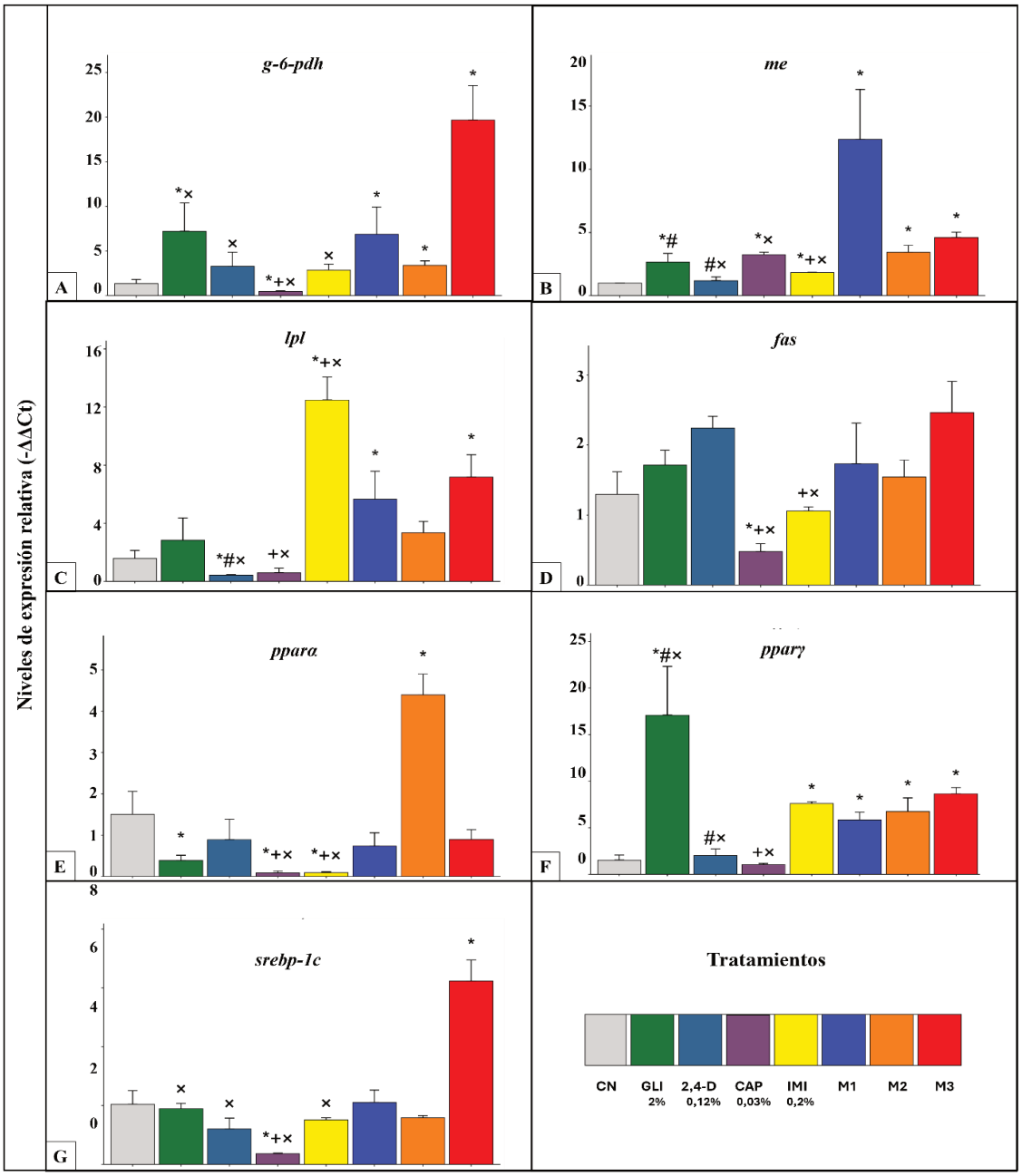

Figura 26. Expresión relativa (media ± EE) en hígado de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022.

g-6-pdh (deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato-A), me (enzima málica-B), lpl (lipoproteína lipasa-C), fas (ácido graso sintasa-D), pparα (receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa-E), pparγ (receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma-F) y srebp-1c (proteína de unión al elemento regulador de esterol-1c-G) Tratamientos: CN (control negativo); GLI 2 % (formulación de glifosato al 2 %); 2,4-D 0,12 % (formulación de 2,4-D al 0,12 %); CAP 0,03 % (formulación de clorantraniliprole al 0,03 %); IMI 0,2 % (formulación de imidacloprid al 0,2 %); M1 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 %); M2 (mezcla compuesta por CAP 0,015 % + IMI 0,1 %); M3 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). Diferencias significativas $p < 0,05$: respecto a CN (*); respecto a la M2 (+) y respecto a la M3 (×).

3.1.1.3.3.3. Expresión génica en sangre de neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas

En sangre de neonatos de *C. latirostris* expuestos *in ovo* (T2022), la expresión relativa del gen *g-6-pdh* difirió significativamente entre los tratamientos evaluados ($\chi^2 = 132{,}044$; $p < 0{,}0001$). Los resultados indicaron niveles de expresión significativamente mayores en los tratamientos IMI 0,2 %, M2 y M3 en comparación con el grupo CN ($p = 0{,}0050$, $p < 0{,}0001$ y $p = 0{,}0067$, respectivamente; Figura 27-A). En cuanto a las mezclas, la expresión fue significativamente menor en CAP 0,03 % e IMI 0,2 % frente a M2 ($p < 0{,}0001$), de manera similar, los tratamientos GLI 2 %, 2,4-D 0,12 % y CAP 0,03 % presentaron valores significativamente inferiores a los de M3 ($p < 0, 0001$; Figura 27-A).

Se detectaron diferencias significativas en la expresión relativa del gen *me* en sangre entre los tratamientos evaluados ($\chi^2 = 201{,}189$; $p = 0{,}0245$). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con los agroquímicos evaluados y el grupo CN ($p > 0{,}05$; Figura 27-B). Sin embargo, en relación con las mezclas, se observó un mayor nivel de expresión relativa del gen *me* en sangre tras la exposición a 2,4-D al 0,12 %, en comparación con la mezcla M1 ($p = 0{,}0205$; Figura 27-B).

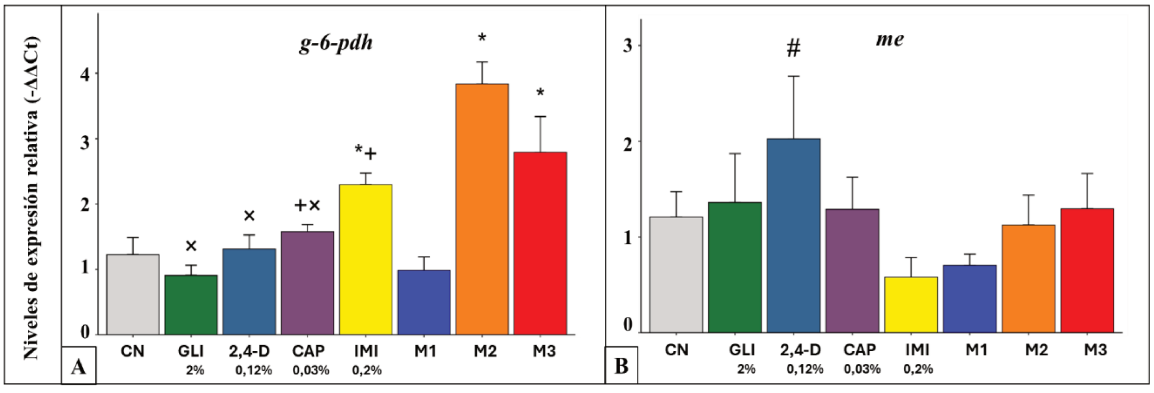

Figura 27. Expresión relativa (media ± EE) de los genes *g-6-pdh* (*deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato*-A) y *me* (*enzima málica*-B) en sangre de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022.

Tratamientos: CN (control negativo); GLI 2 % (formulación de glifosato al 2 %); 2,4-D 0,12 % (formulación de 2,4-D al 0,12 %); CAP 0,03 % (formulación de clorantraniliprole al 0,03 %); IMI 0,2 % (formulación de imidacloprid al 0,2 %); M1 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 %); M2 (mezcla compuesta por CAP 0,015 % + IMI 0,1 %); M3 (mezcla compuesta por GLI

1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). Diferencias significativas $p < 0,05$: respecto a CN (*); respecto a la M2 (+) y respecto a la M3 (×).

3.1.1.3.4. Determinación de corticosterona plasmática en neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos

El análisis evidenció diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de corticosterona entre los tratamientos evaluados ($\chi^2 = 17,926$; $p = 0,0125$). En particular, se registró un aumento significativo en el tratamiento 2,4-D 0,12 %, frente al grupo CN ($p = 0,0039$) y en comparación con la mezcla M3, que también contiene 2,4-D 0,12 % ($p = 0,0280$; Figura 28).

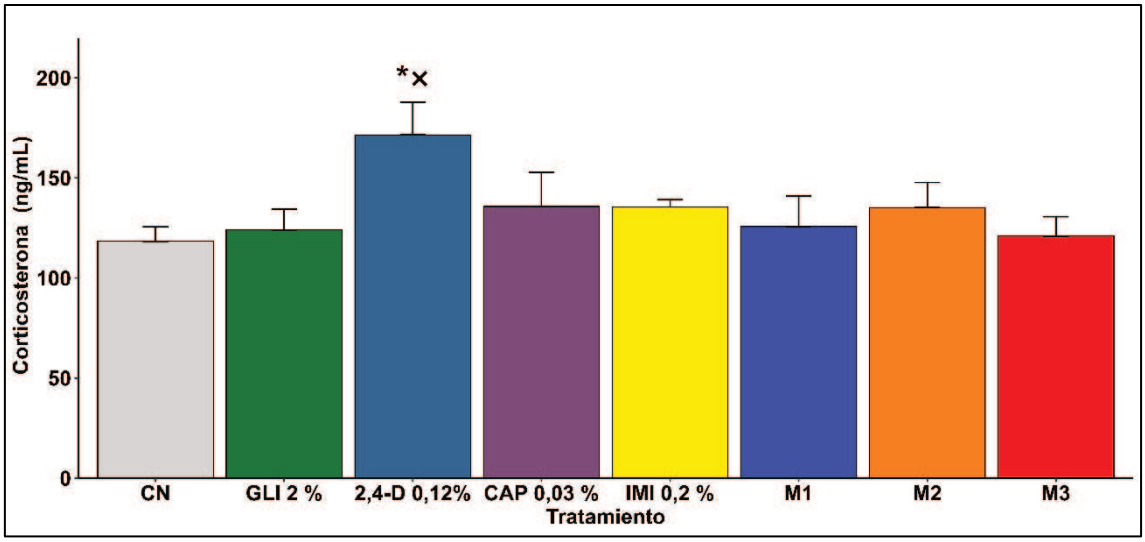

Figura 28. Concentración de corticosterona plasmática (ng/mL; media ± EE) de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022.

Tratamientos: CN (control negativo); GLI 2 % (formulación de glifosato al 2 %); 2,4-D 0,12 % (formulación de 2,4-D al 0,12 %); CAP 0,03 % (formulación de clorantraniliprole al 0,03 %); IMI 0,2 % (formulación de imidacloprid al 0,2 %); M1 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 %); M2 (mezcla compuesta por CAP 0,015 % + IMI 0,1 %); M3 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). Diferencias significativas $p < 0,05$: respecto a CN (*) y respecto a la M3 (×).

3.1.1.3.5. Peroxidación lipídica en neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos (OE3)

El análisis reveló diferencias significativas en los niveles de lipoperoxidación entre los tratamientos evaluados (χ^2 = 57,899; p < 0,0001). Los resultados indicaron que, en comparación con el grupo CN, los niveles de TBARs (nmol/g de PT) fueron significativamente mayores en los tratamientos con GLI al 1 y 2 %, 2,4-D al 0,12 %, CAP al 0,015 y 0,03 %, IMI al 0,1 y 0,2 %, así como en los tratamientos M1 y M3 (p = 0,0064, p = 0,0011, p = 0,0001, p = 0,0003, p < 0,0001, p = 0,0022, p = 0,0029, p < 0,0001 y p = 0,0001, respectivamente). En cuanto a las mezclas, se observó un incremento significativo en los niveles de TBARs en los tratamientos con CAP al 0,015 y 0,03 % en comparación con la mezcla M2 (p = 0,0064 y p = 0,0003, respectivamente; Figura 29).

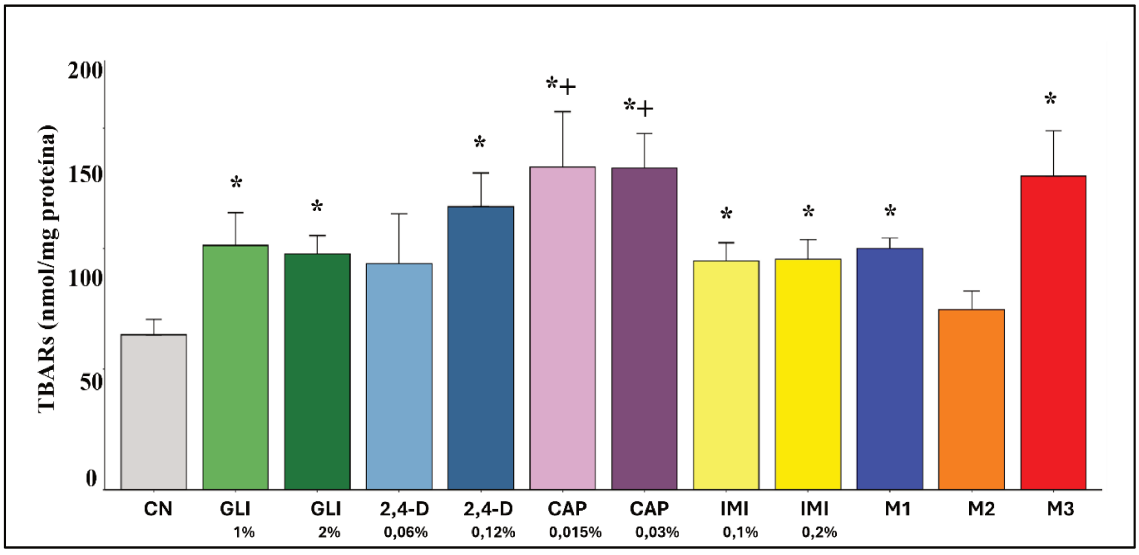

Figura 29. Niveles de TBARS (nmol/mg de proteína; media ± EE) en neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022.

Tratamientos tales: CN (control negativo); GLI 1 % (formulación de glifosato al 1 %); GLI 2 % (formulación de glifosato al 2 %); 2,4-D 0,06 % (formulación de 2,4-D al 0,06 %); 2,4-D 0,12 % (formulación de 2,4-D al 0,12 %); CAP 0,015 % (formulación de clorantraniliprole al 0,015 %); CAP 0,03 % (formulación de clorantraniliprole al 0,03 %); IMI 0,1 % (formulación de imidacloprid al 0,1 %); IMI 0,2 % (formulación de imidacloprid al 0,2 %); M1 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 %); M2 (mezcla compuesta por CAP 0,015 % + IMI 0,1 %); M3 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). Diferencias significativas p < 0,05: respecto a CN (*); respecto a la M1 (#) y respecto a la M2 (+)

3.1.1.3.6. Determinación del perfil lipídico basal en yema de huevo de *C. latirostris* (OE1)

Debido a la ausencia de datos previos sobre determinaciones de AG en yema de esta especie, era necesario establecer criterios de toma y preparación de muestra previos al análisis de las muestras de los grupos experimentales y las provenientes de neonatos de ambientes naturales. Por restricciones éticas (permisos solicitados para el sacrificio), se obtuvieron perfiles lipídicos en yema de un embrión de cada uno de tres nidos provenientes de la zona no expuesta descripta en la sección de materiales y métodos (**2.3.1**.), los cuales presentaron diferentes estadios del desarrollo: 22 (33 días de incubación), 23 (39 días de incubación) y 24 (48-51 días de incubación), con tres réplicas técnicas por individuo.

Si bien los datos no permiten un análisis inferencial robusto, se presentan como resultados que aportan información descriptiva sobre los cambios metabólicos a lo largo del desarrollo embrionario en *C. latirostris.*

Los valores del perfil de AG se encuentran detallados en la Tabla 14. Se realizó un análisis descriptivo mediante una representación gráfica de barras apiladas que incluyó las proporciones relativas de ácidos grasos saturados (AGS; Figura 30-A), monoinsaturados (AGMI; Figura 30-B) y poliinsaturados (AGPI; Figura 30-C).

Entre los AGS, se observaron variaciones en las proporciones de C14:0, C15:0 ISO, C15:0, C16:0, C17:0 ISO, C17:0 ANTEISO y C18:0 a lo largo de los estadios de desarrollo, destacándose una disminución progresiva en los valores de C14:0, C15:0 ISO, C15:0, C17:0 ISO y C17:0 ANTEISO desde el estadio 22 al 24, mientras que el C18:0 mostró un incremento en el estadio 24 respecto a los estadios anteriores; por el contrario, el C16:0 evidenció un ligero aumento en el estadio 23 seguido de una disminución en el estadio 24 (Figura 30-A).

El análisis de los AGMI reveló variaciones a lo largo de los estadios de desarrollo. Se registró una disminución progresiva en la proporción de 9c-16:1, 9c-17:1 y 10c-17:1 desde el estadio 22 al 24. En contraste, el 9c-18:1 presentó un aumento sostenido a lo largo de los estadios, siendo el componente de mayor proporción y alcanzando su valor

más alto en el estadio 24. Los AG 5c-20:1, 11c-20:1 y 15c-24:1 se mantuvieron relativamente estables entre los estadios analizados, sin evidenciar cambios notorios (Figura 30-B).

En el perfil de AGPI, se observó una disminución sostenida en las proporciones de 11c,14c,17c-20:3 (n-3), 11c,14c-20:2 (n-6) y 8c,11c,14c-20:3 (n-6) desde el estadio 22 hasta el 24. Por el contrario, el ácido graso 9c,12c-18:2 (n-6) presentó un aumento progresivo a lo largo de los estadios analizados (30-C).

Tabla 14. Perfil de ácidos grasos (media ± EE) en diferentes estadios del desarrollo embrionario de *Caiman latirostris.*

Tipo de ácido graso	Estadio del desarrollo		
	22 (33 di)	**23 (39 di)**	**24 (48-51 di)**
Saturado			
C 14:0	0,86 ± 0,02	0,93 ± 0,02	0,67 ± 0,01
C 15:0 ISO	0,26 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,09 ± 0,01
C 15:0	0,54 ± 0,01	0,44 ± 0,03	0,40 ± 0,00
C 16:0	25,74 ± 0,06	26,63 ± 0,12	24,02 ± 0,03
C17:0 ISO	1,50 ± 0,01	0,83 ± 0,01	0,79 ± 0,01
C17:0 ANTEISO	0,25 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,1 ± 0,01
C 17:0	1,19 ± 0,02	0,90 ± 0,04	0,96 ± 0,01
C 18:0	6,16 ± 0,07	6,03 ± 0,04	7,25 ± 0,05
C 20:0	0,20 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,22 ± 0,01
Insaturado			
Monoinsaturado			
9c-16:1	8,87 ± 0,14	7,16 ± 0,05	4,82 ± 0,04
9c-17:1	1,14 ± 0,02	0,87 ± 0,04	0,75 ± 0,01
10c-17:1	0,20 ± 0,00	0,19 ± 0,03	0,16 ± 0,01
9c-18:1	24,60 ± 0,17	29,24 ± 0,19	31,84 ± 0,02
11c-18:1	9,50 ± 0,15	6,61 ± 0,05	7,33 ± 0,05
5c-20:1	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01
11c-20:1	0,81 ± 0,04	0,89 ± 0,02	0,81 ± 0,01
15c-24:1	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Poliinsaturado			

9c,12c,15c-18:3 (n-3)	4,51 ± 0,08	5,05 ± 0,05	3,92 ± 0,04
11c,14c,17c-20:3 (n-3)	0,20 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,13 ± 0,00
5c,8c,11c,14c,17c-20:5 EPA (n-3)	1,11 ± 0,04	1,21 ± 0,01	0,87 ± 0,00
7c,10c,13c,16c,19c-22:5 (n-3)	0,56 ± 0,04	0,67 ± 0,02	0,45 ± 0,01
4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6 DHA (n-3)	1,74 ± 0,04	1,83 ± 0,03	1,41 ± 0,01
9c,12c-18:2 (n-6)	5,98 ± 0,04	6,30 ± 0,01	9,39 ± 0,01
11c,14c-20:2 (n-6)	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,12 ± 0,01
8c,11c,14c-20:3 (n-6)	0,43 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,31 ± 0,01
5c,8c,11c,14c-20:4 (n-6) AA	2,64 ± 0,02	2,16 ± 0,01	2,27 ± 0,02
7c,10c,13c,16c-22:4 (n-6)	0,22 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,21 ± 0,02
4c,7c,10c,13c,16c-22:5 (n-6)	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,14 ± 0,01

di: días de incubación. N-3 y n-6 son ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) omega-3 y omega-6, respectivamente.

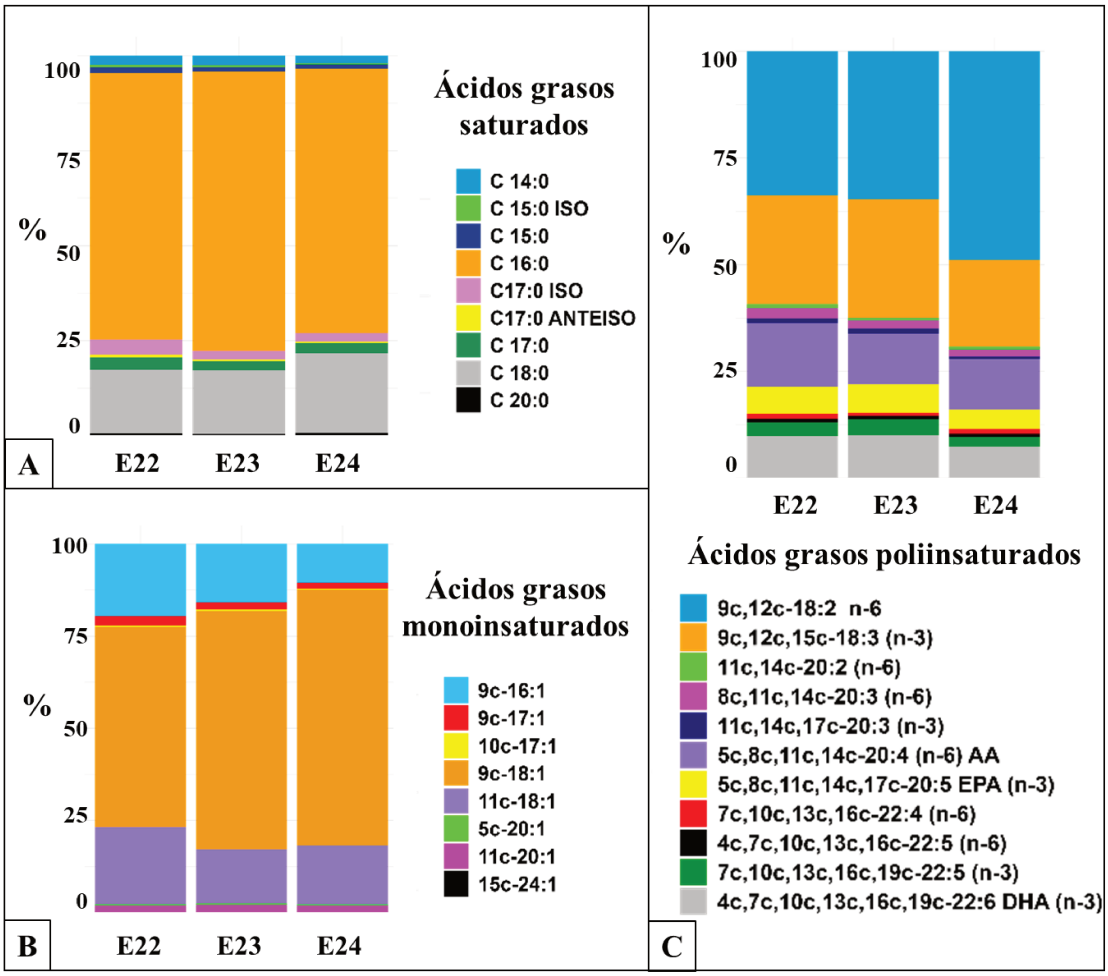

Figura 30. Distribución porcentual de ácidos grasos saturados (A), monoinsaturados (B) y poliinsaturados (C) basales en yemas de *Caiman latirostris* en distintos estadios (E) del desarrollo embrionario.

E22: 33 días de incubación; E23: 39 días de incubación; E24: 48-51 días de incubación.

3.1.1.3.6.1. Determinación del perfil de ácidos grasos, tocoferoles y colesterol de yema residual de *C. latirostris* luego de la exposición *in ovo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas

Los resultados del perfil de ácidos grasos en yema residual de *C. latirostris* luego de la exposición durante el desarrollo embrionario en la T2022 se encuentran detallados en la Tabla 15.

Los resultados obtenidos muestran un nivel significativamente mayor en el AGS C17:0 ANTEISO en GLI 2 % comparado con la M1 (χ^2 = 70,309; p = 0,0008; Tabla 15). Se

observó un nivel significativamente mayor en el AGS C 18:0 en GLI 2 % comparado a la M3 (χ^2 = 30,697; p = 0,0327; Tabla 15).

Se observaron valores significativamente menores en el AGPI 9c,12c-18:2 (n-6) en la M1 comparado con el grupo CN (χ^2 = 33,432; p = 0,0409); mientras que para esta misma variable se observaron niveles significativamente mayores en el tratamiento 2,4-D 0,12 % comparado con la M1 (p = 0,0418; Tabla 15). De manera similar, se registró un nivel estadísticamente menor en el AGPI 5c,8c,11c,14c,17c-20:5 EPA (n-3) en el tratamiento CAP 0,03 % comparado con el grupo CN (χ^2 = 36,5414; p = 0,0002); mientras que para este mismo AG se observó una mayor concentración en la M2 comparado con el grupo CN (p = 0,0049). Para el AGPI 7c,10c,13c,16c,19c-22:5 (n-3) se observaron niveles significativamente mayores en los tratamientos M1 y M2 respecto al grupo CN (χ^2 = 39,360; p < 0,001). De manera similar, se observó una mayor concentración del AG 4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6 DHA (n-3) en la M1 comparado con el CN (χ^2 = 20,826; p = 0,0002).

Los resultados mostraron niveles de AGPI 11c,14c-20:2 (n-6) significativamente mayor en el tratamiento GLI 2 % comparado con la M3 (χ^2 = 30,018; p = 0,0181). De manera similar, se observó una mayor concentración de AG 5c,8c,11c,14c-20:4 (n-6) AA en el tratamiento GLI 2 % comparado con el grupo control CN (χ^2 = 33,097; p = 0,0054; Tabla 15).

En cuanto a los diferentes tipos de AG, las mayores variaciones entre los tratamientos evaluados en este trabajo se observaron en los ácidos grasos poliinsaturados AGPI (Figura 31-C).

Tabla 15. Perfil de ácidos grasos (media ± EE) en yema residual de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición embrionaria a diferentes formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022.

Tipo de AG	Tratamiento							
	CN	**GLI 2 %**	**2,4-D 0,12 %**	**CAP 0,03 %**	**IMI 0,2 %**	**M1**	**M2**	**M3**
Saturado								
C 14:0	0,80 ± 0,09	0,69 ± 0,12	0,74 ± 0,09	0,83 ± 0,08	0,86 ± 0,05	0,78 ± 0,03	0,73 ± 0,08	0,85 ± 0,05
C 15:0	0,56 ± 0,07	0,46 ± 0,04	0,50 ± 0,05	0,49 ± 0,06	0,57 ± 0,01	0,51 ± 0,05	0,47 ± 0,06	0,54 ± 0,01
C 16:0	23,73 ± 0,76	21,42 ± 0,79	23,16 ± 0,63	23,40 ± 0,51	23,68 ± 0,58	22,56 ± 0,70	23,36 ± 0,63	23,36 ± 0,24
C17:0 ISO	0,92 ± 0,08	1,08 ± 0,10	0,92 ± 0,08	0,94 ± 0,09	1,03 ± 0,07	0,96 ± 0,04	0,94 ± 0,05	1,03 ± 0,07
C17:0 ANTEISO	0,18 ± 0,04	**0,26 ± 0,03**$^{\#}$	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,23 ± 0,04	0,21 ± 0,02
C 17:0	0,99 ± 0,04	1,09 ± 0,10	0,97 ± 0,02	0,99 ± 0,02	1,00 ± 0,02	0,97 ± 0,01	0,93 ± 0,03	0,97 ± 0,05
C 18:0	7,08 ± 0,35	**7,29 ± 0,10**$^{\times}$	7,33 ± 0,21	7,03 ± 0,43	6,76 ± 0,08	7,33 ± 0,37	7,17 ± 0,38	6,87 ± 0,14
20:0	0,29 ± 0,03	0,26 ± 0,04	0,25 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,28 ± 0,03	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,01
Insaturado								
Monoinsaturado								

9c-16:1	5,30 ± 0,47	4,82 ± 0,97	4,99 ± 0,43	5,29 ± 0,36	5,63 ± 0,50	5,48 ± 0,43	5,25 ± 0,49	5,63 ± 0,47
9c-17:1	0,68 ± 0,03	0,61 ± 0,13	0,69 ± 0,05	0,74 ± 0,04	0,72 ± 0,02	0,77 ± 0,10	0,68 ± 0,03	0,77 ± 0,09
10c-17:1	0,14 ± 0,05	0,45 ± 0,27	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,16 ± 0,03
9c-18:1	30,55 ± 0,25	32,97 ± 1,59	30,99 ± 0,23	31,35 ± 1,44	31,89 ± 1,16	32,33 ± 0,96	30,86 ± 0,18	32,10 ± 0,68
11c-18:1	7,99 ± 0,53	8,18 ± 0,47	7,78 ± 0,42	7,67 ± 0,18	8,17 ± 0,54	8,56 ± 0,31	7,63 ± 0,43	7,93 ± 0,50
5c-20:1	0,22 ± 0,03	0,15 ± 0,07	0,19 ± 0,02	0,16 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,01
11c-20:1	1,08 ± 0,16	1,19 ± 0,44	1,11 ± 0,19	0,91 ± 0,15	1,13 ± 0,11	1,43 ± 0,36	1,06 ± 0,16	1,12 ± 0,11
Poliinsaturado								
9c,12c,15c-18:3 (n-3)	3,58 ± 0,34	2,82 ± 0,44	3,35 ± 0,42	3,57 ± 0,44	3,06 ± 0,23	2,91 ± 0,18	3,46 ± 0,30	3,00 ± 0,10
11c,14c,17c-20:3 (n-3)	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,00	0,20 ± 0,04	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,02
5c,8c,11c,14c,17c-20:5 EPA (n-3)	0,82 ± 0,01	0,99 ± 0,30	0,94 ± 0,06	**0,87 ± 0,01***	0,84 ± 0,04	1,06 ± 0,15	**0,95 ± 0,05***	0,93 ± 0,07
7c,10c,13c,16c,19c-22:5 (n-3)	0,50 ± 0,01	0,58 ± 0,07	0,56 ± 0,05	0,57 ± 0,04	0,57 ± 0,04	**0,62 ± 0,03***	**0,56 ± 0,02***	0,57 ± 0,04
4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6 DHA (n-3)	1,44 ± 0,10	1,83 ± 0,20	1,71 ± 0,22	1,66 ± 0,23	1,70 ± 0,22	**2,04 ± 0,12***	1,71 ± 0,17	1,88 ± 0,30
9c,12c-18:2 (n-6)	9,16 ± 1,28	7,89 ± 1,58	**9,04 ± 1,30**$^{\#}$	8,94 ± 1,41	7,59 ± 1,15	**6,32 ± 0,17***	9,04 ± 1,30	7,53 ± 1,19

11c,14c-20:2 (n-6)	0,18 ± 0,03	**0,21 ± 0,01**$^{\times}$	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,00	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,15 ± 0,02
8c,11c,14c-20:3 (n-6)	0,38 ± 0,03	0,48 ± 0,06	0,42 ± 0,03	0,36 ± 0,02	0,41 ± 0,03	0,46 ± 0,07	0,38 ± 0,00	0,38 ± 0,02
5c,8c,11c,14c-20:4 (n-6) AA	2,71 ± 0,21	**3,50 ± 0,15***	3,13 ± 0,12	2,89 ± 0,06	2,69 ± 0,19	3,22 ± 0,25	3,09 ± 0,19	2,92 ± 0,27
7c,10c,13c,16c-22:4 (n-6)	0,18 ± 0,02	0,30 ± 0,07	0,22 ± 0,01	0,16 ± 0,04	0,20 ± 0,04	0,21 ± 0,05	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,03

AG: ácido graso. Tratamientos: CN (control negativo); GLI 2 % (formulación de glifosato al 2 %); 2,4-D 0,12 % (formulación de 2,4-D al 0,12 %); CAP 0,03 % (formulación de clorantraniliprole al 0,03 %); IMI 0,2 % (formulación de imidacloprid al 0,2 %); M1 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 %); M2 (mezcla compuesta por CAP 0,015 % + IMI 0,1 %); M3 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). Diferencias significativas $p < 0,05$: respecto a CN (*); respecto a la M1 (#); respecto a la M2 (+) y respecto a la M3 (×).

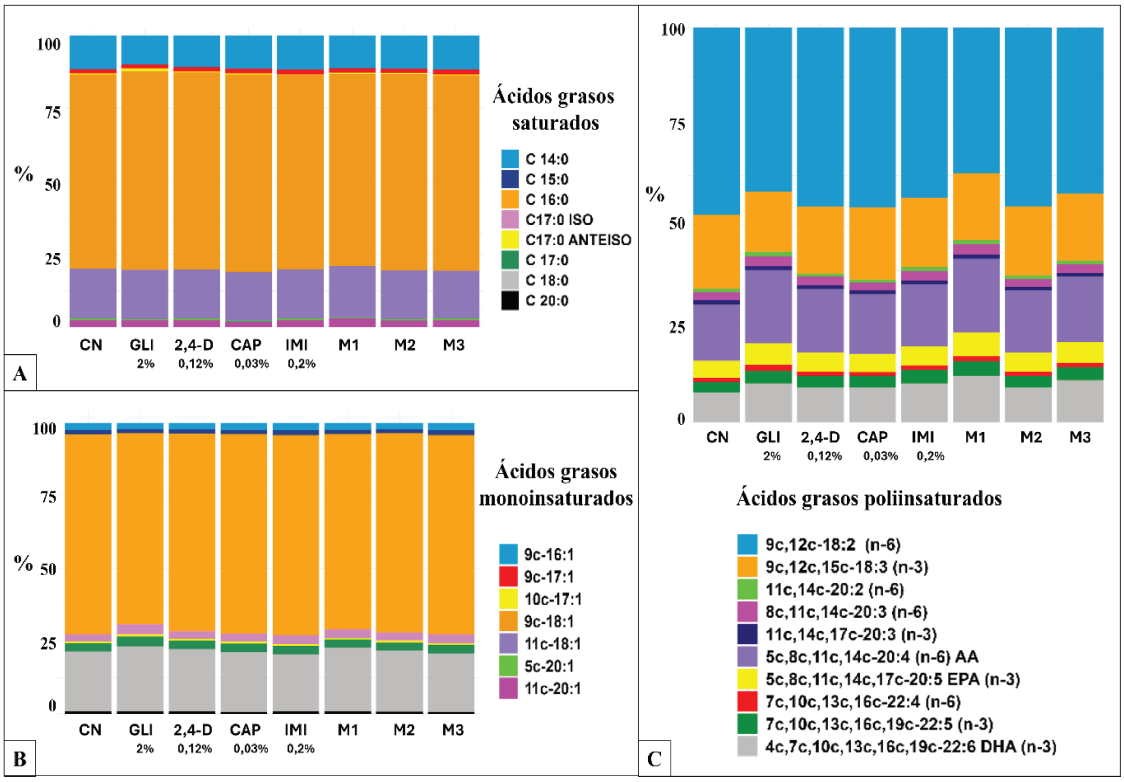

Figura 31. Distribución porcentual de ácidos grasos saturados (A), monoinsaturados (B) y poliinsaturados (C) en yema de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022.

Tratamientos: CN (control negativo); GLI 1 % (formulación de glifosato al 1 %); GLI 2 % (formulación de glifosato al 2 %); 2,4-D 0,06 % (formulación de 2,4-D al 0,06 %); 2,4-D 0,12 % (formulación de 2,4-D al 0,12 %); CAP 0,015 % (formulación de clorantraniliprole al 0,015 %); CAP 0,03 % (formulación de clorantraniliprole al 0,03 %); IMI 0,1 % (formulación de imidacloprid al 0,1 %); IMI 0,2 % (formulación de imidacloprid al 0,2 %); M1 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 %); M2 (mezcla compuesta por CAP 0,015 % + IMI 0,1 %); M3 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %).

El análisis evidenció un efecto significativo del tratamiento sobre la concentración de colesterol en la yema residual de neonatos de *C. latirostris* (χ^2 = 20,742; p = 0,0041). En el tratamiento con CAP al 0,03 %, la concentración fue significativamente menor en comparación con el grupo CN (p = 0,0071). De manera similar, este tratamiento presentó valores significativamente inferiores a los observados en las mezclas M2 y M3, de quienes formaba parte (p = 0,0458 y p = 0, 0156, respectivamente; Figura 32).

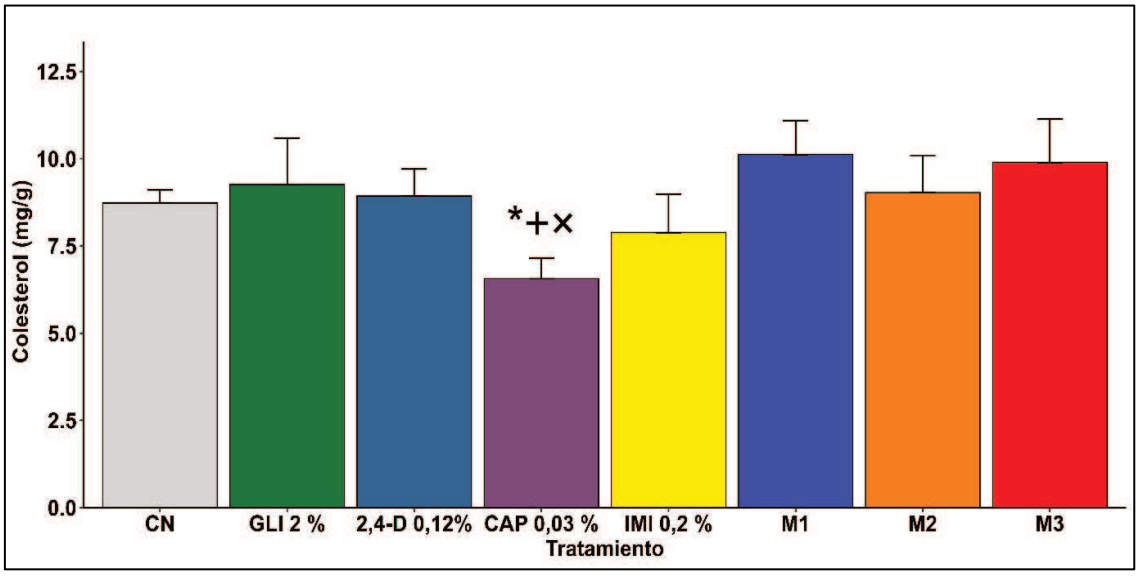

Figura 32. Concentración de colesterol en yema residual (mg/g; media ± EE) de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022.

Tratamientos: CN (control negativo); GLI 2 % (formulación de glifosato al 2 %); 2,4-D 0,12 % (formulación de 2,4-D al 0,12 %); CAP 0,03 % (formulación de clorantraniliprole al 0,03 %); IMI 0,2 % (formulación de imidacloprid al 0,2 %); M1 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 %); M2 (mezcla compuesta por CAP 0,015 % + IMI 0,1 %); M3 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). Diferencias significativas p < 0,05: respecto a CN (*); respecto a la M1 (#); respecto a la M2 (+) y respecto a la M3 (×).

El análisis reveló diferencias significativas en los niveles de tocoferoles entre los tratamientos evaluados (χ^2 = 14,816; p = 0,0348). El tratamiento M3 presentó valores significativamente menores en comparación con el grupo CN (p = 0,0354; Figura 33).

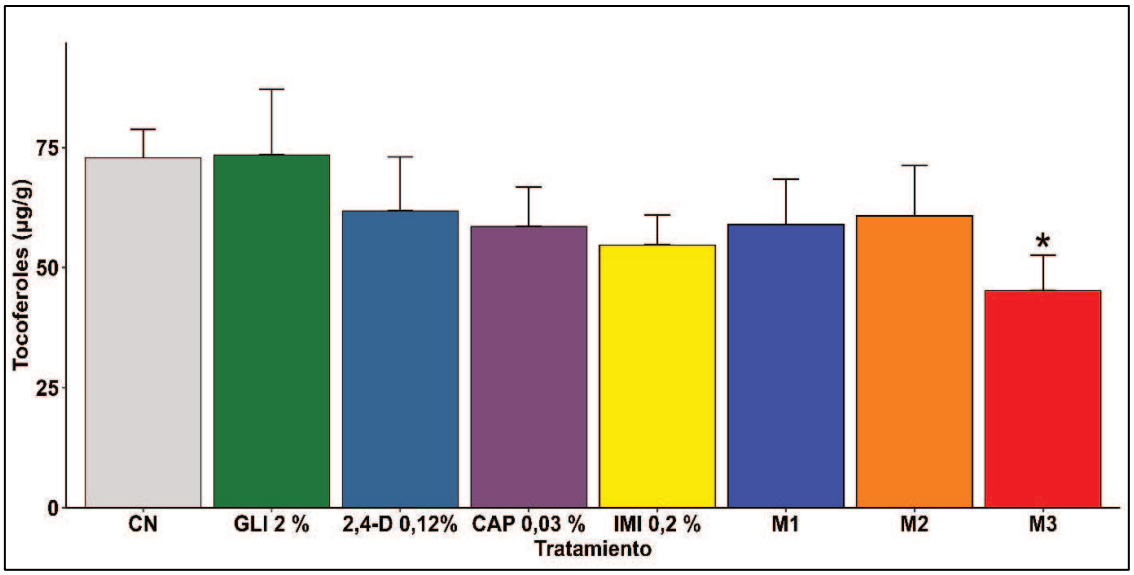

Figura 33. Concentración de tocoferoles (µg/g; media ± EE) de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022.

Tratamientos: CN (control negativo); GLI 2 % (formulación de glifosato al 2 %); 2,4-D 0,12 % (formulación de 2,4-D al 0,12 %); CAP 0,03 % (formulación de clorantraniliprole al 0,03 %); IMI 0,2 % (formulación de imidacloprid al 0,2 %); M1 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 %); M2 (mezcla compuesta por CAP 0,015 % + IMI 0,1 %); M3 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). Diferencias significativas $p < 0,05$: respecto a CN (*).

3.1.1.3.7. Histología de hígado, gónadas e intestino en la temporada 2022 (OE4)

3.1.1.3.7.1. Caracterización histológica del tejido hepático en neonatos de *C. latirostris*

El hígado está envuelto por una cápsula de tejido conectivo fibroso, definida como la cápsula de Glisson. Esta cápsula cuenta con una única capa exterior de células mesoteliales (células epiteliales planas) que cubren una capa de fibras compuestas principalmente por colágeno y se observan teñidas de color rosa debido al proceso de la tinción mediante Hematoxilina y Eosina (H-E) realizada (Figura 34). Las fibras pueden extenderse desde la cápsula al parénquima entre los hepatocitos y se muestran con diferentes longitudes de ancho y largo entre los diferentes tratamientos, tanto en la cápsula de Glisson como dentro del parénquima. En los grupos expuestos, estas fibras suelen disponerse dentro del parénquima sin un patrón en particular. La cápsula está en contacto directo con las estructuras parenquimatosas.

Organización del parénquima: la célula principal del hígado es el hepatocito. No obstante, no se observa la compartimentación característica en lóbulos portales o acinos hepáticos, una diferenciación histológica marcada respecto a la organización parenquimática de los mamíferos (van Wilpe., 2012). Asimismo, no se observa una disposición ordenada de las venas centrales y los tractos porta se encuentran rodeados de hepatocitos (Figura 34).

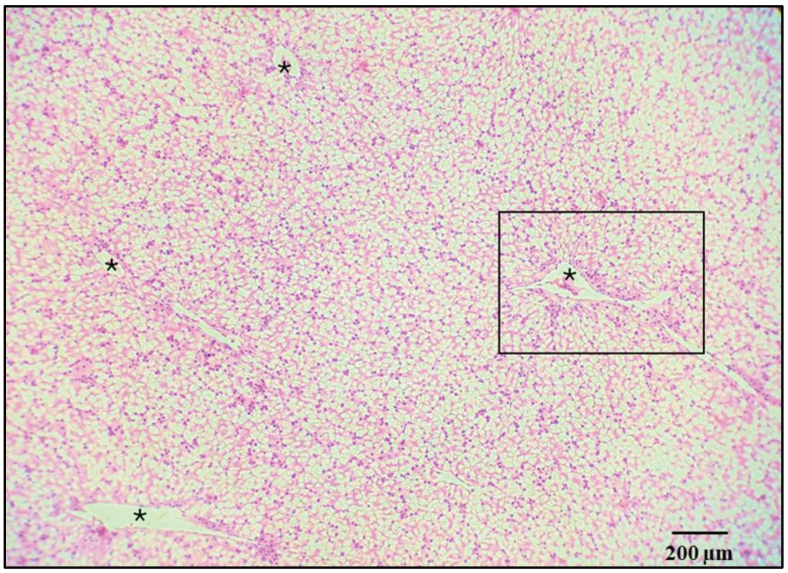

Figura 34. Micrografía de Hígado. Venas centrales sin una organización definida (asterisco negro); tractos porta rodeados por hepatocitos (cuadro negro). H-E; 10X.

El parénquima hepático se organiza en cordones celulares anastomosados y ramificados (Figura 35; cuadro negro). Los hepatocitos presentan forma piramidal en cortes transversales (cuadro rojo) y cúbicos en corte longitudinal (cuadro rojo con líneas entre cortadas). Se observan con membrana celular definida y citoplasma amplio; algunas zonas periféricas son eosinofílicas, con depósito de glucógeno (Figura 35). Predominan un citoplasma blanco debido a un alto grado de vacuolización lipídica, originado por la disolución de lípidos durante el procesamiento histológico en parafina. La cuantificación de vacuolas lipídicas en las diferentes muestras analizadas varió en función de los tratamientos. Los hepatocitos conservan los dos núcleos característicos del tejido hepático teñidos de azul (van Wilpe., 2012), sin embargo, estos se observan excéntricos en la porción basal de la célula más cercana a las sinusoides (Figura 35).

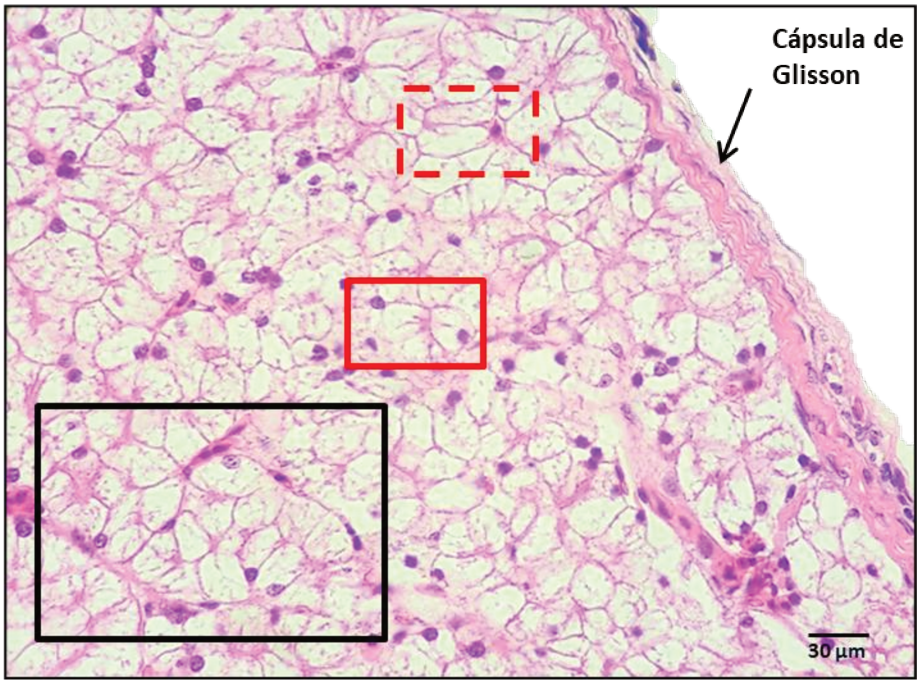

Figura 35. Micrografía de hígado. Cápsula de Glisson (flecha negra); cordones celulares anastomosados y ramificados (cuadro negro); hepatocito en sección transversal (cuadro rojo); hepatocito en sección longitudinal (cuadro rojo con líneas entrecortadas). H-E; 40X.

Organización no parenquimatosa: las sinusoides hepáticas son espacios vasculares revestidos por un fino endotelio plano que se ubica entre las láminas de los hepatocitos (van Wilpe., 2012). En el hígado de neonatos del yacaré overo, estos espacios se distribuyen de manera irregular. Entre la pared sinusoidal y los hepatocitos, se observa el espacio perisinusoidal o espacio de Disse, responsable del intercambio de sustancias entre los hepatocitos y el plasma. Se identificaron células de Kupffer y células estrelladas dentro y alrededor de las sinusoides, evidenciadas mediante la tinción H-E. Además, en esta región, se visualizaron pequeñas cantidades de células sanguíneas y células del sistema inmune (Figura 36-A y B).

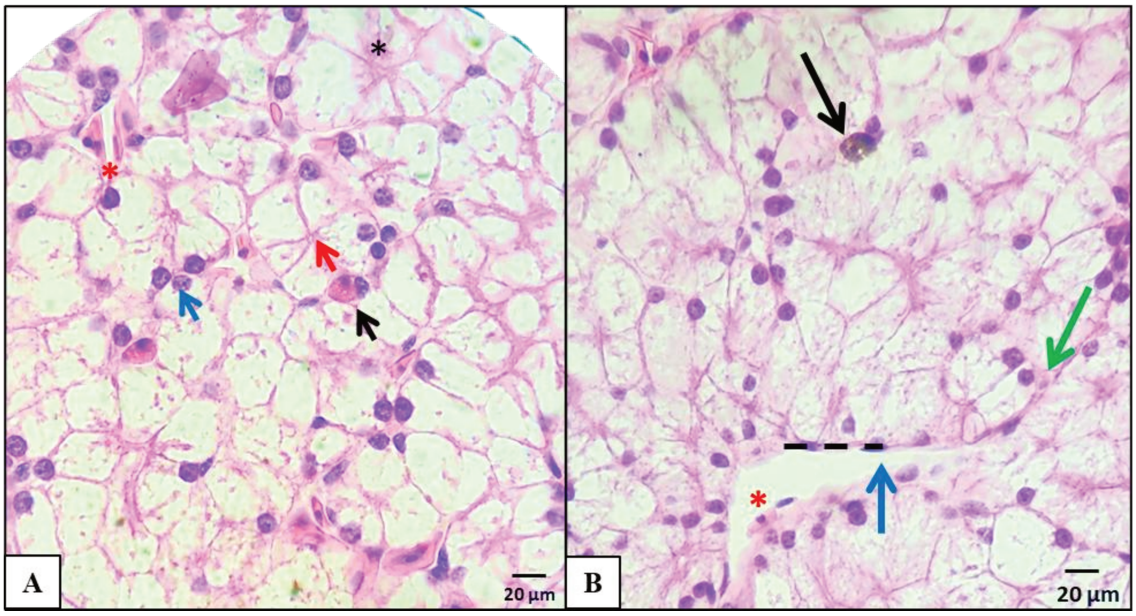

Figura 36. Micrografía de hígado. Población celular predominante.

A: Eosinófilos (flecha negra); núcleo de hepatocitos (flecha azul); canales biliares centrales (flecha roja); almacenamiento de glucógeno (asterisco negro); sinusoides con eritrocitos nucleados (asterisco rojo). Observe los núcleos excéntricos próximos a las sinusoides. B: Células de Kupffer (flecha negra); células endoteliales planas (flecha azul); células estrelladas (flecha verde); eritrocitos (asterisco rojo); Espacio de Disse (línea entrecortada negra). H-E; 60X.

Las células de Kupffer son macrófagos grandes pleomórficos que se observan adheridas al endotelio sinusoidal o sobresalir hacia la luz de las sinusoides. Tras la coloración con H-E, estas células exhibieron inclusiones granulares de tonalidad amarillo a marrón, compatibles con depósitos de melanina y hemosiderina.

Las células estrelladas se localizan en el espacio de Disse, en posición subendotelial.

En el parénquima hepático se identifican espacios porta, los cuales contienen vasos sanguíneos, vasos linfáticos y conductos biliares, todos ellos asociados a una red de tejido conectivo. Las tríadas portales se distribuyen de manera irregular y consisten en una arteria, una vena y un conducto biliar, rodeados por fibras de colágeno (Figura 37). Los vasos linfáticos pueden encontrarse próximos a estas estructuras. Los conductos biliares están revestidos por epitelio cúbico simple. En áreas de la vaina fibrosa se identificaron eritrocitos, linfocitos y otras células asociadas a la respuesta, constituyendo poblaciones celulares asociadas a la vigilancia inmunológica y a la respuesta inflamatoria local del tejido hepático.

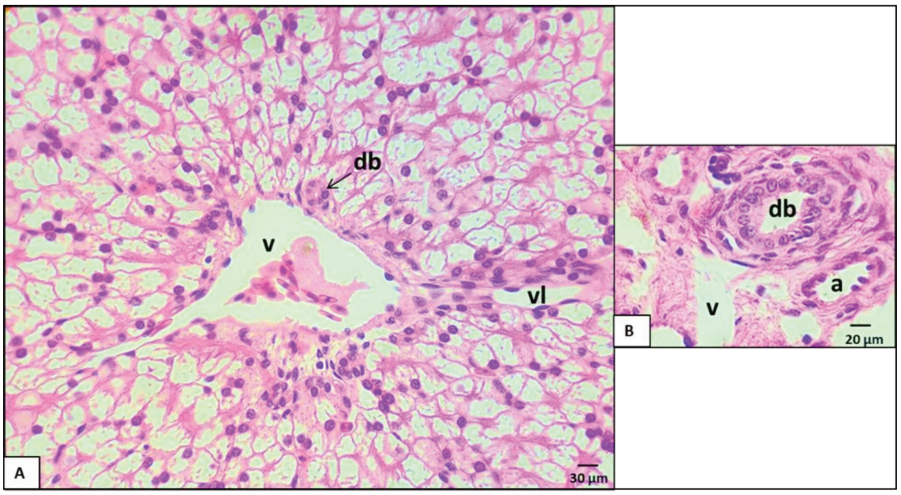

Figura 37. Micrografía de hígado. Triada portal. vena central (v); arteria (a); conducto biliar (bd) y vasos linfáticos (vl). H-E; 40X.

Evaluación de los cambios en la histoarquitectura y porcentaje de lípidos en tejido hepático de neonatos de *C. latirostris*

La degeneración vacuolar de hepatocitos (DV) fue una lesión presente en todos los grupos experimentales, con variaciones en su severidad (S), pero con una distribución predominantemente difusa en la mayoría de los individuos.

En el grupo CN, se observaron grados de DV que oscilaron entre leve (S = 1) y moderado (S = 2), con la mayoría de los individuos presentando distribución difusa. Se observó un parénquima de organización conservada, con una distribución normal de vena porta central (v), vasos linfáticos (vl), ductos biliares (db) y arteria (a; Figura 38-A). En el tratamiento con GLI 2%, la DV se manifestó principalmente con severidad moderada a severa (S = 2–3; Figura 38-B) y distribución difusa, registrándose además un foco de infiltrado mononuclear. En los individuos tratados con 2,4-D 12 %, CAP 0,03 % e IMI 2 %, la DV fue severa (S = 3) con distribución difusa. De manera similar, en los grupos expuestos a las mezclas (M1, M2 y M3), todos los individuos evaluados presentaron DV severa (S=3) y distribución difusa.

Se observaron irregularidades en la distribución de las venas porta centrales en individuos tratados con 2,4-D 0,12 % (Figura 38-C), en algunos casos, acompañadas por un marcado desarrollo de fibras de colágeno alrededor de los mismos, lo que ocasionó una obstrucción

parcial de los db y a (Figura 38-C y H). Además, se identificaron focos inflamatorios compuestos por numerosas células mononucleares y células plasmáticas rodeadas por abundante colágeno (Figura 38-D, E y F). Otras células del sistema inmune también estuvieron presentes con frecuencia, incluyendo basófilos, heterófilos, eosinófinilos, células estrelladas y células de Kupffer (Figura 38-F, G y H).

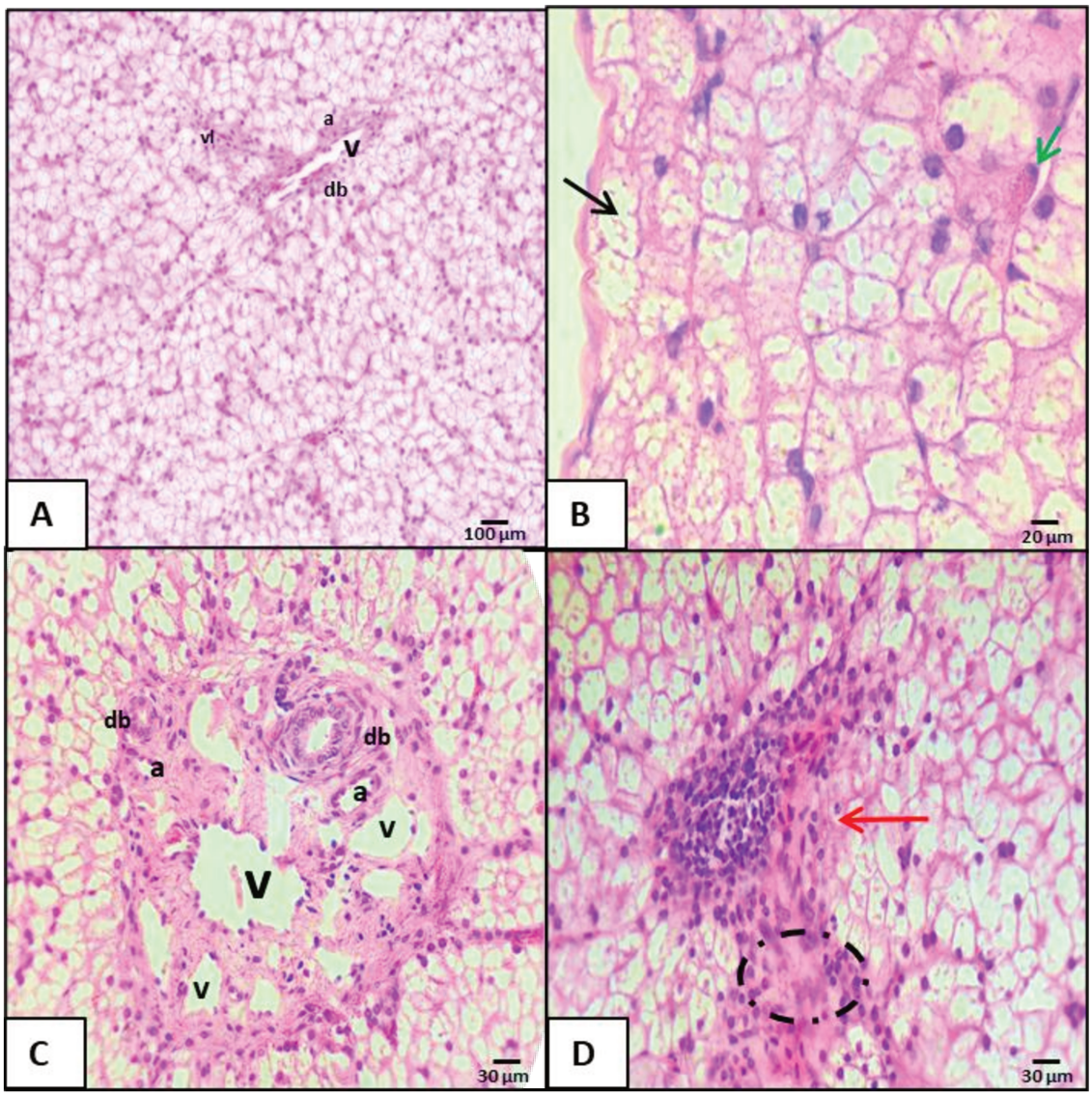

Figura 38. Micrografía de hígado de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición *in ovo* de distintas formulaciones de agroquímicos formulados y mezclas en la T2022.

A: control negativo, distribución normal de vena porta central (v), vasos linfáticos (vl), ductos biliares (db) y arteria (a). B: formulación de glifosato al 2 % (GLI 2 %): marcada presencia de vesículas lipídicas (flecha negra) y célula eosinófilo (flecha verde). C: formulación de 2,4-D al 0,12 %: distribución irregular y repetida de v, bd y a. D: formulación de clorantraniliprole (CAP

0,03 %): foco de linfocitos (flecha roja) rodeados de una marcada cantidad de colágeno (circulo punteado negro). H-E; 40X.

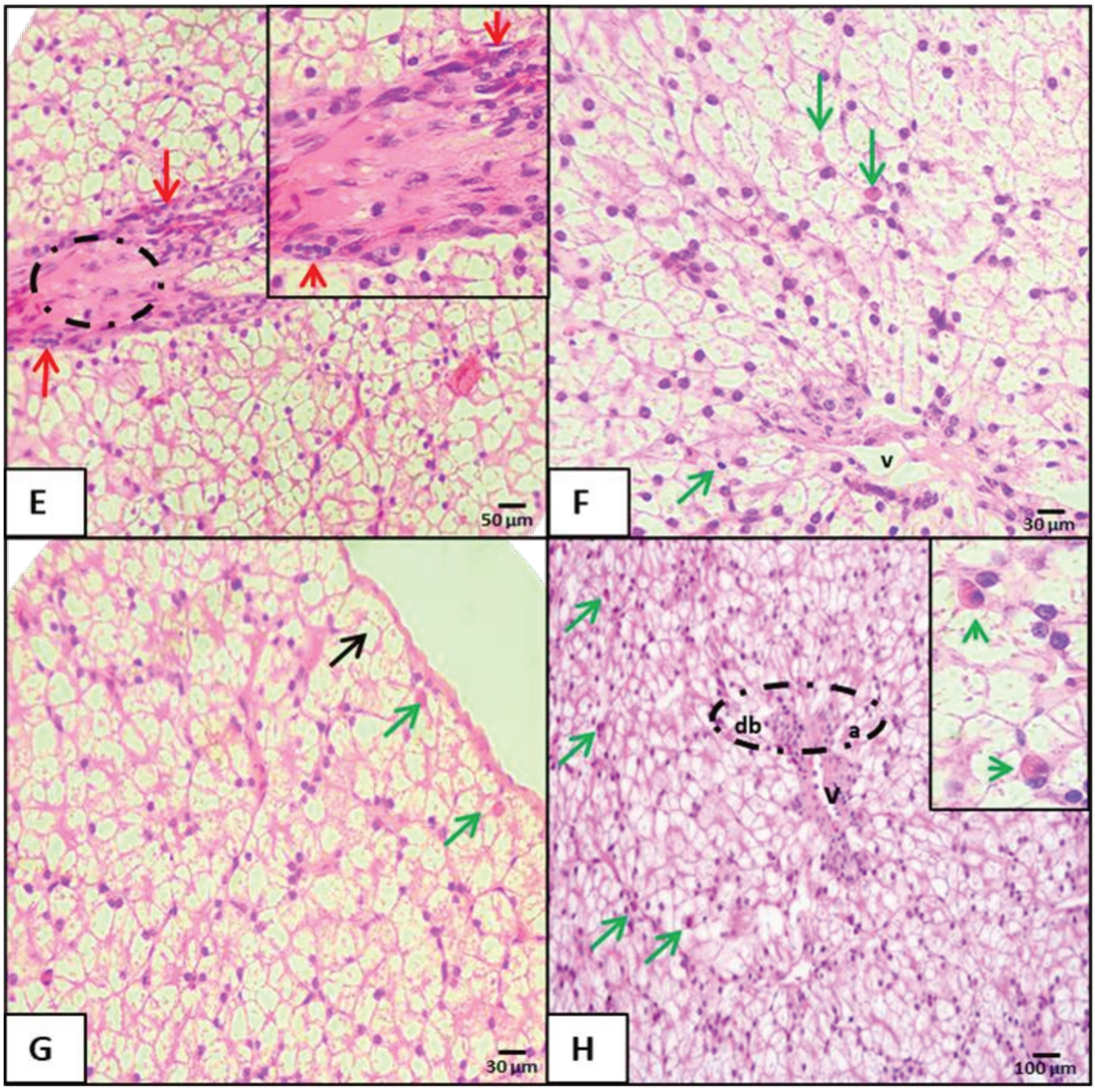

Figura 38. Micrografía de hígado de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición *in ovo* de distintas formulaciones de agroquímicos formulados y mezclas en la T2022.

E: formulación de imidacloprid (IMI 0,2 %): foco de linfocitos (flecha roja) rodeados de una marcada cantidad de colágeno (circulo punteado negro). F: M1 (GLI 1 % + 2,4-D 0,06 %) marcada presencia de células del sistema inmune, flecha verde superior indica célula estrellada, flecha del medio indica eosinófilo, flecha inferior indica linfocito. G: M2 (CAP 0,015 % + IMI 0,1 %) marcada cantidad de vesículas lipídicas (flecha negra) y células del sistema inmune (flechas verdes). H: M3 (GLI 1 % + 2,4-D 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %) tríada de v, db y a obturadas con fibras de colágeno (circulo punteado negro) y elevada cantidad de células del sistema inmune (flechas verdes). H-E; 40X.

El análisis evidenció diferencias significativas en el contenido de lípidos hepáticos entre los tratamientos evaluados (χ^2 = 165,590; p < 0,0001). En particular, los neonatos expuestos *in ovo* a GLI 2 %, M1, M2 y M3 presentaron una mayor acumulación de lípidos hepáticos en comparación con el grupo CN (p = 0,0001, p = 0,0431, p < 0,0001 y p = 0,0004, respectivamente; Figura 39). En las mezclas, se registró un menor porcentaje lipídico en el tratamiento 2,4-D 0,12 % comparado con la M1 (p = 0,0089) y en IMI 0,2 % comparado con la M2 (p < 0,0001); mientras que GLI 2 %, 2,4-D 0,12 % y CAP 0,03 % mostraron un contenido lipídico en hígado significativamente mayor en relación con la M3 (p < 0,0001, p = 0,0298 y p = 0,0233, respectivamente; Figura 39).

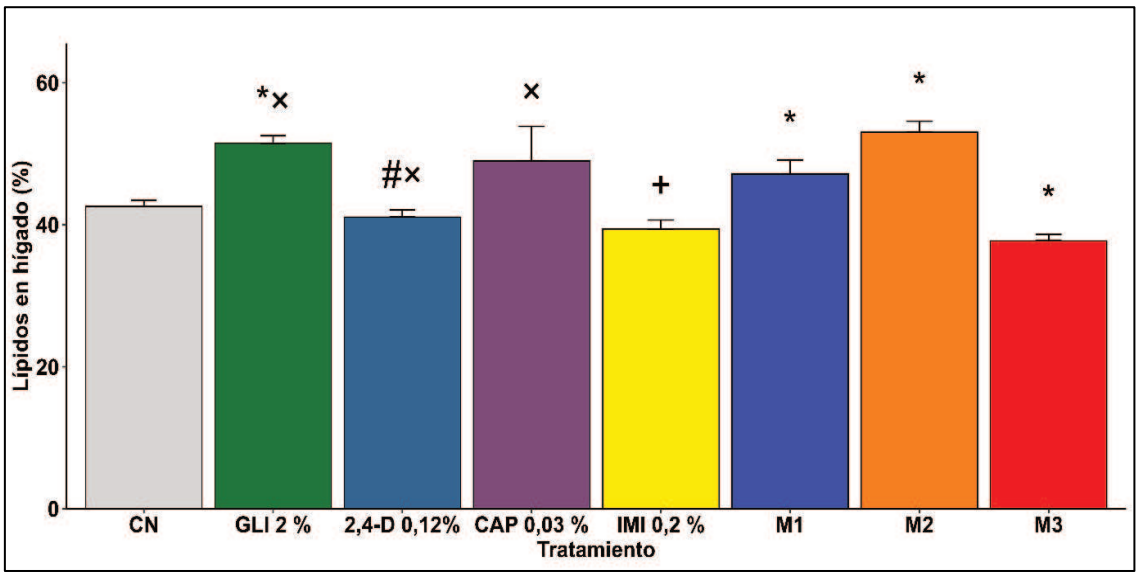

Figura 39. Porcentaje del contenido lipídico (media ± EE) en hígado de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas en la T2022.

Tratamientos: CN (control negativo); GLI 2 % (formulación de glifosato al 2 %); 2,4-D 0,12 % (formulación de 2,4-D al 0,12 %); CAP 0,03 % (formulación de clorantraniliprole al 0,03 %); IMI 0,2 % (formulación de imidacloprid al 0,2 %); M1 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 %); M2 (mezcla compuesta por CAP 0,015 % + IMI 0,1 %); M3 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). Diferencias significativas p < 0,05: respecto a CN (*); respecto a la M1 (#); respecto a la M2 (+) y respecto a la M3 (×).

3.1.1.3.7.2. Caracterización histológica de ovarios en neonatos de *C. latirostris*

El ovario de neonatos de *C. latirostris* mostró una superficie recubierta por un epitelio escamoso a levemente cúbico, característico de este órgano (Iungman, 2011).

Zona cortical: es la región más externa del ovario. Presenta un epitelio germinal cúbico simple y una delgada capa subyacente de tejido conectivo denso. El estroma cortical estuvo constituido por tejido conectivo altamente celular, donde se observaron numerosos de nidos germinales (N), compuestos por oogonias (oog), oocitos en estadio 1 (S1) y células no germinales (pre-foliculares). Los nidos se dispusieron de tres formas: 1) pequeños grupos rodeados por una fina capa de tejido conectivo; 2) nidos sin delimitación evidente y 3) células germinales aisladas en el estroma cortical (Figura 40). Estos nidos se encontraron separados por trabéculas de tejido conectivo medular, compuestas por fibras de colágeno y vasos sanguíneos, dentro de la corteza.

Las células germinales se diferenciaron de las somáticas por su núcleo esférico prominente y ooplasma ligeramente teñido (Figura 40). Las ovogonias tempranas fueron esféricas con núcleo de cromatina finamente granular y con ovoplasma marcadamente teñido. Los ovocitos en inicio meiótico se localizaron inmediatamente por debajo del epitelio ovárico, aunque también se observaron ovocitos dispersos en el estroma medular.

Asimismo, se identificaron folículos primordiales (fpm), que consisten en un ovocito primario rodeado por una o dos células pregranulosas escamosas, de citoplasma basófilo y núcleos densos, escamosos u ovalados (Figura 40).

Zona medular: La región más interna correspondió al estroma medular, compuesto por tejido conectivo laxo vascularizado y un sistema bien desarrollado de lagunas (L; Iungman, 2011). Las lagunas estuvieron rodeadas por un epitelio simple que varió de cúbico a plano, con presencia de un infiltrado de células mesenquimáticas. En su interior se observaron espacios claros periféricos, probablemente asociados a depósitos lipídicos removidos durante la preparación histológica.

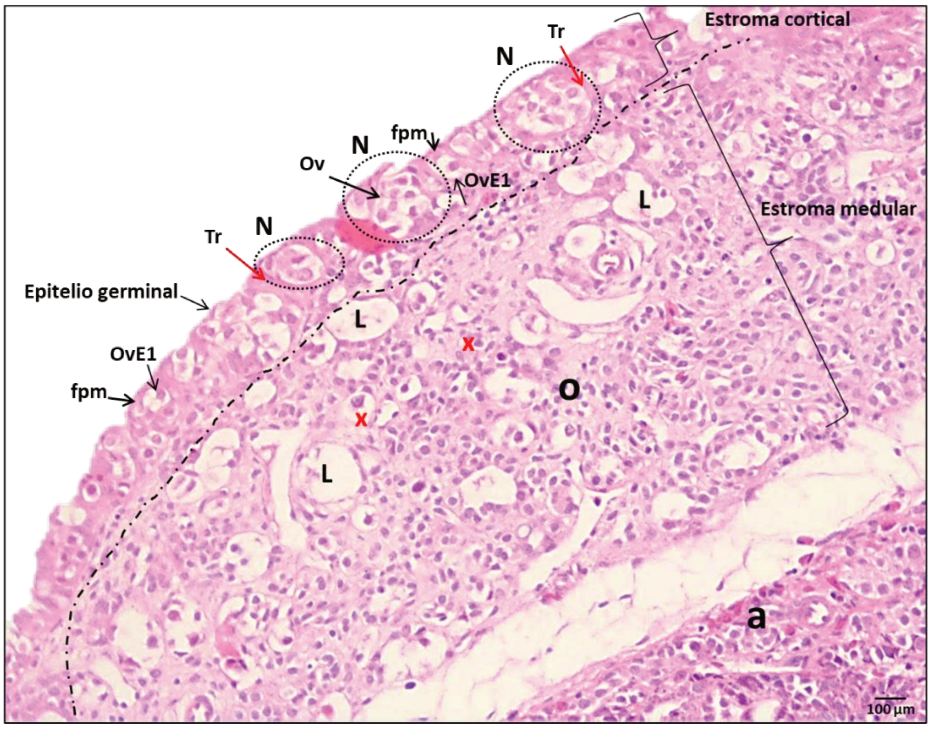

Figura 40. Micrografía de ovario (o) de neonato de *Caiman latirostris.*

Estroma cortical: Nidos (N) que consisten en ovogonias (Ov) compactas. Ovocitos primarios (OvE1) rodeados de folículos primordiales (fpm). Nidos delimitados por trabéculas (Tr). Estroma medular: Sistema de lagunas bien desarrolladas (L), (X rojas) ovocitos encontrados en la médula. En la parte inferior de la imagen se observa la glándula adrenal (a). H-E; 40X.

En las gónadas de las hembras del grupo CN se observó una arquitectura ovárica conservada, con nidos bien definidos y clara delimitación entre corteza y médula. Las lagunas medulares presentaron un tamaño y distribución acordes a la organización normal del tejido, y se identificaron abundantes ovocitos en estadio S1 (Figura 41-A). Por el contrario, los resultados del análisis comparativo de la región ovárica de hembras expuestas a diferentes tratamientos revelaron múltiples alteraciones estructurales a nivel histológico de distinto grado de severidad en comparación con el grupo CN. En algunos grupos tratados se observó una mayor difusión del límite entre la corteza y la médula ovárica, atribuible principalmente a la expansión del sistema lagunar, con un aumento en el número y el tamaño de los espacios lagunares que se extendieron hacia la región cortical (Figuras 41-B y C). En los tratamientos con 2,4-D 0,12 %, M1, M2 y M3 se observó vacuolización citoplasmática en oocitos, células epiteliales y células del estroma, evidenciada por la presencia de vacuolas claras en distintos grados de extensión.

Se evidenciaron alteraciones en la arquitectura del tejido germinal, caracterizadas por la disrupción de los nidos ovocitarios y la desorganización del epitelio germinativo. En zonas específicas, el epitelio escamoso superficial mostró cambios morfológicos con estructuras tipo brotación (*buds*), indicativas de una reorganización celular activa. Estas brotaciones presentaron invaginaciones definidas del epitelio hacia el estroma subyacente, con delimitación clara de las células epiteliales (Figura 41-D).

Asimismo, se observó una marcada expansión del tejido conectivo subepitelial con un notable incremento en el depósito de fibras colágenas, teñidas de rosado pálido con H-E (Figura 41-D, G y H), lo que sugiere un proceso de remodelación del estroma cortical.

Además, se identificaron infiltrados celulares focales en la zona cortical y perimedular, compatibles con células del sistema inmune (Figura 41-B y C). Dichos infiltrados estuvieron compuestos principalmente por linfocitos, caracterizados por núcleos pequeños, redondos y basofílicos, y por eosinófilos, con citoplasma eosinófilo granular intensamente teñidos con H-E, lo cual podría indicar un proceso inflamatorio o una respuesta inmunomoduladora inducida por los tratamientos aplicados.

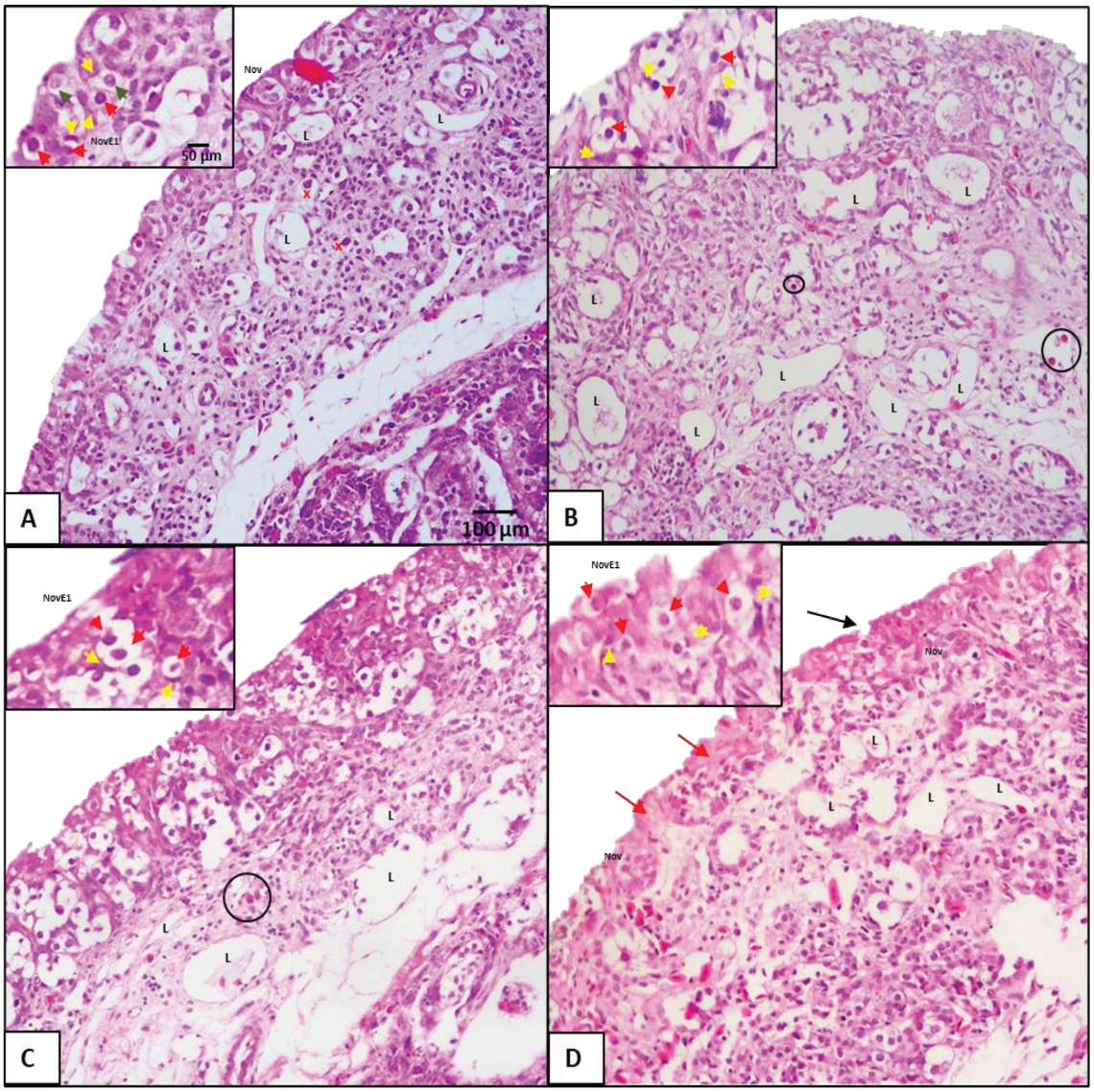

Figura 41. Micrografía de ovario de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición *in ovo* de distintas formulaciones de agroquímicos formulados y mezclas en la T2022.

Los recuadros indican una sección puntual del ovario magnificado para mayor visualización de los ovocitos. A: diferenciación clara entre estroma cortical y medular, con presencia de nidos de ovogonias en fase 1 (NovE1) y en estadios más tempranos (Nov). Se observan ovocitos en fase 1 (punta de flecha roja), células somáticas foliculares (punta de flecha amarilla) y ovocitos de baja intensidad de color compatibles con estadio leptotene (punta de flecha verde). B: formulación de glifosato al 2 % (GLI 2 %): ampliación del sistema lagunar con disposición anómala en la región cortical, difusión del límite córtex-médula e infiltración de células inmunológicas (círculo negro). C: formulación de 2,4-D al 0,12 %: sistema lagunar ampliamente desarrollado en la médula, con nidos de ovogonias en estadio E1 y ovocitos de núcleo céntrico. D: tinción eosinófila en el córtex, compatible con fibras de colágeno (flecha roja), rodeando nidos de ovogonias (Nov y NovE1). Se observan invaginaciones definidas del epitelio hacia el estroma subyacente (*buds*; flecha negra). H-E; 40X.

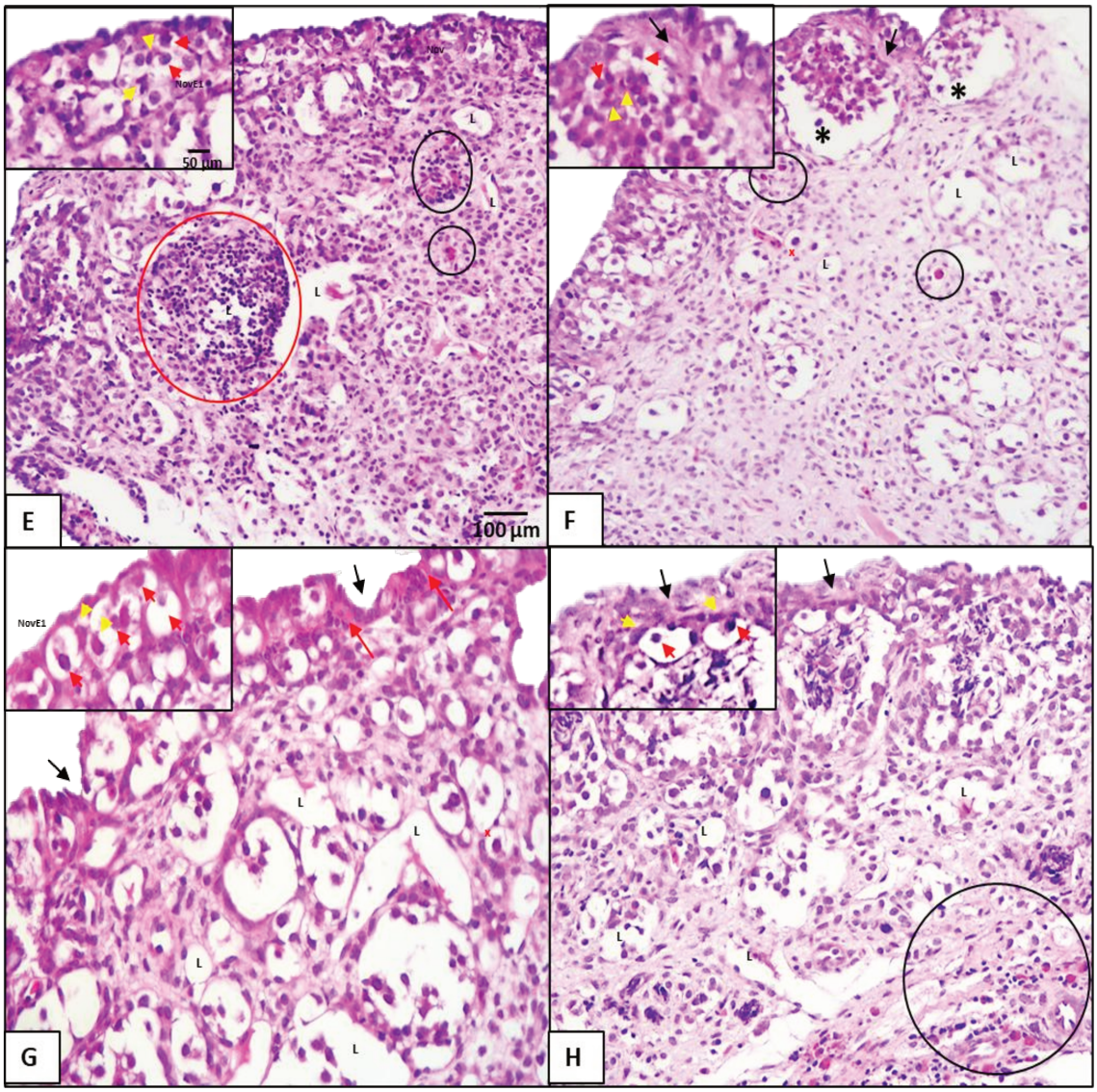

Figura 41. Micrografía de ovario de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición *in ovo* de distintas formulaciones de agroquímicos formulados y mezclas en la T2022.

E: formulación de imidacloprid (IMI 0,2 %): infiltrado de células inmunológicas en la región medular, con linfocitos (círculo rojo) y eosinófilos (círculo negro), junto con difusión del límite córtex-médula. F: M1 (GLI 1 % + 2,4-D 0,06 %): aumento de espacios vacíos en el córtex (asterisco negro) y presencia de eosinófilos (círculo negro), desarrollo del epitelio ovárico escamoso con marcada tinción eosinófila, compatible con fibras de colágeno (flecha negra). G: M2 (CAP 0,015 % + IMI 0,1 %): desarrollo del epitelio ovárico escamoso con marcada tinción eosinófila, compatible con fibras de colágeno (flecha roja), e incremento de espacios vacíos en el córtex. Se observan invaginaciones definidas del epitelio hacia el estroma subyacente (*buds*; flecha negra). H: M3 (GLI 1 % + 2,4-D 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %): proliferación de fibras colágenas subyacentes al epitelio escamoso, aumento de espacios vacíos, difusión del límite córtex-médula y eosinófilos (círculo negro). H-E; 40X.

Histoarquitectura del oviducto: en el estadio neonatal, el oviducto se presenta como una estructura tubular delgada firmemente asociada al complejo GAM (Iungman, 2011). La mucosa (endometrio) constituye la capa más interna que tapiza el lumen, formada por un epitelio cilíndrico ciliado compuesto por células alargadas con núcleos ligeramente basófilos y cromatina de patrón granular. El citoplasma es escaso y presenta prolongaciones apicales en forma de cilios intensamente eosinófilos con H-E.

Entre las células epiteliales se identifican células secretoras, y por debajo del epitelio se observa una membrana basal acelular que delimita una lámina propia de tejido conectivo laxo, escasamente celular, con abundante matriz extracelular y fibras de colágeno dispuestas de forma irregular.

La túnica muscular (miometrio) subyacente estuvo conformada por una capa interna de músculo liso circular y una capa externa de músculo liso longitudinal, rodeando la mucosa y la lámina propia, contribuyendo a la funcionalidad del oviducto neonatal. La capa serosa (perimetrio), recubre el exterior del oviducto y es una continuación del peritoneo (Tavalieri y col., 2024; Figura 42).

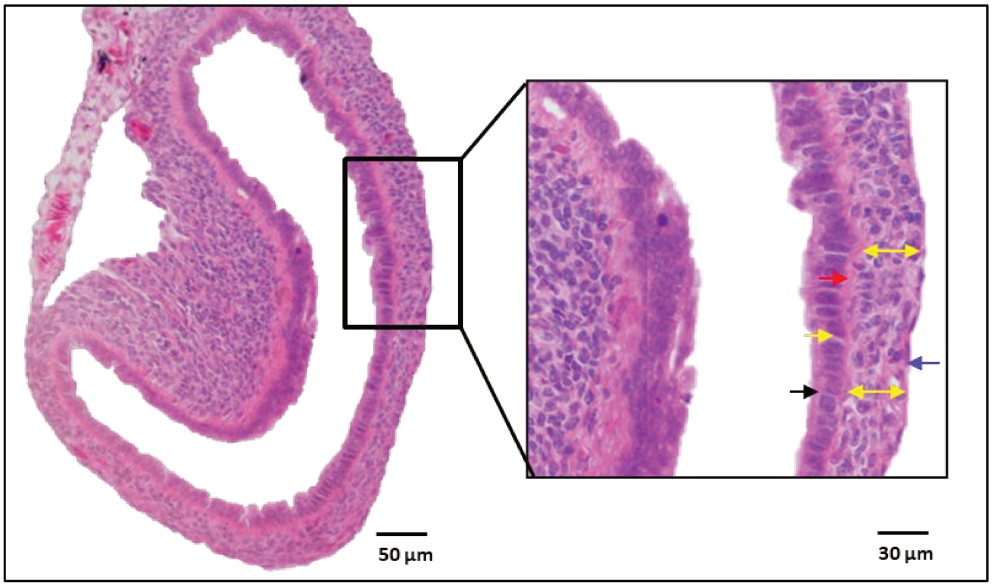

Figura 42. Micrografía del oviducto de neonatos de *Caiman latirostris*.

Mucosa (flecha negra), células secretoras (flecha amarilla), lámina propia (flecha roja), túnica muscular (flechas de dos puntas), serosa (flecha azul). H-E; 40 y 60X.

En el análisis histológico del oviducto de hembras recién nacidas de *C. latirostris* del CN, se observó un epitelio homogéneo, con *buds* poco desarrollados, compatibles con la etapa neonatal (Figura 43-A y B). Por el contrario, en hembras expuestas durante el desarrollo embrionario a distintas formulaciones y mezclas de agroquímicos, evidenciaron alteraciones en la organización tisular. Se observaron desórdenes epiteliales, caracterizados por células con núcleos redondeados o poliédricas dentro del epitelio columnar simple o pseudoestratificado, sin patrón organización definido (Figura 43-C y H). Este tipo de hallazgo fue común en la mayoría de los tratamientos evaluados.

Se registraron protrusiones epiteliales, definidas como áreas con células de núcleos redondeados inmersas en el epitelio luminal proyectadas hacia el espacio luminal como una protuberancia, que fueron principalmente observadas en el tratamiento GLI 2 %, M2 y M3 (Figura 43-C, G, H). También se registraron estructuras tipo *buds*, correspondientes invaginaciones o fosas en el epitelio luminal, variable en profundidad y extensión observados en los tratamientos GLI 2 %, CAP 0,03 % y M3 (Figura 43-C, D, H). En grupos expuestos a mezclas, se identificaron alteraciones morfológicas descriptas como proyecciones subepiteliales. Estas se caracterizaron por la presencia de células de morfología redondeada o poliédrica organizadas en filas o columnas que se extendían hacia el subepitelio (Figura 43-H). En algunos casos, dichas alteraciones se observaron acompañadas por desórdenes epiteliales, con células epiteliales inmersas en el estroma subyacente (Figura 43-G).

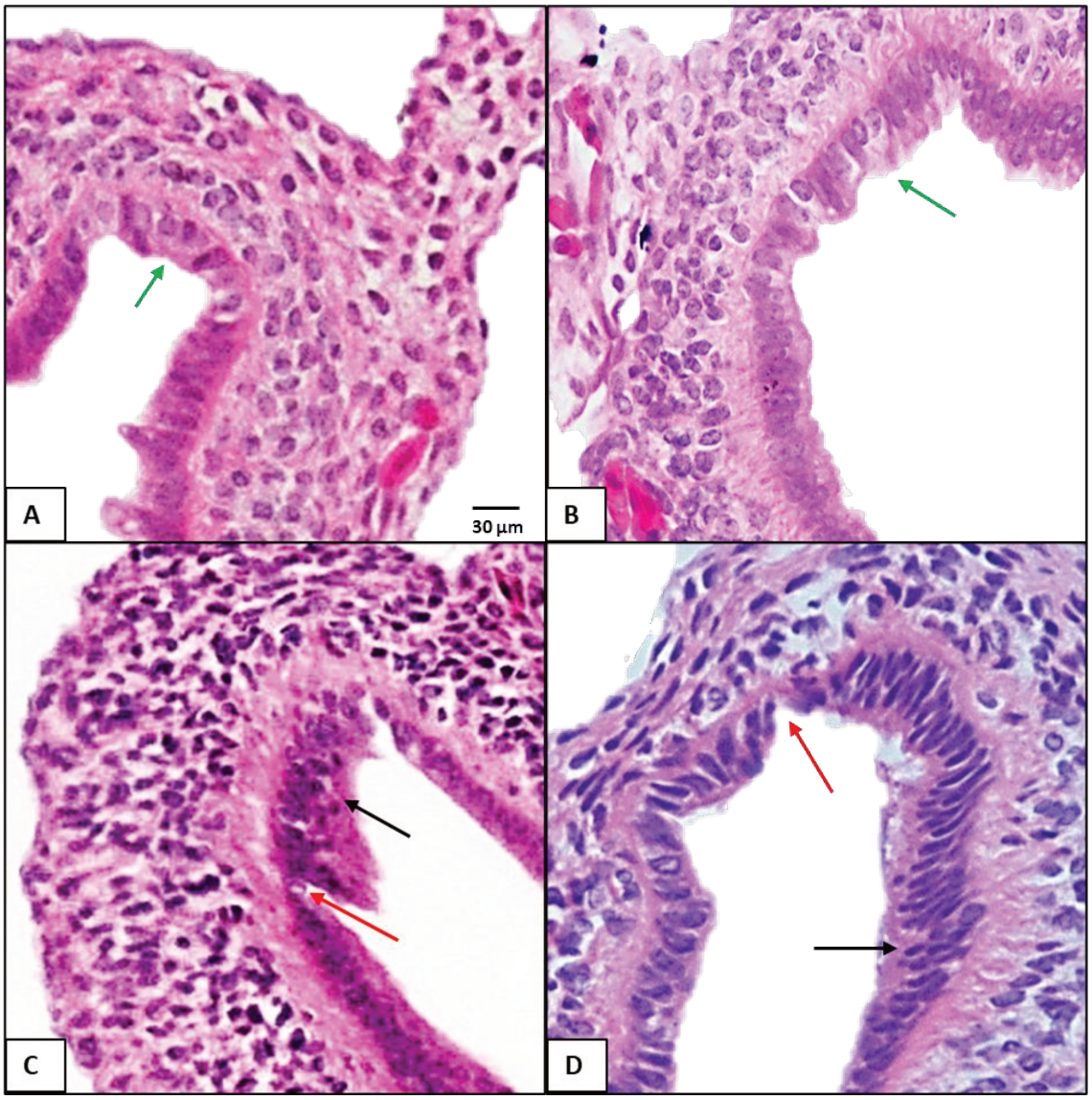

Figura 43. Micrografías de oviducto de hembras de *Caiman latirostris* recién nacidas luego de la exposición *in ovo* de distintas formulaciones de agroquímicos formulados y mezclas en la T2022.

A y B: control negativo, epitelio columnar simple, no se observan alteraciones por encima de la lámina basal (flecha verde). C: formulación de glifosato al 2 % (GLI 2 %). D: formulación de formulación de clorantraniliprole al 0,03 % (CAP 0,03 %). Se observan *buds* (flecha roja) y desórdenes epiteliales con protrusiones (flecha negra). H-E; 40X.

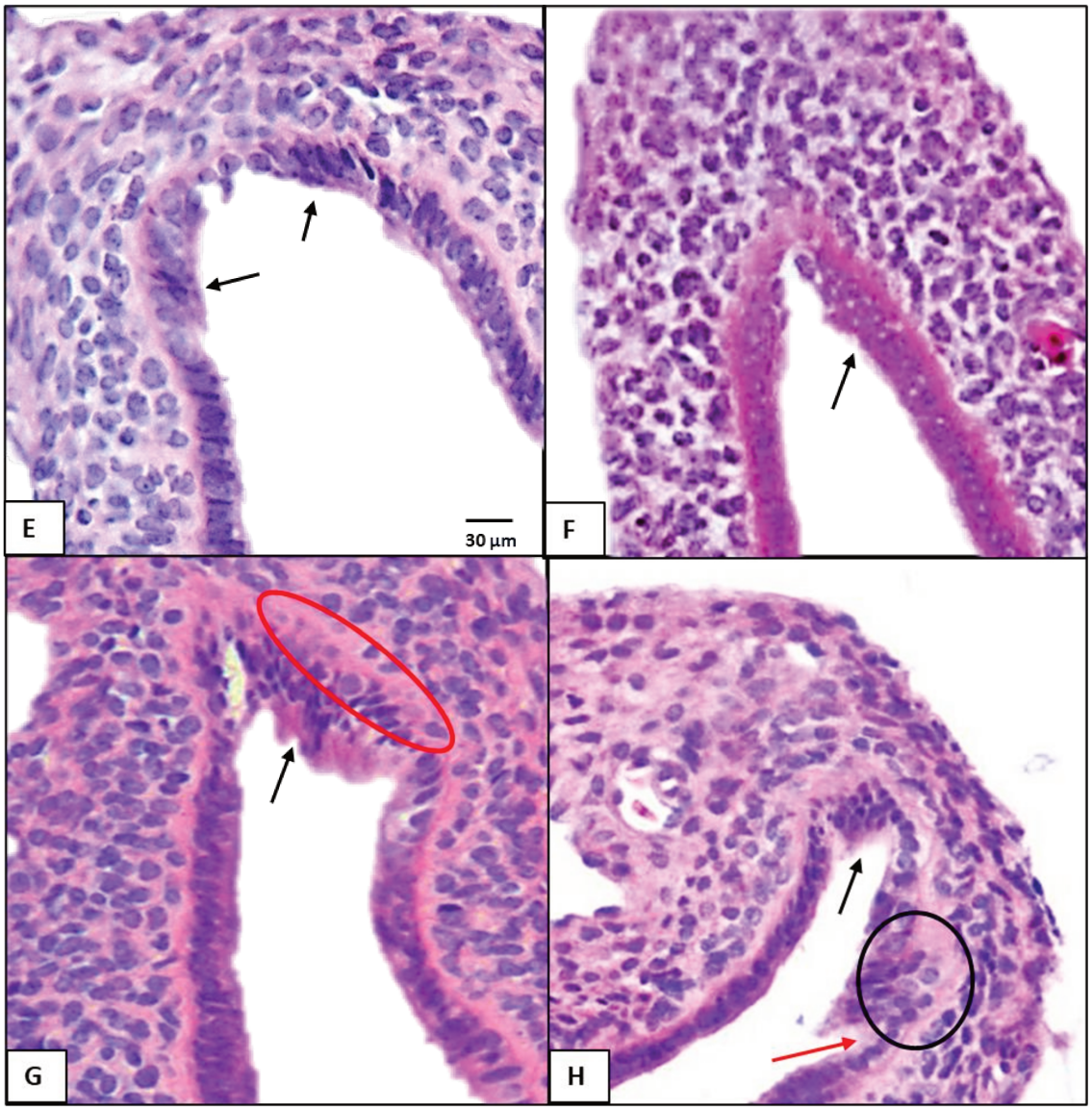

Figura 43. Micrografías de oviducto de hembras de *Caiman latirostris* recién nacidas luego de la exposición *in ovo* de distintas formulaciones de agroquímicos formulados y mezclas en la T2022.

E: formulación de imidacloprid al 0,2 % (IMI 0,2 %); F: M1 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 %); G: M2 (mezcla compuesta por CAP 0,015 % + IMI 0,1 %); H: M3 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). Se observan *buds* (flecha roja), desórdenes epiteliales con protrusiones (flecha negra), desórdenes epiteliales con inmersión de células epiteliales al interior del estroma (círculo rojo; G), proyecciones (círculo negro; H). H-E; 40X.

La Figura 44 presenta la altura promedio del epitelio del oviducto en hembras de *C. latirostris* expuestas *in ovo* a diferentes formulaciones comerciales de agroquímicos y mezclas durante la temporada 2022. Si bien no se realizó un análisis estadístico inferencial debido al bajo número de réplicas y la limitada representación de hembras en cada grupo, se observan diferencias descriptivas entre los grupos. El tratamiento con IMI 0,2 % presentó la mayor altura epitelial (~24 µm), notablemente superior al resto de los grupos. En contraste, el grupo CAP 0,03 % presentó los valores más bajos (~8 µm). Los grupos CN, GLI 2 % y M1 mostraron alturas moderadas (~15–17 µm), mientras que 2,4-D 0,12 %, M2 y M3 presentaron valores levemente más bajos.

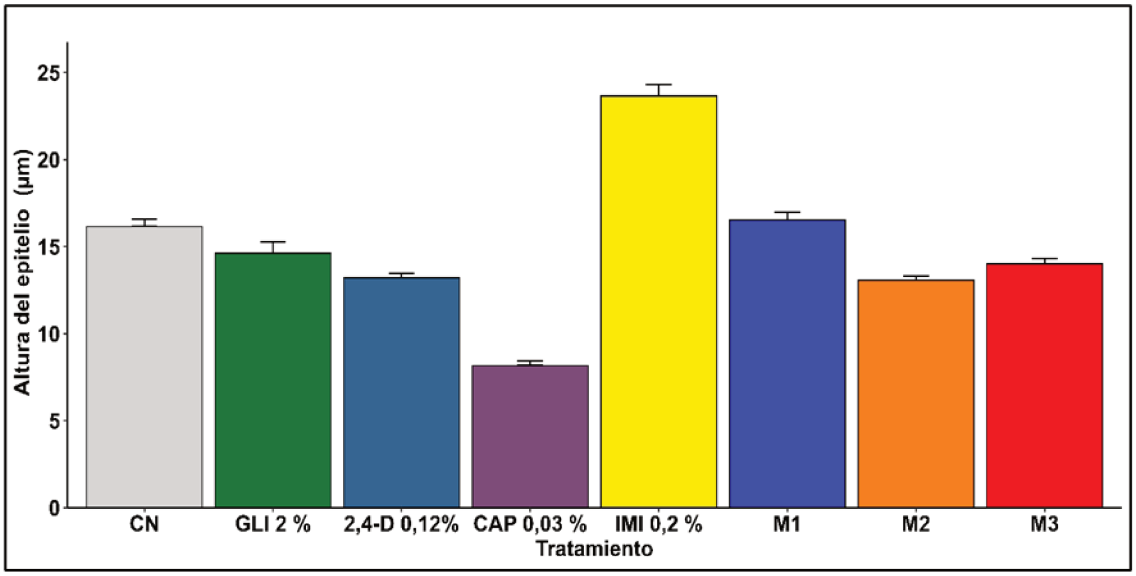

Figura 44. Altura promedio del epitelio del oviducto (µm; media ± EE) en gónadas de hembras de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos.

Tratamiento: CN (control negativo); GLI 2 % (formulación de glifosato al 2 %); 2,4-D 0,12 % (formulación de 2,4-D al 0,12 %); CAP 0,03 % (formulación de clorantraniliprole al 0,03 %); IMI 0,2 % (formulación de imidacloprid al 0,2 %); M1 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 %); M2 (mezcla compuesta por CAP 0,015 % + IMI 0,1 %); M3 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %).

3.1.1.3.7.3. Caracterización histológica de testículos en neonatos de *C. latirostris*

El testículo se encontró recubierto por una túnica serosa de células mesoteliales planas seguida, hacia el interior, de una delgada cápsula de tejido conectivo, constituyendo ambas la cápsula testicular. Los túbulos seminíferos se observaron anastomosados o formando arcos con un lumen evidente en su interior (X; Figura 45). El epitelio seminífero estuvo compuesto por células germinales en distintas fases de proliferación mitótica. Dentro de los túbulos se identificaron dos tipos morfológicos principales de células premeióticas: espermatogonias tipo A y tipo B. Las espermatogonias tipo A exhibieron morfología ovoide y núcleos prominentes con nucléolos conspicuos, diferenciándose en tipo A oscuras, con cromatina intensamente basófila (punta de flecha verde), y tipo A claras con cromatina tenue (punta de flecha negra), con cromatina débilmente teñida. Las espermatogonias tipo B (punta de flecha roja) mostraron forma esférica y cromatina condensada en grumos gruesos, representando la población celular que inician el proceso meiótico. Ambas poblaciones se localizaron adyacentes a la membrana basal del epitelio seminífero, en estrecha asociación con el compartimento basal delimitado por células de Sertoli (flecha celeste; Figura 45), las cuales presentaron prolongaciones citoplasmáticas hacia el lumen. Los túbulos estuvieron delimitados por una membrana basal interna a una capa de células mioides peritubulares escamosas. El espacio intersticial fue reducido (asterisco negro), observándose pequeños grupos de células con núcleos redondos y citoplasma amplio, compatibles con la morfología de células de Leydig (asteriscos rojos; Iungman, 2011; Figura 45).

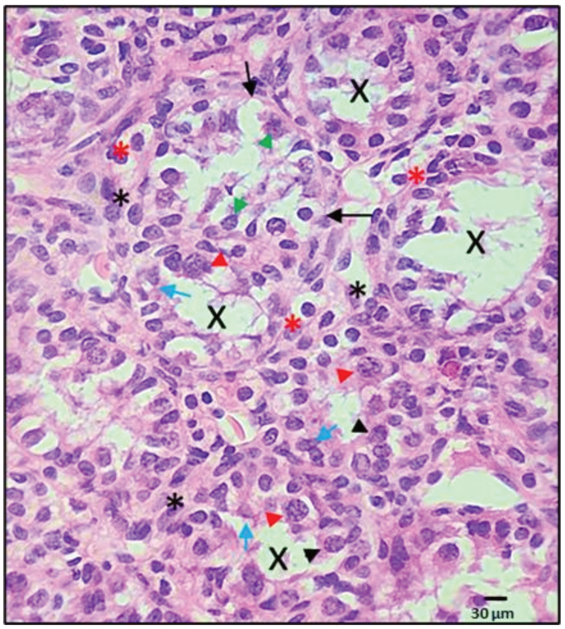

Figura 45. Micrografía de una sección transversal de testículo de *Caiman latirostris*.

Membrana basal (flechas negras), intersticio (asteriscos negros), células de Leydig (asteriscos rojos), células de Sertoli (flechas celestes), espermatogonias A claras y oscuras (puntas de flechas negras y verdes, respectivamente), espermatogonias B (punta de flechas rojas). H-E; 60X.

La Figura 46 muestra secciones representativas del testículo de neonatos de *C. latirostris* expuestos durante el desarrollo embrionario a distintas formulaciones y mezclas de agroquímicos, focalizando en la organización de los túbulos seminíferos. En los machos del grupo CN, los túbulos seminíferos se observaron bien diferenciados, con lumen definido, abundantes células germinales y células de Sertoli asociadas a la membrana basal. En contraste, los grupos tratados exhibieron mayor espacio luminar de los túbulos seminíferos en comparación con el grupo control, siendo más pronunciado en los tratamientos con GLI 2 %, 2,4-D al 0,12 % y la mezcla M3 (Figura 46 B, C y D, respectivamente). En particular, en el tratamiento M3 (Figura 46-D) se evidenció además mayor desorganización del tejido germinal, dificultando la delimitación y diferenciación de los túbulos seminíferos.

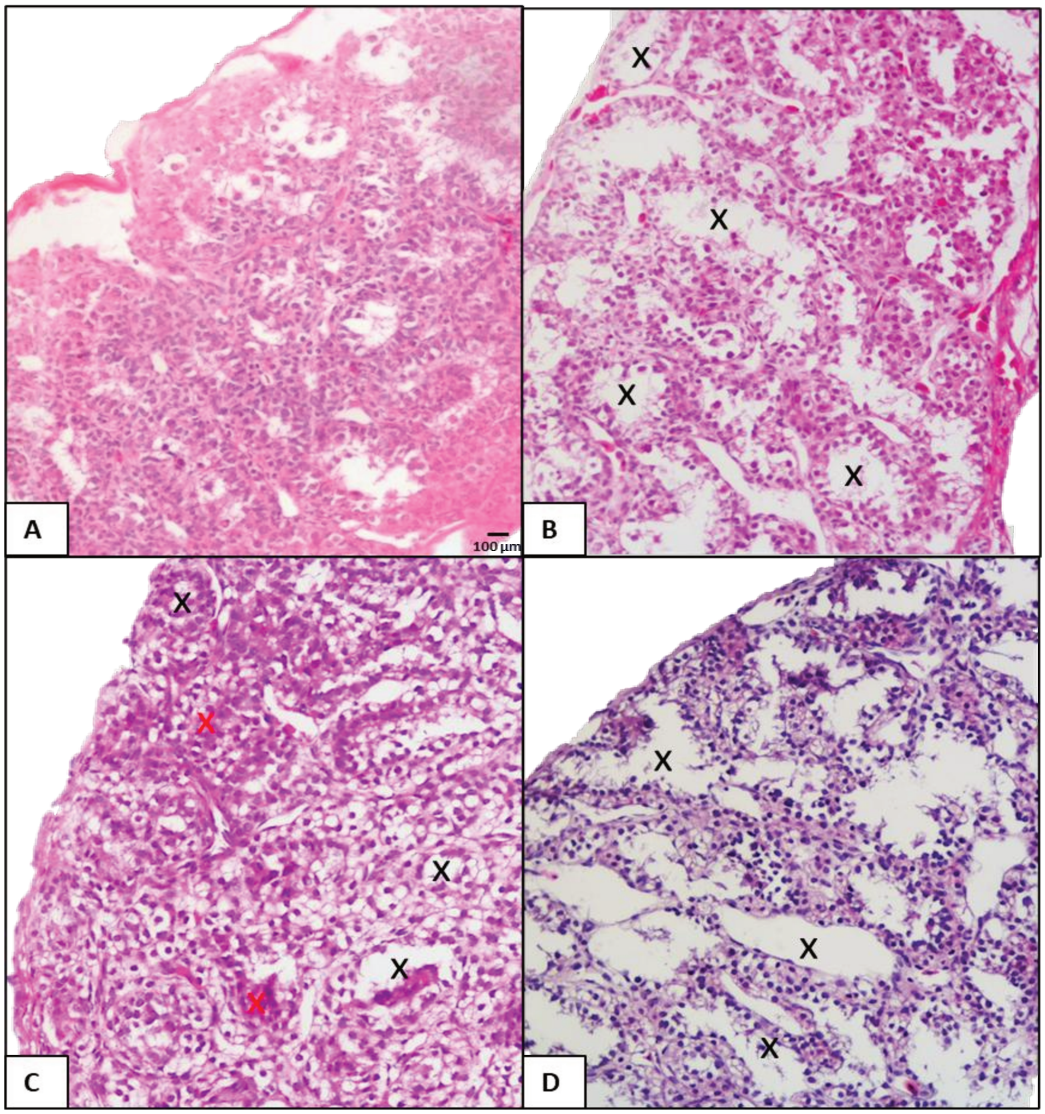

Figura 46. Micrografía de testículo de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición *in ovo* de distintas formulaciones de agroquímicos formulados y mezclas en la T2022.

A: control negativo, túbulos seminíferos con espermatogonias lindantes a la membrana basal. B: formulación de glifosato al 2 % (GLI 2 %). C: formulación de 2,4-D al 0,12 %. D: M3 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). Áreas de mayor grosor de septos intertubulares (X rojo). Túbulos seminíferos con marcada amplitud luminar (X negro). H-E; 40X.

3.1.1.3.7.4. Caracterización histológica de intestino en neonatos de *C. latirostris*

En los caimanes no existe el ciego intestinal, que es el saco cecal que en otros vertebrados marca la unión entre intestino delgado y grueso (Yamada y col., 1987). Esta característica en caminanes dificulta delimitar macroscópicamente ambas porciones, sobre todo en neonatos. Por ello, se examinaron tres regiones intestinales (Figura 47).

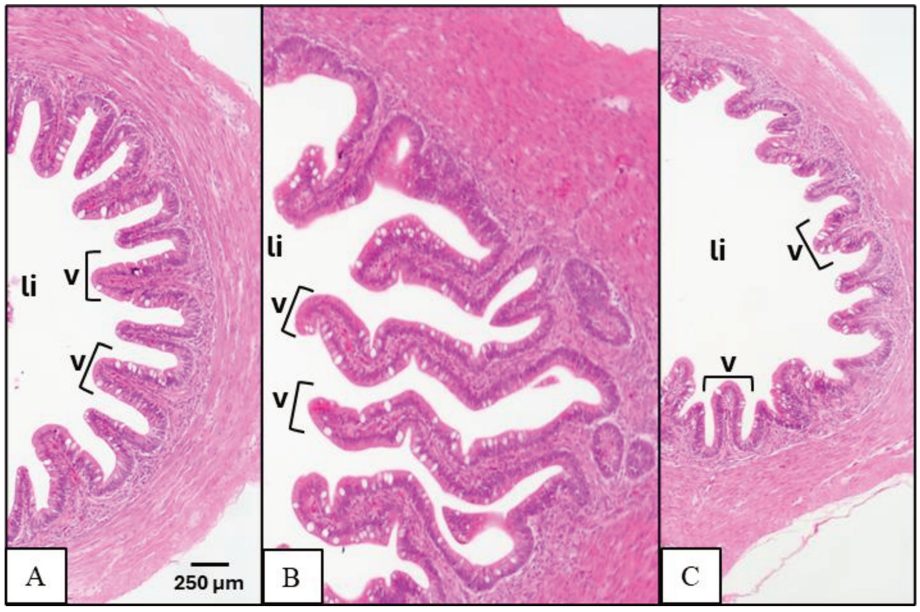

Figura 47. Imágenes de tres porciones diferentes del intestino de neonatos *de Caiman latirostris.* Vellosidades intestinales (v); lumen intestinal (li). H-E; 10X.

Microscópicamente, el intestino presentó una mucosa con vellosidades (v) que se proyectan hacia la luz intestinal (li; Figura 48) y están cubiertas por un epitelio columnar simple de células absorbentes, los enterocitos, con numerosas células caliciformes intercaladas. Cada vellosidad contiene tejido conectivo laxo que contiene fibras musculares lisas, linfocitos, células plasmáticas, capilares fenestrados y un vaso linfático central llamado quilífero.

Hacia el exterior, se observó la túnica muscular externa, constituida por una capa interna de músculo liso dispuesta en orientación circular bien desarrollada y, sobre ella, una capa longitudinal de menor grosor, seguida de una túnica serosa, compuesta membrana de

tejido conectivo revestida por mesotelio. No se identificaron estructuras equivalentes a las criptas de Lieberkühn, aunque se registraron invaginaciones en las porciones basales de los pliegues intestinales.

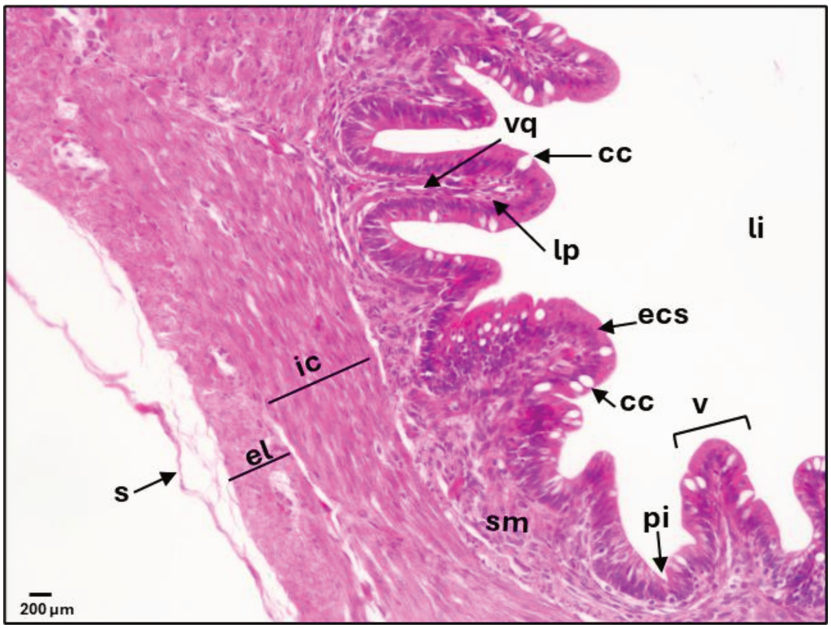

Figura 48. Micrografía de intestino de un neonato de *Caiman latirostris*.

Lumen intestinal (li); vellosidades (v); células calciformes (cc); epitelio columnar simple (eps); lámina propia (lp); vasos quilíferos (vq); submucosa (sm); pliegues intestinales (pi); fibras musculares internas circulares (ic); fibras musculares externas longitudinales (el); serosa (s). H-E; 40X.

El análisis histológico del epitelio intestinal permitió identificar diversas alteraciones estructurales en los individuos expuestos, en comparación con el tejido de referencia. En el grupo control (Figura 49), las vellosidades mostraron arquitectura digitiforme conservada, epitelio íntegro y lámina propia con aspecto laxo, sin signos evidentes de infiltrado celular ni hiperplasia glandular.

En los grupos expuestos (Figura 49-B a F) se observaron alteraciones morfológicas variables incluyendo vellosidades engrosadas o de contornos irregulares y focos de infiltrado celular en la lámina propia, caracterizado por células basófilas (por su afinidad con la hematoxilina), compatibles con células mononucleares, evidentes en las áreas señaladas por óvalos negros.

Además, en los tratamientos GLI 2 %, 2,4-D 0,12 % y mezclas (Figuras 49-B, C y E) se registró una hiperplasia focal del epitelio en criptas. En el grupo IMI 0,2 %, se observó desprendimiento focal del epitelio, compatible con lesión ulcerativa, acompañado por infiltrado de células mononucleares en la lámina propia. En el tratamiento con CAP 0,03 % (Figura 49-D) se observó una homogeneización de la lámina propia entre criptas, con reducción de la definición interglandular y una mayor densidad celular, indicando una pérdida de la organización celular en comparación con el grupo control.

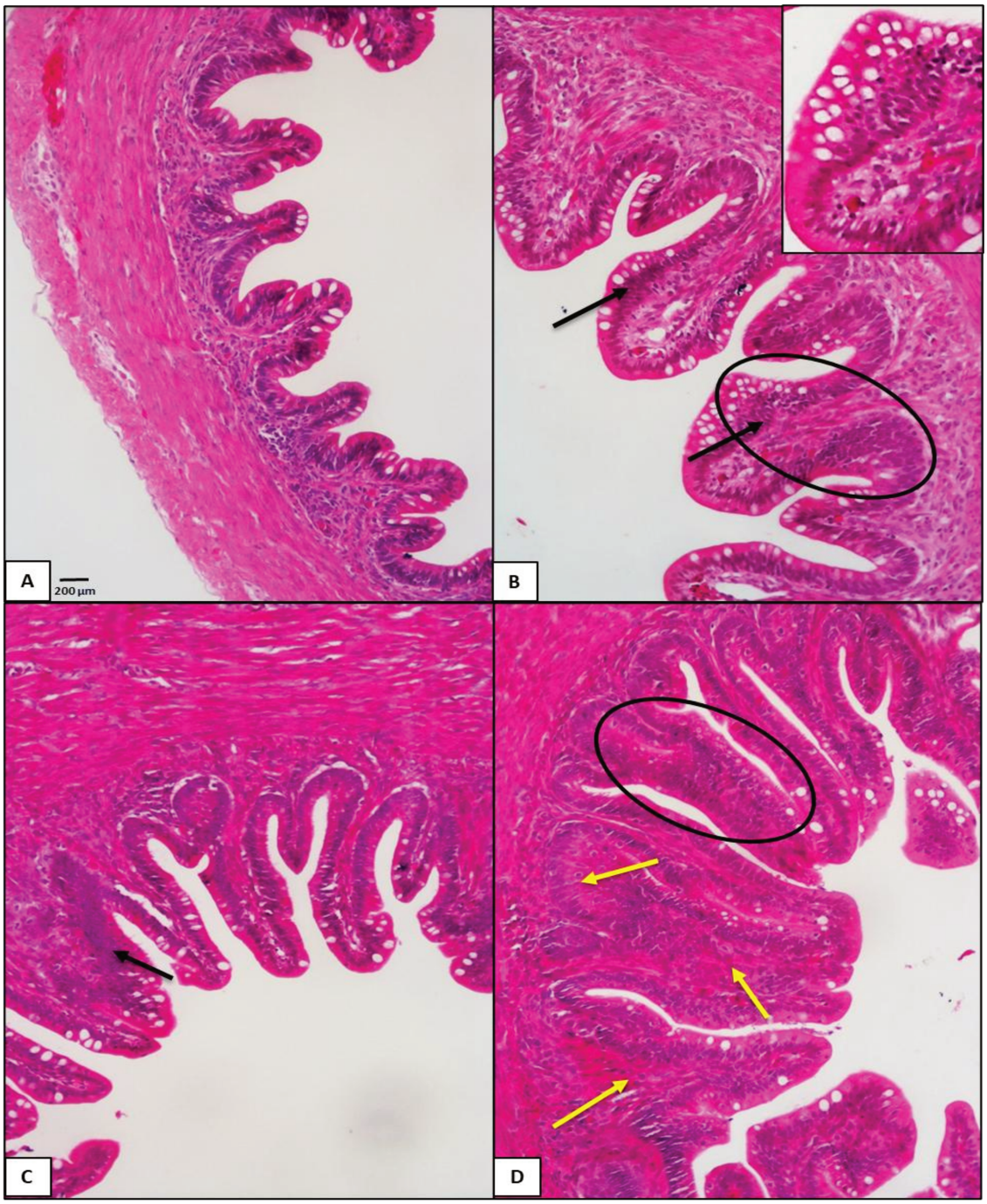

Figura 49. Micrografía de intestino de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición *in ovo* de distintas formulaciones de agroquímicos formulados y mezclas.

A: control negativo: arquitectura conservada con vellosidades bien definidas y lámina propia laxa. B: formulación de glifosato al 2 % (GLI 2 %). C: formulación de 2,4-D al 0,12 %. D formulación de clorantraniliprole CAP 0,03 %.
Las flechas negras indican áreas con acumulación focal de células mononucleares basófilas, compatibles con infiltrado inflamatorio. Los óvalos negros marcan regiones de hiperplasia epitelial en criptas. Las flechas amarillas señalan zonas de lámina propia con escasa diferenciación estructural. H-E; 40X.

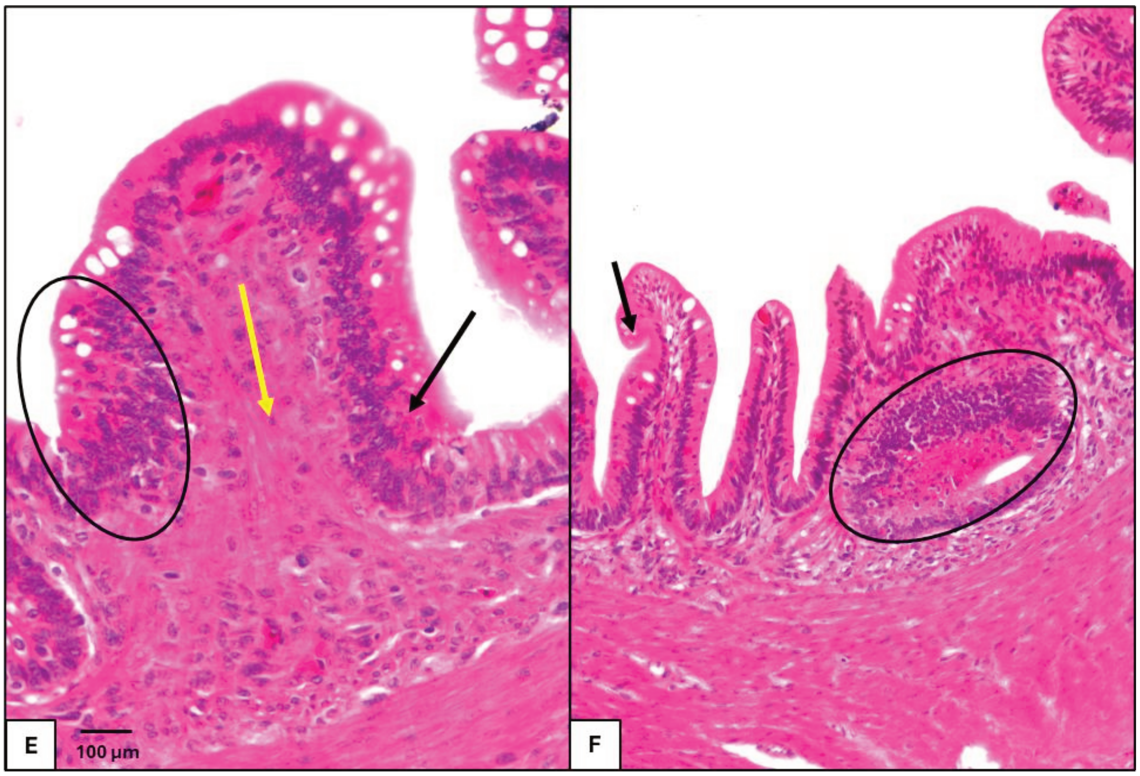

Figura 49. Micrografía de intestino de neonatos de *Caiman latirostris* luego de la exposición *in ovo* de distintas formulaciones de agroquímicos formulados y mezclas. E: M2 (CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). F: M3 (GLI 1 % + 2,4-D 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). Las flechas negras indican áreas con acumulación focal de células mononucleares basófilas, compatibles con infiltrado inflamatorio. Los óvalos negros marcan regiones de hiperplasia epitelial en criptas. Las flechas amarillas señalan zonas de lámina propia con escasa diferenciación estructural. H-E; 40X.

3.1.1.3.8. Determinación de hormonas sexuales en animales de 1 año (OE5)

En el caso de estas variables, no se realizaron análisis estadísticos debido al reducido número de individuos con datos completos, a causa de los imprevistos previamente detallados en la sección de materiales y métodos (**2.3.1.1.**). No obstante, se realizaron las determinaciones hormonales en los individuos disponibles, ya que los valores obtenidos permiten explorar si las variaciones observadas son coherentes con las respuestas fisiológicas previamente detectadas al momento del nacimiento, cuando estos mismos individuos fueron evaluados mediante la batería de biomarcadores presentada en este trabajo. De este modo, la toma de muestras y su análisis descriptivo se justifican como

parte de un enfoque exploratorio orientado a identificar posibles alteraciones endocrinas persistentes a largo plazo en animales expuestos *in ovo*.

A continuación, se presentan los valores de media y EE de las concentraciones plasmáticas de E2, P y T en *C. latirostris* un año después de la exposición embrionaria en la T2022. En aquellos casos en los que el número de individuos no permitió calcular la media y su error estándar, se reporta únicamente el valor individual obtenido para la variable (Tabla 16).

Tabla 16. Niveles de estradiol, progesterona y testosterona (media ± EE) en plasma de *Caiman latirostris* al año de la exposición embrionaria.

Tratamiento	Estradiol (pg/mL)	Progesterona (ng/mL)	Testosterona (ng/mL)
CN	25,97 ± 7,03	1,70 ± 0,88	0,10 ± 0,02
GLI 2 %	14,47 ± S/D	0,59 ± S/D	0,05 ± S/D
2,4-D 0,12%	25,73 ± S/D	2,30 ± S/D	0,03 ± S/D
CAP 0,03 %	14,84 ± 1,14	0,82 ± 0,13	0,06 ± 0,01
IMI 0,2 %	22,19 ± 0,52	1,30 ± 0,00	0,08 ± 0,02
M1	33,52 ± S/D	0,32 ± S/D	0,09 ± S/D
M2	34,62 ± S/D	0,40 ± S/D	0,06 ± S/D
M3	8,76 ± S/D	1,29 ± S/D	0,03 ± S/D

Tratamientos: CN (control negativo); GLI 2 % (formulación de glifosato al 2 %); 2,4-D 0,12 % (formulación de 2,4-D al 0,12 %); CAP 0,03 % (formulación de clorantraniliprole al 0,03 %); IMI 0,2 % (formulación de imidacloprid al 0,2 %); M1 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 %); M2 (mezcla compuesta por CAP 0,015 % + IMI 0,1 %); M3 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). S/D: Sin dato.

3.1.2. Exposición *in vivo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas en crías de *C. latirostris*

3.1.2.1. Cuantificación de plaguicidas en agua

Las concentraciones de exposición medidas en el agua de las bateas fueron de : de 540 µg/L, 5,44 µg/L, 27 µg/L, 2,5 µg/L y 32 µg/L para GLI, AMPA, 2,4-D, CAP e IMI, respectivamente. Por otro lado, no se detectó presencia de pesticidas en el grupo CN.

3.1.2.2. Parámetros de crecimiento de crías de seis meses de *C. latirostris* luego de la exposición *in vivo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas

El análisis de los parámetros de tamaño (LT, LHC y peso) medidos antes del inicio del experimento no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento, evidenciando homogeneidad en el tamaño de los animales entre los distintos grupos ($p > 0,05$; Tabla 17).

Tabla 17. Parámetros de crecimiento (media ± EE) de pichones de seis meses de *Caiman latirostris* medidos antes (pre-exposición) y después (post-exposición) del tratamiento sub-crónico *in vivo* con formulaciones de agroquímicos y sus mezclas.

Tratamiento	LT.i (cm)	LHC.i (cm)	Peso.i (g)	LT.f (cm)	LHC.f (cm)	Peso.f (g)
CN	25,73 ± 0,93	12,50 ± 0,45	51,17 ± 6,62	28,92 ± 1,36	14,50 ± 0,68	64,45 ± 10,84
GLI 2 %	25,80 ± 0,40	12,50 ± 0,18	52,37 ± 2,73	32,20 ± 0,75	16,48 ± 0,34	90,60 ± 4,91
2,4-D 0,12%	27,57 ± 0,68	13,17 ± 0,38	56,88 ± 3,97	34,30 ± 1,68	16,64 ± 0,81	108,28 ± 16,20
CAP 0,03 %	26,50 ± 0,77	12,92 ± 0,37	53,40 ± 4,86	32,60 ± 1,67	16,24 ± 0,71	79,78 ± 7,81
IMI 0,2 %	26,95 ± 0,86	12,83 ± 0,46	57,73 ± 7,05	32,83 ± 1,89	16,67 ± 0,75	101,72 ± 17,38
M1	26,62 ± 0,87	12,83 ± 0,61	53,95 ± 4,95	31,35 ± 1,36	15,80 ± 0,67	78,75 ± 11,58
M2	26,38 ± 0,54	12,75 ± 0,34	54,15 ± 3,51	30,92 ± 2,65	16,60 ± 0,79	87,88 ± 8,24
M3	26,13 ± 1,05	12,88 ± 0,54	52,67 ± 6,91	30,58 ± 1,46	15,80 ± 0,78	77,93 ± 15,34

LT (longitud total); LHC (longitud hocico-cloaca); i (inicial), f (final)

La exposición *in vivo* sub-crónica a formulaciones comerciales de agroquímicos produjo aumentos marcados del coeficiente corporal (Δ CC = Δ peso / Δ LHC; media ± EE) en juveniles de *C. latirostris* (χ^2 = 14,527; p = 0,0460). Los animales del grupo CN mostraron solo un incremento mínimo (0,51 ± 0,18 g/cm), mientras que los tratamientos, presentaron valores significativamente mayores en relación con el grupo CN (media ± EE; % en relación con el CN; *p*-valor): animales expuestos a GLI al 2 % (1,30 ± 0,81 g/cm; +154 %; p = 0,0202), 2,4-D al 0,12 % (2,20 ± 1,68 g/cm; + 331 %; p = 0,0006), CAP al 0,03 % (1,41 ± 1,01 g/cm; + 177 %; p = 0,0084), IMI al 0,2 % (1,49 ± 1,03 g/cm; + 192 %; p = 0,0101) y la mezcla M2 (1,61 ± 0,92 g/cm; + 216 %; p = 0,0084). En cambio, M1 (0,71 ± 0,73 g/cm; + 40 %; p = 0,1349) y M3 (0,75 ± 1,30; + 47 % g/cm; p = 0,0512) no difirieron significativamente del grupo CN. Tampoco se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos con compuestos individuales y sus mezclas correspondientes (p > 0,05).

3.1.2.3. Determinación del perfil lipídico e indicadores de actividad hepática en crías de *C. latirostris* luego de la exposición *in vivo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas

El análisis evidenció diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de TG entre los tratamientos evaluados (χ^2 = 23,216; p = 0,0015). Los niveles de TG fueron mayores significativamente en los tratamientos GLI 2%, 2,4-D 0,12 % y CAP 0,03 % respecto al CN (p = 0,0221, p = 0,0271 y p = 0,0374, respectivamente). Al comparar las mezclas con sus componentes individuales, la concentración de TG en GLI 2 % fue significativamente mayor comparado con la M1 (p = 0,0464), y en CAP 0,03 % comparado con la M2 (p = 0,0017; Tabla 18).

Las concentraciones de CL, HDL y LDL en plasma de *C. latirostris* luego de la exposición *in vivo* a FA y mezclas no presentaron cambios significativos tras la exposición en ninguno de los tratamientos frente a CN ni al comparar las mezclas con sus compuestos individuales (p > 0,05). La actividad de LDH en el tratamiento GLI 2 % fue significativamente mayor en comparación con la M1 (χ^2 = 11,153; p = 0,0093; Tabla 18).

Los niveles de ALB fueron significativamente menores en CAP 0,03 % frente al grupo CN (χ^2 = 13,941; p = 0,0014).

El análisis evidenció diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de GLUC entre los tratamientos evaluados (χ^2 = 26,935; p = 0,0001). Se observaron niveles de GLUC significativamente mayores en 2,4-D 0,12 % y CAP 0,03 % frente al CN (p = 0,0087 y p = 0,0473, respectivamente); mientras que en M2 se registraron valores menores significativamente en comparación con el grupo CN (p = 0,0393). En las mezclas, GLUC fue significativamente más alta en 2,4-D 0,12 % comparado con la M1 (p = 0,0489), en CAP 0,03 % comparado con la M2 (p = 0,0033) y en 2,4-D 0,12 % y CAP 0,03 % comparado con la M3 (p < 0,0001 y p = 0,0071, respectivamente; Tabla 18).

El análisis evidenció diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de PT entre los tratamientos evaluados (χ^2 = 18,766; p = 0,0015). Los tratamientos GLI 2 % y 2,4-D 0,12 % presentaron valores de PT significativamente mayores en relación con el grupo CN (p = 0,0108 y p = 0,0251, respectivamente). En el análisis de mezclas, GLI 2 % y 2,4-D 0,12 % presentaron niveles de PT superiores a los de M1 (p = 0,0051 y p = 0,0133, respectivamente; de manera similar, CAP 0,03 % e IMI 0,2 % frente a M2 (p = 0,0220 y p = 0,0072, respectivamente); y GLI 2 % registró valores mayores que M3 (p = 0,0441; Tabla 18).

El tratamiento influyó significativamente sobre los niveles plasmáticos de GPT (χ^2 = 25,878; p = 0,0005). La concentración de GPT fue significativamente menor en M2 y M3 en comparación con el grupo CN (p = 0,0014 y p = 0,006, respectivamente). Respecto a las mezclas, los niveles de GPT fueron significativamente mayores en IMI 0,2 % frente a M2 (p < 0,0001) y en los tratamientos GLI 2 %, en 2,4-D 0,12 % e IMI 0,2 % en comparación con la M3 (p = 0,0198, p = 0,0006 y p = 0,0007, respectivamente; Tabla 18).

La concentración plasmática de GOT varió significativamente entre los tratamientos evaluados (χ^2 = 21,970; p = 0,0025). Se observaron niveles significativamente mayores en el tratamiento CAP 0,03 % en comparación con el grupo CN (p = 0,0178); mientras que los valores en M3 fueron estadísticamente menores al grupo CN (p = 0,0147). Entre las mezclas, los niveles de GOT fueron más altos en CAP 0,03 % con respecto a M2 (p = 0,0278); y en GLI 2 %, e IMI 0,2 % se encontraron concentraciones significativamente mayores que M3 (p = 0,0061 y p = 0,0082, respectivamente; Tabla 18).

Tabla 18. Determinaciones bioquímicas (media ± EE) en crías de *Caiman latirostris* luego de la exposición *in vivo* a diferentes formulaciones de agroquímicos y mezclas.

Tratamiento	CN	GLI 2 %	2,4-D 0,12%	CAP 0,03 %	IMI 0,2 %	M1	M2	M3
TG (g/L)	1,73 ± 0,92	**4,79 ± 0,86** $^{*\#}$	**5,06 ± 1,44** *	**4,03 ± 1,59** $^{*+}$	3,95 ± 2,10	1,14 ± 0,78	1,17 ± 0,25	4,69 ± 2,39
CL (g/L)	3,34 ± 0,44	2,97 ± 0,26	3,17 ± 0,35	3,38 ± 0,52	3,27 ± 0,45	3,07 ± 0,28	2,90 ± 0,31	3,01 ± 0,42
HDL (g/L)	15,50 ± 3,62	14,17 ± 4,56	22,25 ± 3,71	19,00 ± 4,36	16,00 ± 6,11	6,75 ± 4,13	12,00 ± 4,02	12,20 ± 5,70
LDH (U/L)	389,05 ± 164,93	**369,13 ± 27,68** $^{\#}$	252,48 ± 35,58	491,60 ± 260,14	390,60 ± 101,11	240,43 ± 29,84	327,68 ± 112,04	381,28 ± 130,31
LDL (g/L)	2,06 ± 0,78	1,15 ± 0,53	0,54 ± 0,54	2,11 ± 1,06	1,05 ± 0,69	1,81 ± 0,64	2,07 ± 0,51	1,35 ± 0,57
ALB (g/dL)	2,11 ± 0,15	2,00 ± 0,21	1,70 ± 0,23	**1,49 ± 0,14** *	1,98 ± 0,16	1,67 ± 0,21	1,76 ± 0,19	1,99 ± 0,29
GLUC (g/L)	1,13 ± 0,07	**1,31 ± 0,34** $^{\times}$	**1,21 ± 0,04** $^{*\#\times}$	**1,41 ± 0,23** $^{*+\times}$	1,18 ± 0,33	0,76 ± 0,26	**0,79 ± 0,17** *	0,82 ± 0,22
PT (mg/dL)	4,56 ± 0,10	**5,89 ± 0,37** $^{*\#\times}$	**5,34 ± 0,09** $^{*\#}$	**4,96 ± 0,15** $^{+}$	**5,66 ± 0,67** $^{+}$	4,46 ± 0,25	4,14 ± 0,22	4,78 ± 0,28
GPT (U/L)	43,37 ± 3,97	**43,50 ± 6,61** $^{\times}$	**38,06 ± 9,03** $^{\times}$	34,13 ± 8,26	**33,51 ± 2,47** $^{+\times}$	23,93 ± 12,31	**23,20 ± 7,31** *	**28,62 ± 3,94** *
GOT (U/L)	61,68 ± 7,64	**69,56 ± 11,50** $^{\times}$	63,55 ± 7,22	**84,49 ± 16,66** $^{*+}$	**61,08 ± 6,55** $^{\times}$	97,21 ± 36,79	76,43 ± 16,27	**52,13 ± 8,90** *

TG: Triglicéridos; CL: Colesterol; ALB: Albúmina; GLUC: Glucosa; PT: Proteínas totales; GPT: Glutamato piruvato transaminasa; GOT: Glutamato oxalacetato transaminasa; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDH: Lactato deshidrogenasa; LDL: lipoproteínas de baja densidad. Diferencias significativas $p < 0,05$: respecto al CN (*); respecto a la M1 (#); respecto a la M2 (+) y respecto a la M3 (×).

3.1.2.4. Determinación de eicosanoides en plasma de crías de *C. latirostris* luego de la exposición *in vivo* a dos formulaciones de herbicidas y su mezcla

Como parte de un trabajo colaborativo con el Laboratorio del Dr. Bowden del Departamento de Ciencias Fisiológicas / Centro de Toxicología Humana y Ambiental de la Universidad de Florida (Gainesville, Florida, Estados Unidos), identificamos analíticamente nueve eicosanoides derivados de las vías COX y LOX mediante LC-MS/MS. Estos incluyeron prostaglandina (PG) D_2, PGE_2, 6-keto $PGF_{1\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$, tromboxano (TBX) B_2, ácido 12-hidroxiheptadecatrienoico (12-HHTrE), ácido 5(S)-hidroxieicosatetraenoico (5(S)-HETE), ácido 12(S)-hidroxieicosatetraenoico (12(S)-HETE) y ácido 15(S)-hidroxieicosatetraenoico (15(S)-HETE) en muestras de plasma de *C. latirostris* de los tratamientos: CN, GLI 2%, 2,4-D 0,12% y M1 (Tabla 19). Se construyeron nueve curvas de calibración -una por cada eicosanoide- con sus respectivas ecuaciones, y todas presentaron un R^2 superior a 0,99. En el control de calidad, todos los analitos evaluados mostraron un CV inferior al 15 %, excepto 6-keto PGF1α y 15(S)-HETE.

Tabla 19. Parámetros de detección, tiempos de retención y validación analítica de nueve eicosanoides medidos por LC-MS/MS en plasma de *Caiman latirostris*.

Metabolito	Q1 (*m/z*)	Q2 (*m/z*)	TR (min)	IS	QC CV (%)	Rango CC (ng/mL)	Slope	R^2
PGD_2	356,5	233	7,4	PGD_2 d_4	5,27	0,00033 – 0,06	0,47	0,99
PGE_2	356,5	319	8,0	PGE_2 d_4	7,79	0,00033 – 0,06	1,22	0,99
6-keto $PGF_{1\alpha}$	374,5	249	5,5	6-keto $PGF_{1\alpha}$ d_4	16,33	0,00033 – 0,08	2,05	0,99
$PGF_{2\alpha}$	358,5	197	7,2	PGE_2 d_4	13,4	0,00033 – 0,08	0,61	0,99
TBX B_2	374,5	173	6,5	TBX_2 d_4	7,82	0,00033 – 0,08	1,17	0,99
12-HHTrE	328,5	-	-	PGE_2 d_4	15,19	0,00033 – 0,08	0,29	0,99
5(S)-HETE	328,5	116	15,0	5(S)-HETE d_8	1,99	0,00033 – 0,08	6,05	0,99
12(S)-HETE	328,5	182	15,3	12(S)-HETE d_8	7,66	0,00033 – 0,08	7,66	0,99
15(S)-HETE	328,5	184	15,6	15(S)-HETE d_8	43,36	0,00033 – 0,08	7,66	0,99

Q1: relación masa/carga del ion precursor; Q2: relación masa/carga del ion producto; TR: tiempo de retención en columna, en minutos; IS: estándar interno; QC CV: coeficiente de variación de las muestras de control de calidad; Rango CC: rango de curva de calibrado; Slope: pendiente de la curva de calibración obtenida por regresión lineal; R^2: coeficiente de determinación de la regresión lineal.

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de PGD_2, PGE_2, 6-keto $PGF_{1\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$ ni TBX B_2 entre los tratamientos y el CN ($p > 0,05$). Sin embargo, los niveles de PGD_2 en el grupo GLI 2 % fueron significativamente mayores que en la M1($\chi^2 = 13,299$; $p = 0,01261$; Figura 50).

En la mezcla M1, se detectó una concentración significativamente menor de 12-HHTrE, 15(S)-HETE, 12(S)-HETE y 5(S)-HETE con respecto al CN ($\chi^2 = 16,490$ - $p = 0,0041$; $\chi^2 = 16,490$ - $p = 0,0080$; $\chi^2 = 10,040$ $p = 0,0209$ y $\chi^2 = 13,478$ - $p = 0,0091$, respectivamente). Además, en comparación con la M1, los niveles de 12-HHTrE, 15(S)-HETE y 5(S)-

HETE fueron significativamente superiores en el tratamiento GLI 2 % (p = 0,0068, p = 0,0011 y p = 0,0074, respectivamente). Aunque los niveles de 12(S)-HETE en el tratamiento M1 fue menor que en GLI 2 %, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (p = 0,0901; Figura 50).

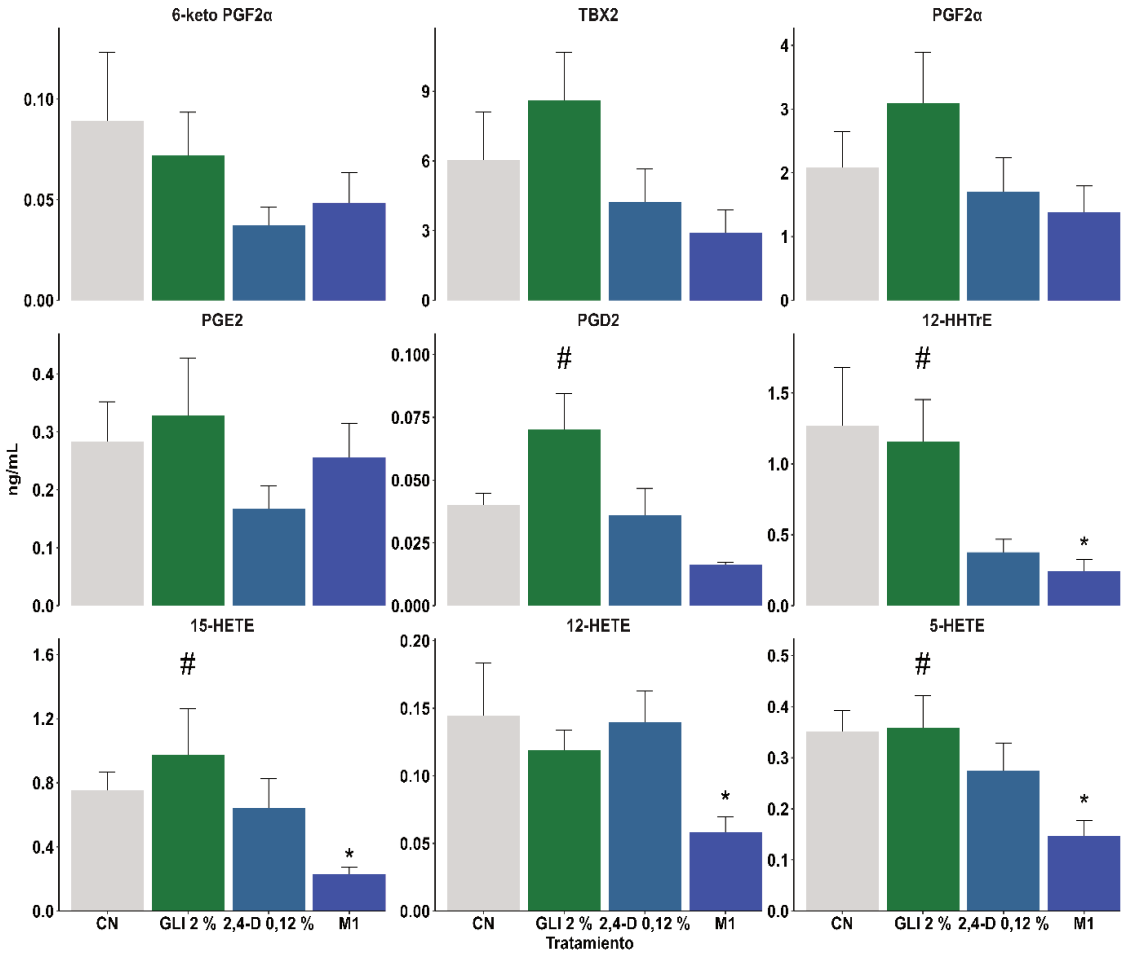

Figura 50. Metabolitos derivados de COX y LOX (ng/mL; media ± se) en plasma *de Caiman latirostris* luego de una exposición *in vivo* a las formulaciones de glifosato (GLI 2 %), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D 0,12 %) y su mezcla (M1), en comparación con el grupo control (CN)

Los eicosanoides evaluados incluyen 6-keto $PGF_{2\alpha}$, TXB_2, $PGF_{2\alpha}$, PGE_2, PGD_2, 12-HHTrE, 15(S)-HETE, 12(S)-HETE y 5(S)-HETE. Diferencias significativas $p < 0,05$: respecto al CN (*); respecto a la M1 (#).

Al evaluar la relación $PGE_2/PGF_2\alpha$, se observaron valores significativamente menores en los individuos expuestos a 2,4-D 0,12 % en comparación con el grupo CN ($\chi^2 = 9,485$; $p = 0,0475$; Figura 51). De manera similar, este tratamiento también presentó valores estadísticamente inferiores respecto de la mezcla M1 ($p = 0,0179$).

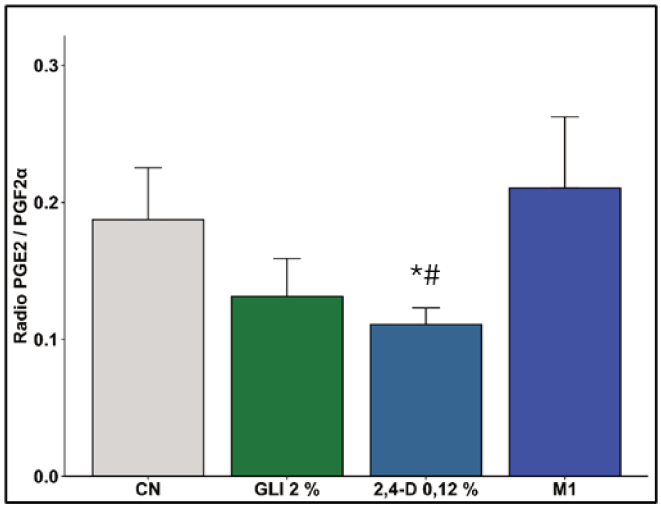

Figura 51. Relación $PGE_2/PGF_2\alpha$ (media ± se) bajo diferentes condiciones de tratamientos: glifosato (GLI 2 %), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D 0,12 %) y su mezcla (M1), en comparación con un control negativo (CN).

Diferencias significativas $p < 0,05$: respecto al CN (*) y respecto a la M1 (#).

3.1.2.5. Peroxidación lipídica en crías de seis meses de *C. latirostris* luego de la exposición *in vivo* a formulaciones de agroquímicos y mezclas (OE3)

Se observó un efecto significativo del tratamiento sobre los niveles de lipoperoxidación (χ^2 = 23,32; p < 0,0001). Los tratamientos M2 y M3 mostraron mayores niveles de TBARS (nmol/g de PT) en comparación al grupo CN (p = 0,0031 y p = 0,0251, respectivamente). M1 presentó niveles superiores de TBARS frente a GLI 2 % (p = 0,0138); M2 valores superiores respecto a CAP 0,03 % e IMI 0,2 % (p = 0,0033); mientras que M3 presento niveles superiores a GLI 2 %, 2,4-D 0,12 %, CAP 0,03 % e IMI 0,2 % (p = 0,0014, p = 0,0282, p = 0,0266 y p = 0,0147, respectivamente; Figura 52).

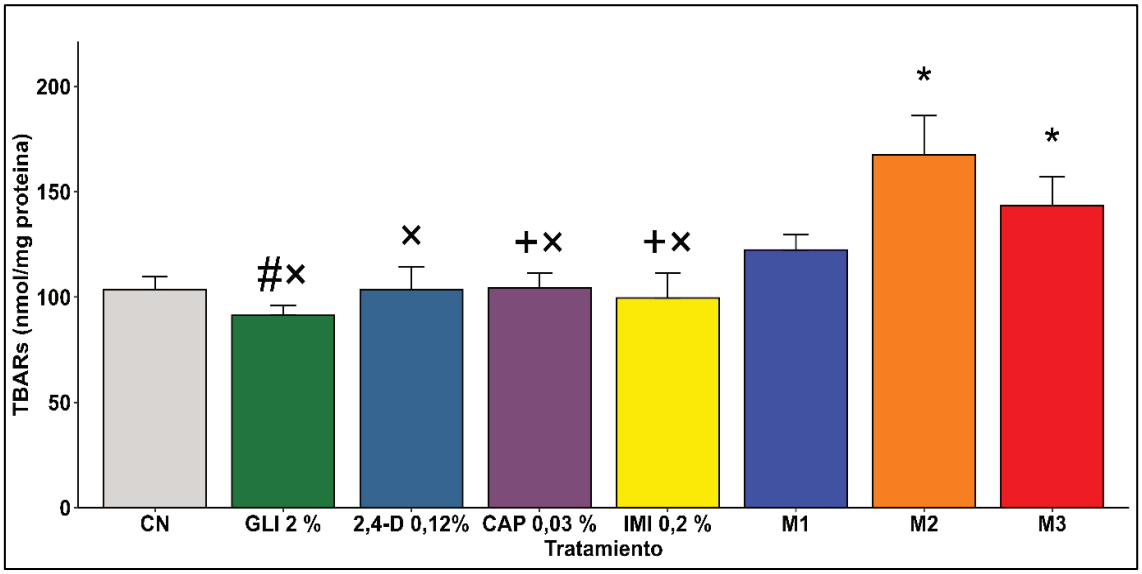

Figura 52. Niveles de TBARS (nmol/mg de proteína; media ± EE) en pichones de 6 meses de *Caiman latirostris* luego de la exposición a formulaciones de agroquímicos y mezclas.

Tratamientos: CN (control negativo); GLI 2 % (formulación de glifosato al 2 %); 2,4-D 0,12 % (formulación de 2,4-D al 0,12 %); CAP 0,03 % (formulación de clorantraniliprole al 0,03 %); IMI 0,2 % (formulación de imidacloprid al 0,2 %); M1 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 %); M2 (mezcla compuesta por CAP 0,015 % + IMI 0,1 %); M3 (mezcla compuesta por GLI 1 % + 2,4-D al 0,06 % + CAP 0,015 % + IMI 0,1 %). Diferencias significativas p < 0,05: respecto a CN (*); respecto a la M1 (#); respecto a la M2 (+) y respecto a la M3 (×).

3.1.2.6. Determinación de hormonas sexuales en animales a los seis meses post-exposición *in vivo* (OE5)

La determinación de hormonas sexuales a los seis meses posteriores a la exposición *in vivo* se enmarca en el OE5, orientado a evaluar posibles alteraciones de largo plazo en la fisiología endocrina vinculada a la reproducción. Si bien durante el estudio se realizaron muestreos en distintos momentos (pre-exposición, post-exposición inmediata, a los 6 meses, al año, al año y medio y a los 2 años), por razones presupuestarias y de disponibilidad de insumos se priorizó el procesamiento de las muestras correspondientes a los seis meses post-exposición. En ese momento, los animales tenían aproximadamente 1 año y 2 meses de edad, lo cual resulta comparable a la edad de los individuos muestreados al año de la exposición *in ovo*, permitiendo así establecer una correspondencia temporal y fisiológica entre ambos experimentos. Asimismo, se seleccionaron E2 y T como hormonas de interés, ya que ambas constituyen marcadores centrales del eje reproductivo, participan en la diferenciación y maduración gonadal, y son comúnmente utilizadas como indicadores sensibles de alteraciones endocrinas asociadas a la exposición a xenobióticos.

El tratamiento influyó significativamente sobre los niveles plasmáticos de E2 (χ^2 = 33,771; p = 0,0001), observándose concentraciones mayores en los grupos GLI 2 %, 2,4-D 0,12 % y M3 en relación con el grupo CN (p = 0,0487, p = 0,0061 y p = 0,0379, respectivamente; Tabla 20).

De manera similar, las concentraciones plasmáticas de T difirieron significativamente entre los tratamientos evaluados (χ^2 = 111,56; p < 0,0001). Los niveles de T presentaron valores significativamente menores en la M2 en comparación con el grupo CN (p = 0,0001) y con el tratamiento IMI 0,2 % (p < 0,0001). De manera similar, la mezcla M3 mostró valores significativamente menores que el tratamiento con 2,4-D 0,12 % (p = 0,0067; Tabla 20).

El análisis reveló diferencias significativas en el cociente Estradiol/Testosterona (E2/T) entre los tratamientos evaluados (χ^2 = 45,368; p < 0,0001). Si bien se observó una tendencia a valores más elevados en los grupos expuestos respecto del control, las diferencias resultaron estadísticamente significativas únicamente para los tratamientos

con GLI 2 %, 2,4-D 0,12 %, CAP 0,03 % y en las mezclas M2 y M3 (p = 0,0001, p = 0,0016, p = 0,0287, p = 0,0001 y p = 0,0002, respectivamente; Tabla 20).

Tabla 20. Niveles de estradiol, testosterona y radio (E2/T; media ± EE) en plasma de *Caiman latirostris* luego de seis meses de exposición *in vivo.*

Tratamiento	Estradiol (pg/mL)	Testosterona (ng/mL)	Relación E2/T
CN	19,84 ± 3,47	0,19 ± 0,03	0,10 ± 0,01
GLI 2 %	**76,67 ± 50,26** *	0,18 ± 0,07	**0,34 ± 0,10** *
2,4-D 0,12%	**39,63 ± 6,83** *	**0,21 ± 0,01** ×	**0,18 ± 0,03** *
CAP 0,03 %	**20,23 ± 1,92** ×	0,12 ± 0,04	**0,19 ± 0,04** *
IMI 0,2 %	28,38 ± 9,25	**0,14 ± 0,01** +	0,19 ± 0,05
M1	32,68 ± 7,67	0,30 ± 0,17	0,23 ± 0,11
M2	28,14 ± 7,08	**0,10 ± 0,01** *	**0,26 ± 0,05** *
M3	**32,02 ± 3,37** *	0,12 ± 0,02	**0,27 ± 0,06** *

E2/T: Relación estradiol / testosterona. Diferencias significativas p < 0,05: respecto a CN (*); respecto a la M2 (+) y respecto a la M3 (×).

3.2. Etapa 2: Monitoreo de poblaciones silvestres (OE6 y 7)

En el plan de tesis doctoral propusimos analizar todas las variables previamente descriptas en sangre de hembras adultas de *C. latirostris* provenientes de áreas ambientalmente expuestas y no expuestas a contaminantes, estableciendo su relación con los datos obtenidos de los huevos y neonatos correspondientes a sus respectivas nidadas. No obstante, los resultados presentados en esta sección de la tesis deben considerarse preliminares, dado que el muestreo ambiental se vio demorado y disminuido por diversos factores: la pandemia de COVID que llevo a la prohibición de los muestreos en animales silvestres hasta el año 2021; luego, en las temporadas sucesivas, la disponibilidad de hembras y nidos expuestos se vio limitada por factores climáticos adversos, principalmente una profunda sequía que afecto la dinámica reproductiva y dificulto el cumplimiento del muestreo originalmente planificado. En este contexto, el esfuerzo de muestreo permitió obtener un total cuatro nidos provenientes de áreas no expuestas y tres nidos de áreas expuestas. En cada condición, uno de los nidos correspondió específicamente a la hembra capturada y de la cual se obtuvieron muestras de sangre durante el trabajo de campo, que fueron luego vinculadas directamente con su respectiva nidada.

Asimismo, este objetivo forma parte de una línea de investigación de largo plazo, proyectada a más de cinco años, por lo cual los datos obtenidos hasta el momento representan avances iniciales en la caracterización integral de los efectos ambientales sobre la fisiología reproductiva y metabólica de la especie.

3.2.1. Éxito de eclosión de neonatos de *C. latirostris* provenientes de áreas ambientalmente expuestas y no expuestas

El análisis preliminar del éxito de eclosión no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los lugares ambientalmente expuestos y aquellos sin exposición ($p > 0,05$).

El promedio del éxito de eclosión fue de 93 ± 3 % (IC 95 %: 0,79−1,07) en el sitio no expuesto y de 87 ± 1 % (IC 95 %: 0,81-0,93) en el sitio expuesto.

3.2.2. Tamaño corporal de neonatos de *C. latirostris* provenientes de áreas ambientalmente expuestas y no expuestas

Los resultados preliminares de tamaño corporal al nacimiento indicaron que los neonatos provenientes de áreas ambientalmente expuestas presentaron valores de peso menores en comparación con los individuos de áreas sin exposición ($\chi^2 = 49,752$; $p < 0,0001$; Tabla 21).

Asimismo, se observó un menor valor de CC en el grupo expuesto en relación con el grupo sin exposición ($\chi^2 = 43,641$; $p < 0,0001$; Tabla 21).

Tabla 21. Longitud total (LT), longitud hocico-cloaca (LHC), peso y condición corporal (CC; media ± EE) de neonatos de *Caiman latirostris* provenientes de áreas no expuestas y ambientalmente expuestas

Lugar	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)	CC (g/cm)
No expuesto	23,04± 0,33	11,40 ± 0,26	45,70 ± 0,84	4,03 ± 0,06
Expuesto	22,76 ± 0,10	11,17 ± 0,04	**39,57 ± 0,45** *	**3,53 ± 0,03** *

Diferencias significativas $p < 0,0001$: respecto al área no expuesta (*)

3.2.3. Determinación del perfil lipídico e indicadores de actividad hepática en plasma en neonatos de *C. latirostris* provenientes de áreas ambientalmente expuestas y no expuestas

3.2.3.1. Determinación plasmática de metabolitos lipídicos

La concentración media de TGs plasmáticos en neonatos provenientes de áreas ambientalmente expuestas (N = 30) fue significativamente menor en comparación con la registrada en neonatos de áreas no expuestas (N= 29; $\chi^2 = 4,163$; $p = 0,0413$; Tabla 22), mientras que, por el contrario, la concentración media de CL plasmático fue significativamente mayor ($\chi^2 = 5,248$; $p = 0,0220$; Tabla 22). Los resultados obtenidos de la actividad de GPT no indicaron diferencias significativas entre los grupos evaluados (p

= 0,5062). Se observó la actividad de la enzima GOT significativamente menor en neonatos provenientes de áreas expuestas en comparación con aquellos provenientes de áreas sin exposición (χ^2 = 3,361; p = 0,0302; Tabla 22). No se observaron diferencias significativas en los niveles de TBARs entre los individuos provenientes de áreas expuestas y aquellos de áreas no expuestas (p = 0,0612).

Tabla 22. Determinaciones bioquímicas (media ± EE) en neonatos de *Caiman latirostris* provenientes de áreas expuestas y no expuestas.

Metabolitos	No expuesto (4 nidos)	Expuesto (3 nidos)
TG (g/L)	1,07 ± 0,16	**0,69 ± 0,14** *
CL (g/L)	6,35 ± 0,27	**7,25 ± 0,26** *
GPT (U/L)	36,90 ± 3,09	39,9 ± 3,85
GOT (U/L)	38,20 ± 2,87	**28,8 ± 2,44** *
TBARs (nmol/mg de proteína)	115,20 ± 11,06	123,14 ± 9,93

TG: Triglicéridos; CL: Colesterol; PT: Proteínas totales; GPT: Glutamato piruvato transaminasa; GOT: Glutamato oxalacetato transaminasa. Diferencias significativas p < 0,05: respecto al área no expuesta (*).

3.2.3.2. Expresión génica en sangre e hígado

La expresión relativa de los genes *g-6-pdh* y *me* en sangre fue significativamente menor en los neonatos provenientes de áreas ambientalmente expuestas en comparación con aquellos provenientes de áreas no expuestas (χ^2 = 46,483 - p < 0,0001 y χ^2 = 9,774 - p = 0,0029, respectivamente; Tabla 23).

De manera similar, la expresión relativa del gen *g-6-pdh* y *srebp1-c* fue significativamente menor en hígado de los neonatos provenientes de áreas ambientalmente expuestas en relación con aquellos provenientes de áreas no expuestas (χ^2 = 6,042 - p = 0,0139 y χ^2 = 26,742 - p < 0,0001, respectivamente; Tabla 23). Por el

contrario, los genes *me*, *lpl*, *fas*, *pparα y pparγ*, presentaron niveles de expresión significativamente mayores en hígado de neonatos ambientalmente expuestos en comparación con los neonatos provenientes de áreas sin exposición (χ^2 = 43,379; χ^2 = 91,196; χ^2 = 9,331; χ^2 = 12,329 y χ^2 = 54,401, respectivamente - p < 0,0001; Tabla 23).

Tabla 23. Expresión relativa (a *β-actina*) de genes del metabolismo lipídico (-ΔΔCt; media ± EE) determinadas en sangre e hígado de neonatos de *Caiman latirostris* provenientes de áreas no expuestas y de áreas ambientalmente expuestas.

Expresión relativa (-ΔΔCt)	No expuesto	Expuesto
	Sangre	
g-6-pdh	1,23 ± 0,10	**0,35 ± 0,05** *
me	1,61 ± 0,19	**0,85 ± 0,13** *
	Hígado	
g-6-pdh	1,16 ± 0,25	**0,60 ± 0,11** *
me	1,18 ± 0,30	**5,6 ± 0,24** *
lpl	1,12 ± 0,23	**8,07 ± 0,62** *
fas	1,09 ± 0,08	**2,67 ± 0,85** *
pparα	1,29 ± 0,40	**7,2 ± 2,89** *
pparγ	1,04 ± 0,13	**7,71 ± 2,83** *
srebp1-c	1,61 ± 0,27	**0,90 ± 0,13** *

Diferencias significativas p < 0,05: respecto al área no expuesta (*)

3.2.4. Determinación del perfil de ácidos grasos en yema residual de *C. latirostris* provenientes de áreas ambientalmente expuestas y no expuestas

Los resultados del perfil de ácidos grasos en yema residual de neonatos *C. latirostris* provenientes de áreas naturales expuestas y no expuestas se encuentran detallados en la Tabla 24.

Dentro del grupo de los AGS, se observaron concentraciones significativamente menores de C14:0, C15:0 ISO, C16:0 y C17:0 ISO en individuos de áreas expuestas, en relación con los valores detectados en neonatos de áreas no expuestas (χ^2 = 69,779; χ^2 = 64,117; χ^2 = 109,240 y χ^2 = 7,838, respectivamente - $p < 0,0001$). En contraposición, el ácido graso C18:0 presentó niveles significativamente más elevados en neonatos expuestos respecto al grupo control (χ^2 = 25,711; $p < 0,0001$; Tabla 24).

En cuanto a los AGMI, se registraron concentraciones significativamente inferiores de 9c-16:1, 9c-17:1 y 11c-20:1 en el grupo expuesto (χ^2 = 134,09; χ^2 = 15,489; χ^2 = 54,342, respectivamente - $p < 0,0001$), mientras que 9c-18:1 fue significativamente mayor en comparación con los valores observados en neonatos de áreas no expuestas (χ^2 = 49,250; $p < 0,0001$).

En el grupo de AGPI, se evidenciaron concentraciones significativamente menores de los ácidos grasos omega-3: 9c,12c,15c-18:3 (n-3), 11c,14c,17c-20:3 (n-3), 5c,8c,11c,14c,17c-20:5 EPA (n-3) y 7c,10c,13c,16c,19c-22:5 (n-3) en la yema de neonatos provenientes de áreas ambientalmente expuestas, en comparación con neonatos de áreas no expuestas (χ^2 = 37,201; χ^2 = 182,730; χ^2 = 256,890 y χ^2 = 8,686, respectivamente - $p < 0,0001$). Por el contrario, se registraron concentraciones significativamente mayores en el grupo expuesto para los ácidos grasos 4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6 DHA (n-3), 9c,12c-18:2 (n-6), 5c,8c,11c,14c-20:4 ácido araquidónico (AA, n-6) y 7c,10c,13c,16c-22:4 (n-6), en comparación con los no expuestos (χ^2 = 16,429; χ^2 = 18,571; χ^2 = 54,950 y χ^2 = 259,790, respectivamente - $p < 0,001$; Tabla 24).

Se puede observar, en la Figura 53 de distribución porcentual de los tipos de ácidos grasos, que la mayoría de los AGS, AGMI y AGPI variaron entre los neonatos provenientes de áreas no expuestas y ambientalmente expuestas.

Tabla 24. Perfil de ácidos grasos (media ± EE) en yema residual de neonatos de *Caiman latirostris* provenientes de áreas no expuestas y áreas ambientalmente expuestas.

Tipo de ácido graso	Lugar	
	No expuesto	**Expuesto**
Saturado		
C 14:0	0,8 ± 0,09	**0,35 ± 0,00** *
C 15:0 ISO	0,55 ± 0,06	**0,24 ± 0,00** *
C 16:0	23,73 ± 0,76	**17,82 ± 0,17** *
C17:0 ISO	0,91 ± 0,07	**0,74 ± 0,02** *
C17:0 ANTEISO	0,17 ± 0,03	0,13 ± 0,00
C 17:0	0,99 ± 0,04	0,92 ± 0,03
C 18:0	7,07 ± 0,35	**8,7 ± 0,07** *
C 20:0	0,29 ± 0,02	0,32 ± 0,00
Insaturado		
Monoinsaturado		
9c-16:1	5,29 ± 0,47	**2,18 ± 0,05** *
9c-17:1	0,68 ± 0,03	**0,58 ± 0,00** *
10c-17:1	0,13 ± 0,04	0,06 ± 0,00
9c-18:1	30,54 ± 0,25	**32,68 ± 0,27** *
11c-18:1	7,98 ± 0,52	7,04 ± 0,04
5c-20:1	0,22 ± 0,05	0 ± 0

11c-20:1	1,07 ± 0,16	**0,32 ± 0,03** *
Poliinsaturado		
9c,12c,15c-18:3 (n-3)	3,58 ± 0,33	**2,21 ± 0,02** *
11c,14c,17c-20:3 (n-3)	0,18 ± 0,00	0,12 ± 0,00
5c,8c,11c,14c,17c-20:5 EPA (n-3)	0,81 ± 0,01	**0,5 ± 0,01** *
7c,10c,13c,16c,19c-22:5 (n-3)	0,5 ± 0,00	**0,45 ± 0,01** *
4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6 DHA (n-3)	1,43 ± 0,10	**1,9 ± 0,07** *
9c,12c-18:2 (n-6)	9,16 ± 1,27	**15,28 ± 0,16** *
11c,14c-20:2 (n-6)	0,18 ± 0,02	0,21 ± 0,00
8c,11c,14c-20:3 (n-6)	0,38 ± 0,02	0,4 ± 0,03
5c,8c,11c,14c-20:4 (n-6) AA	2,71 ± 0,21	**5,13 ± 0,35** *
7c,10c,13c,16c-22:4 (n-6)	0,18 ± 0,01	**0,91 ± 0,05** *

Diferencias significativas $p < 0,05$: respecto al área no expuesta (*)

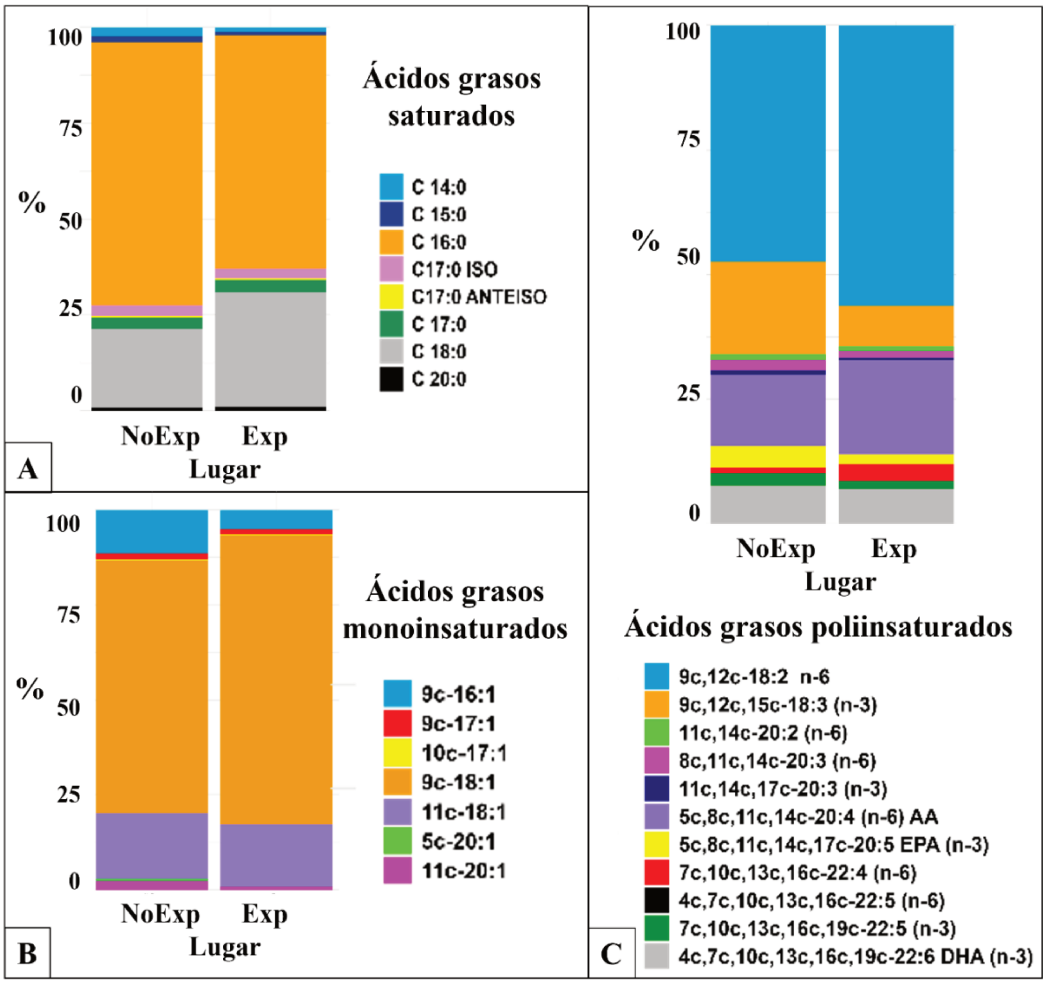

Figura 53. Distribución porcentual de ácidos grasos saturados (A), monoinsaturados (B) y poliinsaturados (C) en yema residual de neonatos de *Caiman latirostris* provenientes de áreas controles no expuestas (NoExp) y áreas ambientalmente expuestas (Exp).

3.2.5. Histología de hígado, gónadas e intestino de *C. latirostris* provenientes de áreas ambientalmente expuestas y no expuestas

En los individuos provenientes de zonas sin exposición, se observaron grados de DV que oscilaron (S = 1) y moderado (S = 2). El parénquima hepático mostró una organización conservada, con una distribución normal del sistema portal (Figura 54-A). En los individuos provenientes de áreas expuestas se observaron grados de DV severa (S = 3) con distribución focal. Dichas alteraciones fueron compatibles con procesos inflamatorios y daño tisular temprano. Además, se identificaron regiones con un marcado desarrollo de fibras de colágeno, principalmente asociadas al sistema portal, junto con focos de infiltración celular compuestos por linfocitos y eosinófilos, indicando un cuadro de

inflamación portal nodular focal (Figura 54-B-F). Estas lesiones no se observaron en los cortes de hígado de neonatos de áreas no expuestas (Figura 54-A). Adicionalmente, en las muestras provenientes de individuos de áreas expuestas se observó una mayor abundancia de células de Kupffer cargadas con hemosiderina, lo que indica una actividad fagocítica incrementada, en comparación con las muestras de áreas no expuestas (Figura 54).

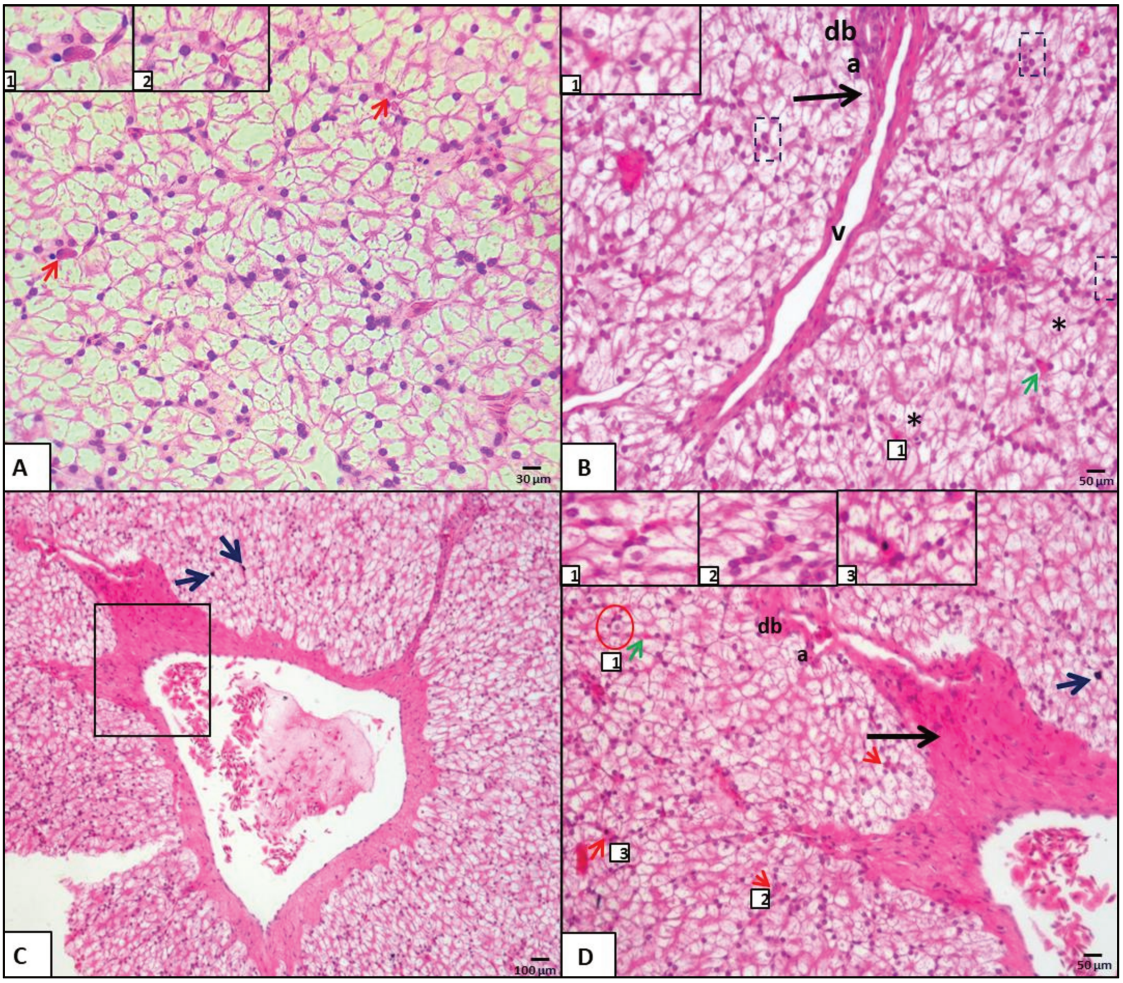

Figura 54. Micrografías de hígado de neonatos de *Caiman latirostris* provenientes de áreas no expuestas (A) y ambientalmente expuestas (B-F).

(A) Eosinófilos localizados en sinusoides hepáticos (flecha roja). (B-F) Muestras de áreas expuestas evidencian alteraciones histológicas: desarrollo marcado de fibras de colágeno asociadas a la tríada portal [vena (v), ducto biliar (db) y arteria (a)], con sectores de necrosis hepatocelular (*). Se observa infiltración de eosinófilos en espacio extravascular (flechas rojas), núcleos picnóticos (cuadrado negro) y células estrelladas (flechas verdes). Melanomacrófagos se identifican en el parénquima hepático (flechas azules), especialmente en torno a la vena central y tejido conjuntivo portal. H-E; 40X.

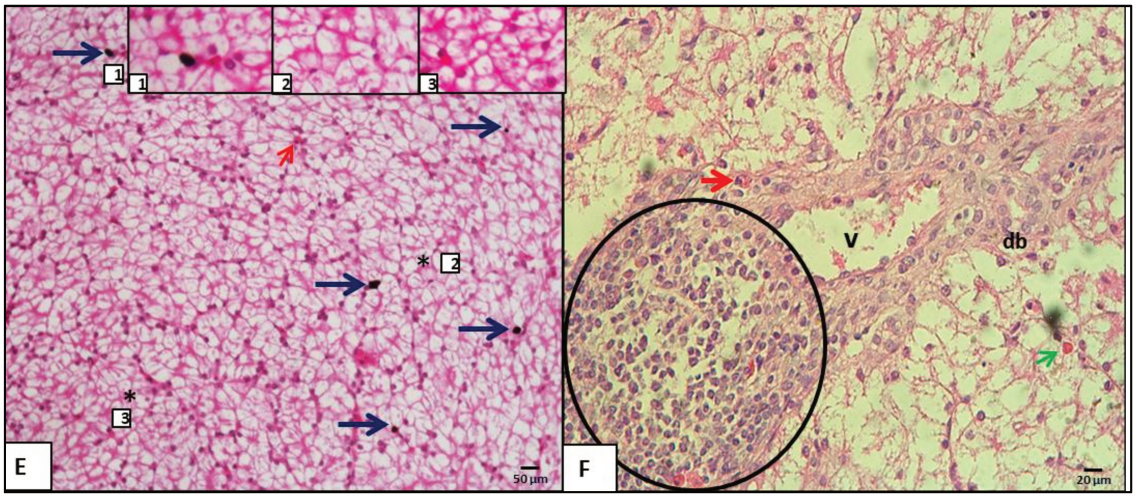

Figura 54. Micrografías de hígado de neonatos de Caiman latirostris provenientes de áreas no expuestas (A) y ambientalmente expuestas (B-F). (E) Eosinófilos localizados en sinusoides hepáticos (flecha roja). (B-F) Muestras de áreas expuestas evidencian alteraciones histológicas: desarrollo marcado de fibras de colágeno asociadas a la tríada portal [vena (v), ducto biliar (db) y arteria (a)], con sectores de necrosis hepatocelular (*). Se observa infiltración de eosinófilos en espacio extravascular (flechas rojas), y células estrelladas (flechas verdes). Melanomacrófagos se identifican en el parénquima hepático (flechas azules). (F) Foco de células del sistema inmune compatibles con linfocitos (círculo negro) y eosinófilos (flechas rojas), reclutados en proximidad al tejido conectivo denso (flecha negra). H-E; 40X.

Los resultados preliminares evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de lípidos acumulados en el tejido hepático de neonatos de *Caiman latirostris*, con valores menores en aquellos provenientes de áreas ambientalmente expuestas (26,84 ± 1,04**)** en comparación con los neonatos de áreas no expuestas (42,58 ± 0,89; χ^2 = 112,500; $p < 0,001$).

En las gónadas de hembras no expuestas se evidenció una estructura conservada, con lagunas de tamaño normal, distribución homogénea y ovocitos en distintos estadios de desarrollo (Figura 55-A), así como un oviducto de epitelio homogéneo, con escasas estructuras de tipo *buds* no predominantes (Figura 55-B). En contraste, las hembras recién nacidas provenientes de áreas expuestas mostraron un desarrollo folicular sin alteraciones evidentes en la progresión ovocitaria, aunque se identificaron focos celulares con de núcleos basófilos compatibles con linfocitos, sugiriendo infiltración inmune focal (Figura 55-C). Además, el epitelio del oviducto evidenció invaginaciones *buds* más marcada y desorganización en la arquitectura luminal (Figura 55-D). En los machos, tanto en áreas

control como expuestas se identificaron túbulos seminíferos, sin embargo, en individuos de áreas expuestas se observó un aumento del espacio luminar y presencia de células con morfología compatible con necrosis, en comparación con los individuos de las áreas sin exposición (Figura 56-A y B). No obstante, estos resultados son preliminares.

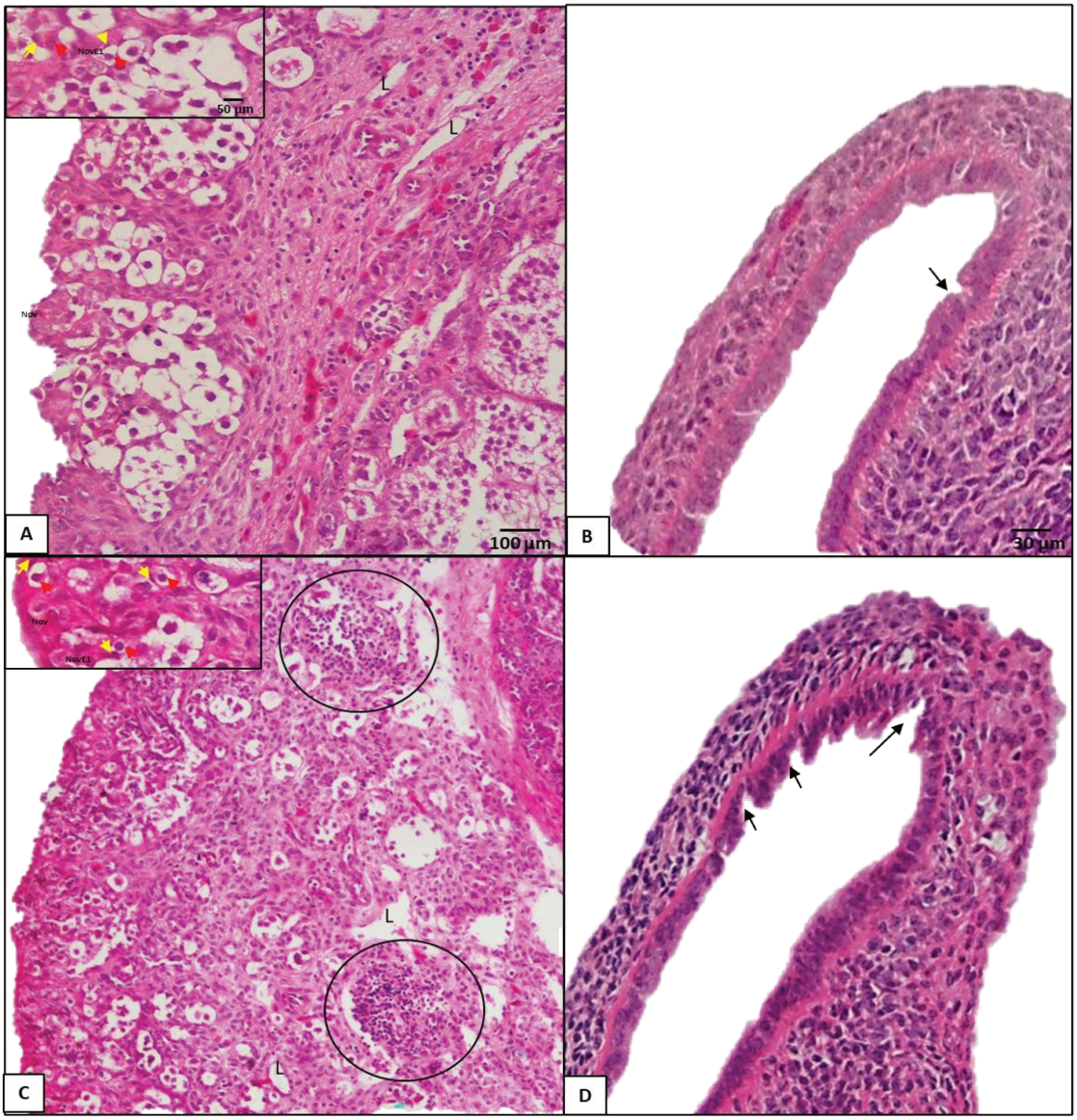

Figura 55. Micrografías de ovario de neonatos de *Caiman latirostris* provenientes de áreas no expuestas (A y B) y ambientalmente expuestas (C y D).

El recuadro indica una sección puntual del ovario magnificado para mayor visualización de los ovocitos. A: Tejido germinal, evidenciando el sistema lagunar (L) de tamaño conservado; B: oviducto, flecha negra indica un *buds* de pequeño tamaño en el epitelio. C: Tejido germinal, se indican L además de focos de células inmunes (círculo negro). D: oviducto indicando *buds* y una marcada alteración en la organización del epitelio luminal (flecha negra). H-E; 40X.

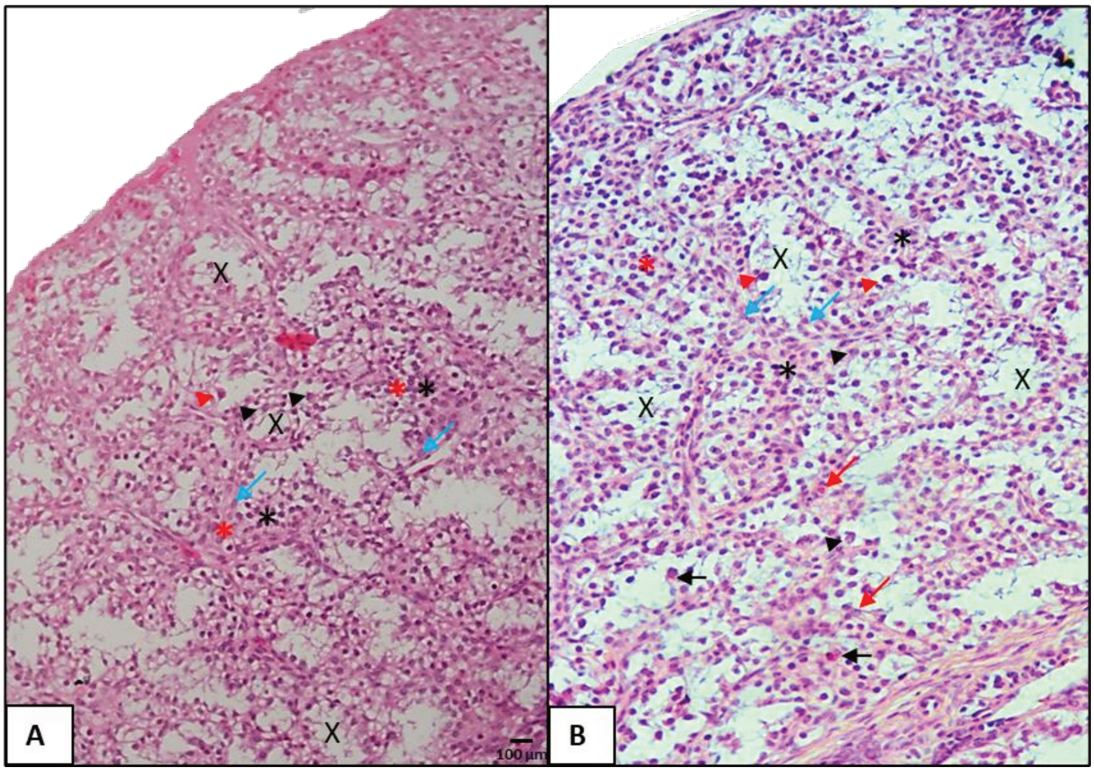

Figura 56. Micrografías de testículo de neonatos de *Caiman latirostris* proveniente de un área no expuesta (A) y ambientalmente expuesta (B).

Amplitud de túbulos seminíferos (X), células del sistema inmune eosinófilos (flecha negra), célula necrosada (flecha roja), intersticio (asteriscos negros), células de Leydig (asteriscos rojos), células de Sertoli (flechas celestes), espermatogonias A (puntas de flechas negras), espermatogonias B (punta de flechas rojas). H-E; 40X.

Al analizar las muestras de intestino de neonatos provenientes de áreas no expuestas, se observó una arquitectura intestinal conservada, con vellosidades bien definidas, lámina propia organizada y ausencia de infiltrado inflamatorio denso, edema o fibrosis (Figura 57-A). En contraste, los neonatos ambientalmente expuestos, presentaron alteraciones focales en la integridad de la mucosa, evidenciadas por la presencia de espacios subepiteliales claros entre la lámina propia y el epitelio de las vellosidades. Estas áreas, visualizadas como regiones blanquecinas en la tinción H-E, podrían corresponder a edema subepitelial o inicio de desprendimiento epitelial, indicativo de una lesión ulcerativa, potencialmente reversible, asociado a mecanismos inflamatorios o tóxicos incipientes (Figura 57-B). En muchos casos, estas lesiones se encontraron acompañadas por un infiltrado de células mononucleares en la lámina propia.

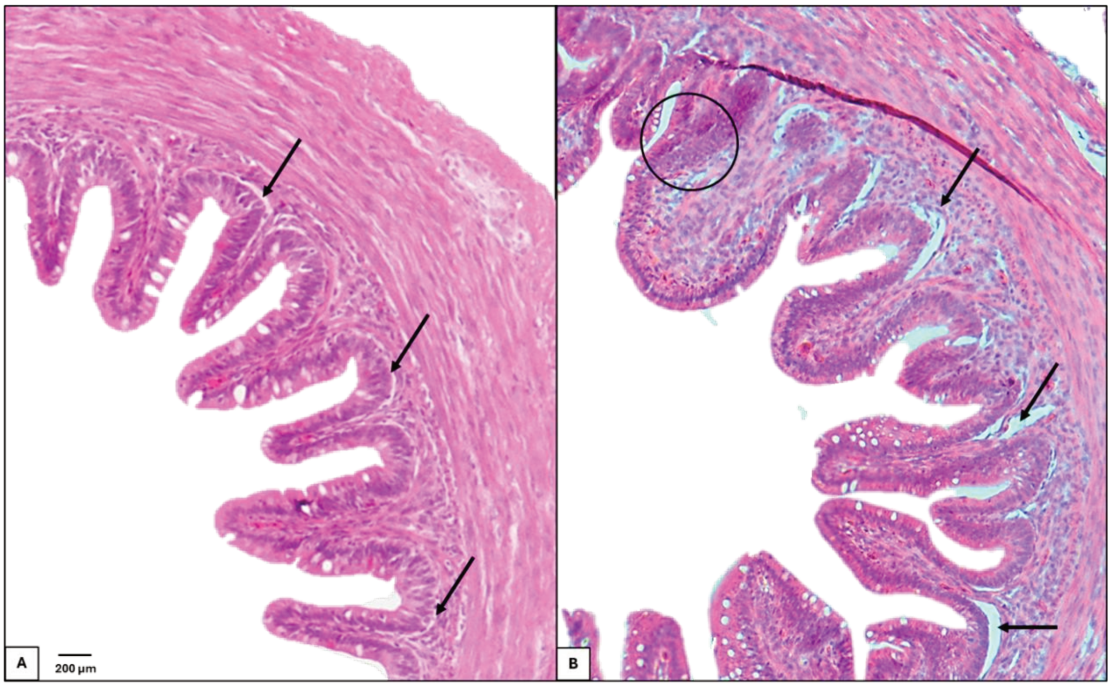

Figura 57. Micrografía de intestino de neonatos de *Caiman latirostris* proveniente de un área control (A) y ambientalmente expuesto (B).

En A, las flechas negras indican conservada organización de la lámina propia. En B, los círculos en color negro indican áreas con acumulación focal de células mononucleares basófilas, compatibles con infiltrado inflamatorio; flechas negras indican espacios blanquecinos entre la lámina propia y el epitelio columnar de las vellosidades. H-E; 40X.

3.2.6. Análisis multivariado del estado metabólico en animales de áreas ambientalmente expuestas y no expuestas (OE7)

Se realizó un análisis de PCA considerando exclusivamente a las crías provenientes de las distintas áreas evaluadas. Para este análisis se incluyeron como variables los niveles TG, CL, las actividades en sangre de GOT y GPT, la expresión génica relativa de *g6pdh* y *me*, los niveles de LPO (TBARS) y el índice de CC.

Los dos primeros componentes principales explicaron el 27,9 % (dimensión; Dim1) y el 16,7 % (Dim2) de la variación total observada en los datos. En el espacio definido por estos ejes, se distinguen los individuos Expuestos y No expuestos, representados por puntos rojos y verdes, respectivamente. Las elipses de confianza al 95 % para cada grupo muestran el agrupamiento relativo de los neonatos dentro de cada condición (Figura 58).

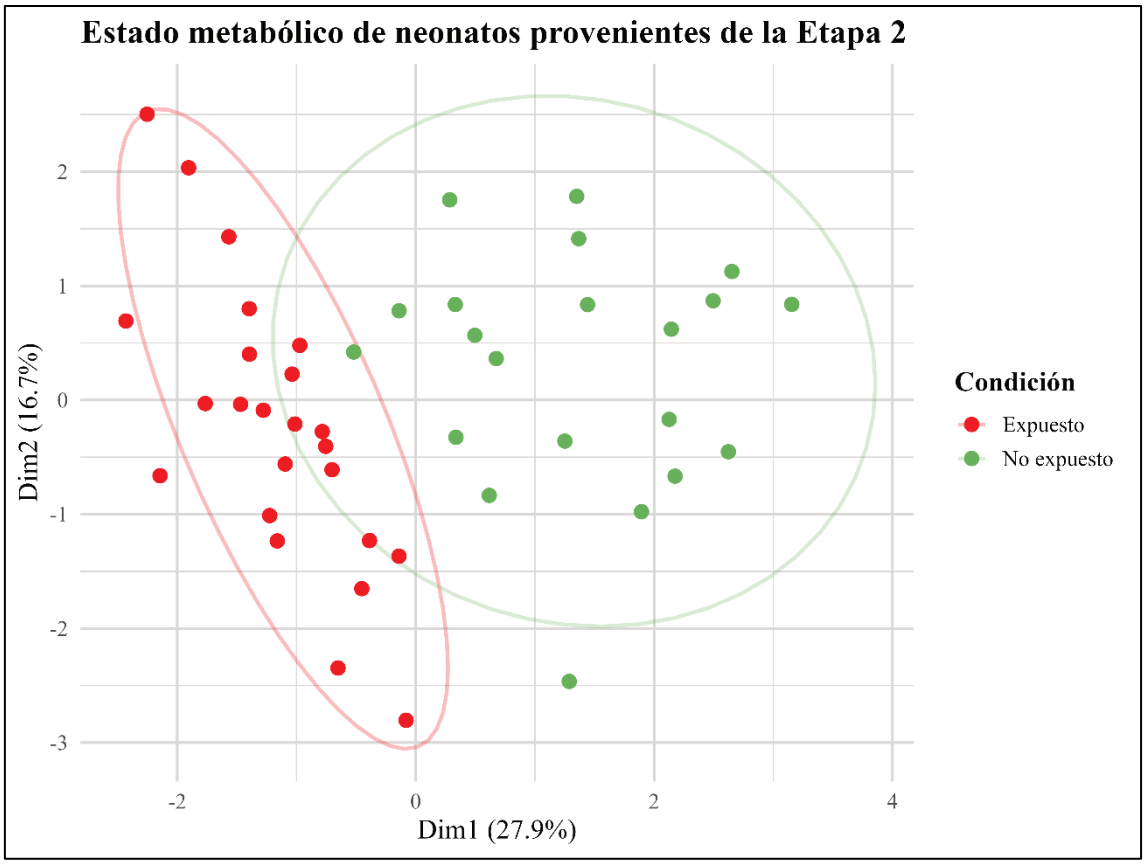

Figura 58. Análisis de componentes principales (PCA) basado en parámetros metabólicos de neonatos de *Caiman latirostris* proveniente de un área sin exposición y ambientalmente expuesto.

Triglicéridos, colesterol, actividad de GOT, expresión génica en sangre de *g6pdh* y *me*, niveles de lipoperoxidación lipídica y condición corporal. Los dos primeros componentes principales (Dim1 y Dim2) explican el 16,7 % y 27,9 % de la variación total, respectivamente. Los puntos representan crías (círculos) y los colores distinguen los grupos Expuesto y No expuesto, y las elipses corresponden a intervalos de confianza del 95 % para cada condición.

En los casos en los que se contaba con muestras de la hembra con su respectiva nidada se realizó un PCA utilizando como variables aquellas que mostraron diferencias significativas entre los grupos expuestos y no expuestos, incluyendo el contenido de TG, CL, la actividad de la enzima GOT, y la expresión génica en sangre de *g6pdh* y *me*. Los dos primeros componentes explicaron el 40,3 % y 30,1 % de la variación total, respectivamente. En el plano definido por Dim1 y Dim2 se observó una separación visual entre los individuos de los grupos Expuesto y No expuesto (Figura 59). Las crías se representaron con círculos y las hembras con triángulos, lo que permitió distinguir ambos tipos dentro de cada condición. Las elipses de confianza al 95 % mostraron un agrupamiento interno claro de los individuos correspondientes a cada condición.

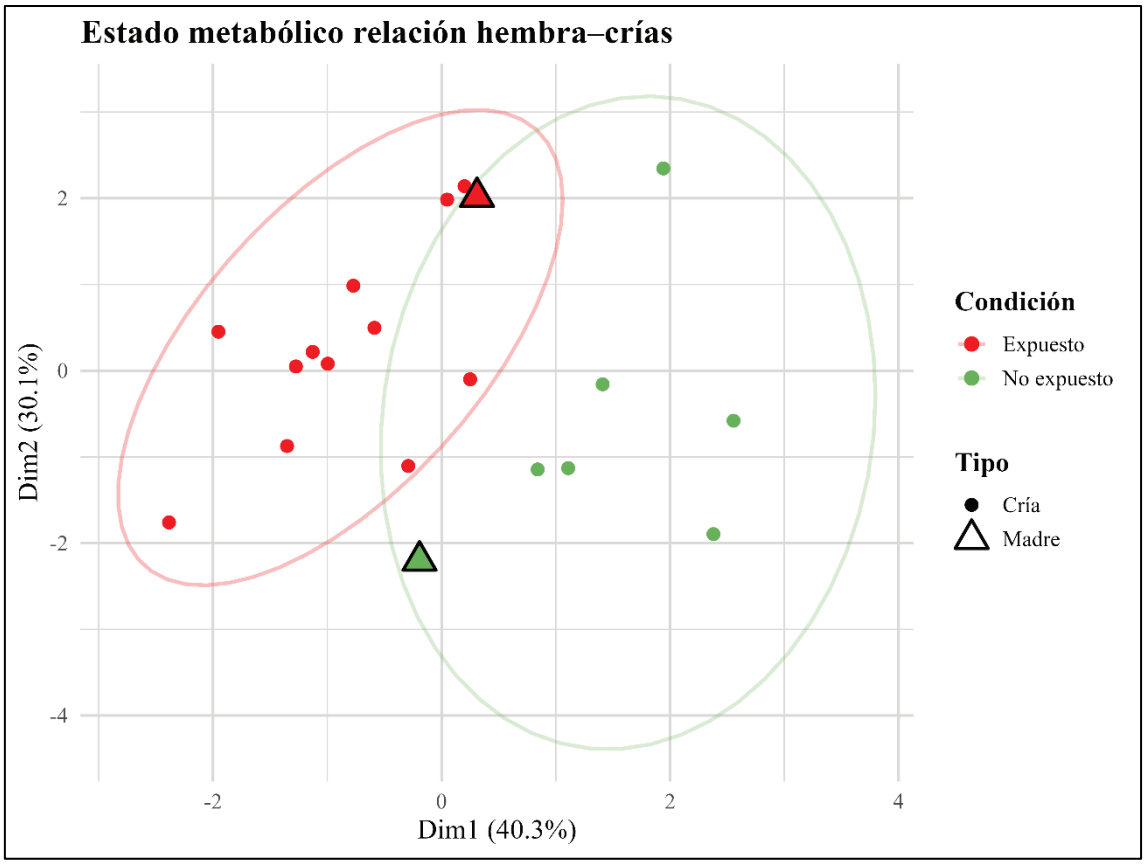

Figura 59. Análisis de componentes principales (PCA) basado en el estado metabólico de hembras y su relación con sus respectivas nidadas.

Basado en los parámetros de triglicéridos, colesterol, actividad de GOT y expresión génica en sangre de *g6pdh* y *me*. Los dos primeros componentes principales (Dim1 y Dim2) explican el 40,3 % y 30,1 % de la variación total, respectivamente. Los puntos representan crías (círculos) y las madres se indican con triángulos. Los colores distinguen los grupos Expuesto y No expuesto, y las elipses corresponden a intervalos de confianza del 95 % para cada condición.

4. Discusión

4.1. Etapa 1

4.1.1. Éxito de eclosión

Las modificaciones en parámetros del desarrollo como el éxito de eclosión, el tamaño corporal al nacer y el crecimiento postnatal en *Caiman latirostris*, se consideran importantes por su relevancia ecológica y funcional ya que permiten evaluar alteraciones fenotípicas derivadas de la exposición temprana a contaminantes, y reflejan con sensibilidad los efectos de disrupciones metabólicas o del desarrollo.

El éxito de eclosión se encuentra fuertemente asociado a la inversión materna, y a su vez, condicionado por las características fisiológicas de la hembra y las condiciones ambientales a las que estuvo expuesta durante la vitelogénesis (Rauschenberger y col., 2007). Posteriormente a la postura, el éxito del proceso depende también de los factores ambientales que prevalecen durante la incubación (Nilsen y col., 2020). En los cocodrilianos, la inversión materna se refleja principalmente en la composición de la yema, que constituye la principal fuente de energía, lípidos estructurales, antioxidantes y micronutrientes esenciales para el desarrollo embrionario (Speake y col., 1999; Leiva y col., 2018). Además, el patrón de consumo de esta energía ha sido propuesto como un indicador del estado de salud embrionario (McKeegan y Sturmey, 2011), mientras que las características fisicoquímicas de la yema reflejan el estado nutricional y metabólico de la madre, así como su exposición a factores ambientales como disponibilidad trófica, estrés térmico o xenobióticos (Nelson y col., 2010).

En el marco de esta tesis doctoral, algunas formulaciones testeadas como 2,4-D al 0,06 %, CAP al 0,03 % e IMI al 0,2 %, disminuyeron significativamente la tasa de eclosión en la T2022. Este efecto no fue evidente en T2021, lo que sugiere una posible sensibilidad particular vinculada a los nidos seleccionados para los experimentales en cada caso. No obstante, la afectación del éxito de eclosión por exposición temprana a contaminantes ambientales ha sido documentada previamente en *Alligator mississippiensis*. En esta especie, las exposiciones a plaguicidas, metales pesados como el mercurio y condiciones de estrés ambiental, como las sequías, han sido asociadas a disminuciones en el número

de neonatos viables (Rauschenberger y col., 2004, 2007, 2009; Eversole y col., 2013; Johnson y col., 2023). Estos antecedentes respaldan la sensibilidad del periodo embrionario en crocodílidos ante perturbaciones ambientales, sugiriendo que modificaciones en las condiciones del microambiente de incubación o la carga tóxica pueden influir decisivamente en el éxito de eclosión, un componente fundamental en el éxito reproductivo (Eversole y col., 2013). Además, estudios realizados en áreas contaminadas, como el lago Apopka (Florida, Estados Unidos), mostraron que, aun cuando las tasas de eclosión no se ven reducidas, pueden presentarse alteraciones post-embrionarias que comprometen la viabilidad de los neonatos (Milnes y col., 2005).

4.1.2. Parámetros de crecimiento

El estudio de Poletta y col. (2011) representa uno de los primeros trabajos realizados en condiciones seminaturales en el que se demostró que la exposición *in ovo* a formulaciones de plaguicidas, incluso a concentraciones recomendadas para su aplicación en campo, como GLI solo o en combinación con endosulfán (END) y cipermetrina (CIP), puede inducir no solo daño genético y alteraciones enzimáticas, sino también un retraso en el crecimiento postnatal temprano en *C. latirostris*. Este efecto se manifestó en una reducción significativa de la longitud total tanto en neonatos como en juveniles de tres meses de edad (Poletta y col., 2011). Aunque estos efectos parecieron revertirse al alcanzar el año de vida, los autores advirtieron sobre el riesgo de exposición repetida bajo condiciones naturales, lo que podría impedir dicha recuperación y comprometer la supervivencia y el éxito reproductivo de las poblaciones silvestres.

En el presente trabajo de tesis, no se observaron cambios significativos en las variables morfológicas tras la exposición *in ovo* a las FA evaluadas en los ensayos T2021 y T2022. No obstante, la exposición sub-crónica *in vivo* durante 60 días sí evidenció efectos significativos en pichones de seis meses de edad expuestos a GLI 2 %, 2,4-D 0,12 %, CAP 0,03 %, IMI 0,2 % y a la mezcla M2. En este ensayo, se observó un incremento en la condición corporal (CC) en dichos tratamientos, efecto que no se registró en el grupo control ni en las mezclas M1 y M3. El aumento evidente del índice de CC y la alteración de los parámetros metabólicos observados en todos los tratamientos con compuestos individuales y en la mezcla M2 coincide con evidencia previa que indica que estos plaguicidas pueden promover adiposidad (Grün y Blumberg, 2007; Yuan y col., 2020;

Chen y col., 2022; Miranda y col., 2022). La M2 mostró la falta de interacción entre sus compuestos constituyentes, ya que la CC obtenida por los animales fue muy similar a la de CAP e IMI. En contraste, las mezclas M1 y M3 mantuvieron la CC a pesar de haberse detectado ciertas alteraciones metabólicas, lo que sugiere interacciones específicas entre los principios activos (p.a.) que modifican el metabolismo de lípidos y glucosa, ejes centrales en determinación de la CC en cocodrilianos (Moleón y col., 2022; Gama y col., 2025). Este patrón es consistente con una posible reasignación de energía hacia procesos de biotransformación de xenobióticos y mitigación del estrés oxidativo, los cuales restringen la deposición lipídica (Levesque y col., 2002), conduciendo así a una disrupción metabólica sin incrementos en la CC. De manera similar, estudios en pichones de aves y en reptiles han reportado que una mayor carga de mezclas de plaguicidas en el ambiente se asocia con menores índices en la CC (Araujo y col., 2024; Gama y col., 2025; Fuentes y col., 2025).

Asimismo, los niveles de CC en M1 y M3 fueron significativamente inferiores a los observados en el tratamiento con 2,4-D, lo que refuerza la hipótesis de que la exposición a mezclas puede modular las respuestas fisiológicas de manera diferencial respecto a la exposición a compuestos individuales. El grupo CN, no expuesto a plaguicidas, mostró un aumento leve del índice de CC durante el período de 60 días, lo cual es consistente con reportes que indican que ventanas experimentales cortas a moderadas pueden generar cambios limitados en el crecimiento en cocodrilianos bajo condiciones de densidad controlada (Poletta y col., 2008). En dicho estudio, crías de *C. latirostris* de cinco meses, mantenidas durante 90 días, exhibieron crecimiento fuertemente limitado cuando se encontraban a una densidad de 0,04 m² por individuo, incluso con alimentación *ad libitum*. En nuestro caso, todos los grupos fueron mantenidos a 0,033 m² por individuo, lo que respalda la expectativa de cambios mínimos en la CC de los controles y refuerza que las diferencias observadas en la CC responden principalmente a la exposición a plaguicidas, y no a efectos del manejo.

4.1.3. Perfil de ácidos grasos, tocoferoles y colesterol en yema residual basal y post-exposición embrionaria

En el presente estudio, el perfil de ácidos grasos (AG) basal en la yema residual de neonatos de *C. latirostris* provenientes de áreas controles mostró una predominancia de

los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), destacándose el ácido oleico (C18:1n9c), seguido por el palmítico (C16:0) y el linoleico (C18:2n6c). Esta distribución coincide parcialmente con lo reportado para la especie por Leiva y col. (2018), quienes analizaron huevos de estadio inferiores al 5 (según Iungman y col., 2011), provenientes de poblaciones silvestres y hallaron que estos tres AG representaban cerca del 76 % del total, siendo el AG oleico el más abundante. Sin embargo, en nuestro caso se observaron diferencias notables en las proporciones relativas de ciertos AG saturados (AGS), como el mirístico (C14:0) y el esteárico (C18:0), los cuales presentaron valores superiores a los reportados por Leiva y col. (2018), posiblemente reflejando la movilización de lípidos en la última etapa desarrollo embrionario.

Asimismo, se registraron niveles de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) esenciales como el araquidónico (AA; C20:4 n-6), cuya proporción en la yema basal de neonatos de *C. latirostris* (2,71 ± 0,21 %) coincide con lo reportado por Leiva y col. (2018) en huevos fértiles de la misma especie, donde se destacó la abundancia relativa de este ácido como un rasgo clave del patrón lipídico materno. Esto se debe a que el embrión depende del AA depositado en la yema, por lo que su concentración refleja directamente la capacidad materna de proveer los recursos lipídicos necesarios para el desarrollo (Patino-Martínez y col., 2025). Los AGPI son componentes fundamentales durante el desarrollo embrionario en reptiles y aves, dado su rol estructural en la síntesis de membranas celulares y funcional en tejidos en crecimiento, la modulación de la respuesta inflamatoria y la generación de moléculas señalizadoras derivadas del AA, como los eicosanoides (Navarro y col., 2001; Lábaque y col., 2013). En nuestro estudio, los niveles de AA en *C. latirostris* fueron inferiores a los reportados en *A. mississippiensis*, donde Noble y col. (1991, 1993a) hallaron proporciones superiores al 5 % en fosfolípidos de membrana. Esta diferencia podría atribuirse a variaciones interespecíficas en la dieta, el metabolismo y los factores ambientales que influyen sobre la fisiología de la hembra. No obstante, dado el papel crítico del AA como precursor de eicosanoides y modulador de la diferenciación celular, su provisión adecuada resulta indispensable para la correcta progresión de procesos morfogenéticos, inmunológicos y metabólicos en etapas embrionarias. En este sentido, Cantu y col. (2016) enfatizaron que alteraciones en la concentración relativa de AA en el hígado y cerebro de aligátores, pueden inducir desbalances en la señalización inflamatoria, disrupciones en la expresión génica y compromiso en la función inmune. Por tanto, el análisis del contenido de AA en la yema residual no solo permite establecer

referencias del estado nutricional materno, sino que también constituye una herramienta sensible para detectar efectos subletales asociados a exposiciones ambientales tempranas, como los evaluados en este trabajo.

El análisis del perfil lipídico en la yema residual de neonatos de *C. latirostris* reveló que la exposición embrionaria a distintas formulaciones de agroquímicos provocó alteraciones específicas en la composición de AG, afectando principalmente a los AGPI. Según Mentesana y col. (2021), el perfil de AGPI en la yema, tanto de la familia omega-3 como omega-6, constituye un indicador sensible del estado de salud y viabilidad en aves silvestres, dada su implicancia en el desarrollo embrionario, la inmunocompetencia y la plasticidad fisiológica. Además, otros autores destacan la importancia de los AGPI durante la embriogénesis por su función estructural, señalizadora y como precursores de moléculas bioactivas (Navarro y col., 2001; Lábaque y col., 2013; Xiao y col., 2020). En este contexto, las alteraciones observadas tras la exposición embrionaria a plaguicidas podrían reflejar interferencias en las rutas metabólicas de elongación y desaturación, o bien en los mecanismos de transferencia materno-embrionaria de lípidos, con consecuencias potenciales sobre la homeostasis inmunometabólica de la descendencia. Desde una perspectiva funcional, la disponibilidad de estos lípidos en la yema condiciona la programación metabólica del embrión y puede influir en la calidad lipídica y fisiológica post-eclosión (Xiao y col., 2020; Blackburn y col., 2021). En línea con esta interpretación, Patino-Martínez y col. (2025) reportaron que los niveles de AGPI omega-3 y omega-6 en yemas de huevos de la tortuga *Dermochelys coriacea* se asociaron significativamente con contaminantes orgánicos persistentes (POPs), destacando cómo la exposición ambiental puede alterar la composición lipídica del huevo y comprometer el éxito reproductivo.

Por otra parte, en el presente estudio la menor concentración de colesterol encontrada en la yema (CLy) residual de neonatos expuestos al CAP 0,03 % en comparación con el grupo control y con las mezclas M2 e M3, demostraría un posible efecto disruptivo del insecticida CAP sobre este componente lipídico cuando se encuentra solo, y parcialmente compensado en combinaciones con otros compuestos.

El CLy es un lípido esencial durante el desarrollo embrionario debido a su rol como componente estructural de las membranas celulares, donde modula su fluidez y funcionalidad, mejora la estabilidad de los compartimentos celulares y participa en

diversos procesos fisiológicos. Por ello, su adecuada disponibilidad resulta crítica durante la embriogénesis (Nagle y col., 1998; Blackburn y col., 2021). La biodisponibilidad del CLy, al igual que la de otros nutrientes en el vitelo, está profundamente influenciada por el estado fisiológico materno y por factores ambientales que afectan la vitelogénesis (Jones y col., 2011). Se ha demostrado que condiciones como la edad o las deficiencias nutricionales de la hembra pueden alterar drásticamente la composición del huevo, incrementando la mortalidad embrionaria en aves y reptiles (Noble y col., 1993a). Asimismo, el metabolismo del CLy en el embrión, puede verse afectado por la temperatura de incubación, que también modula el crecimiento, la pigmentación y la determinación sexual en aligátores (Noble y col., 1993b). Sin embargo, este factor fue controlado en el diseño de exposición del presente estudio, por lo que las diferencias observadas en los niveles de CLy se atribuyen de forma más directa a la acción de los plaguicidas sobre el metabolismo lipídico embrionario.

Además, la concentración de tocoferoles fue menor en el tratamiento M3 respecto al grupo control, lo que sugiere una posible interferencia de la mezcla de plaguicidas sobre los mecanismos de transferencia, estabilidad o utilización de estos antioxidantes durante el desarrollo embrionario. Los tocoferoles, y en particular el α-tocoferol, son formas bioactivas de vitamina E con funciones críticas como antioxidante lipofílico, neutralizando radicales libres y protegiendo estructuras celulares susceptibles a la peroxidación lipídica, como las membranas enriquecidas en AGPI durante la embriogénesis (Dierenfeld y col., 2002; Xiao y col., 2020). Esta hipótesis se ve respaldada por observaciones en el camaleón *Furcifer pardalis*, donde Dierenfeld y col. (2002) documentaron una disminución progresiva de α-tocoferol a lo largo del desarrollo embrionario, reflejando su utilización en mecanismos de defensa antioxidante. La menor concentración observada en M3 podría reflejar un efecto sinérgico que intensifica la peroxidación lipídica o limita la disponibilidad de estos compuestos en el vitelo, como ha sido reportado en vertebrados ovíparos expuestos a contaminantes ambientales (Hermann y col., 2000; Nilsen y col., 2020). En *Caiman crocodilus* y la tortuga *Trachemys scripta*, la deficiencia de tocoferoles se asoció a condiciones patológicas como esteatosis, necrosis grasa y daño muscular, lo cual refuerza la importancia de su adecuada incorporación durante el desarrollo embrionario (Frye y Schelling, 1973; Leineweber y col., 2025).

Como se evidencia en los datos obtenidos a partir de la yema residual de neonatos expuestos, existe una relación consistente entre la perturbación del metabolismo lipídico, incluyendo AGPI, CLy y tocoferoles con la exposición a mezclas plaguicidas formulados. Esta alteración bioquímica es coherente con lo reportado por Beale y col. (2022a, b), quienes demostraron que la exposición parental a contaminantes ambientales puede interferir con la transferencia materna de lípidos esenciales hacia el embrión, reflejado en un deterioro en la calidad del vitelo y la programación metabólica temprana. De manera similar, exposiciones a contaminantes persistentes como los sustancias perfluoroalquiladas (PFAS) también han mostrado impactos sobre la homeostasis lipídica en el huevo y en los tejidos embrionarios (Chen y col., 2020; Sen y col., 2021). Estas perturbaciones pueden mediar los efectos adversos de los contaminantes sobre el crecimiento fetal, como lo evidencian estudios en embriones de *G. gallus*, donde una reducción en la calidad del contenido lipídico durante la formación oviductal del huevo y su incubación afecta negativamente la integridad del tejido hepático embrionario, así como la salud postnatal de la progenie (Jacobsen y col., 2018). Estas observaciones refuerzan el valor del perfil lipídico de la yema como biomarcador funcional sensible a exposiciones tempranas, tal como postula Beale y col. (2022b), y señalan que las alteraciones detectadas podrían tener consecuencias directas sobre la homeostasis inmunometabólica, desarrollo embrionario óptimo y el estado fisiológico de los neonatos.

4.1.4. Metabolitos lipídicos indicadores de actividad hepática

En este trabajo de tesis, se observaron efectos negativos sobre el metabolismo de lípidos y de la glucemia en *C. latirostris* tras la exposición *in ovo*- e *in vivo* a las formulaciones de agroquímicos testeados.

Los TG constituyen una fuente primaria de energía en reptiles, y sus niveles pueden fluctuar debido a variaciones estacionales o a la exposición a estresores ambientales (Levesque y col., 2002; Huang y col., 2017; Chacón y col., 2024). En los ensayos de exposición *in ovo* T2021 y T2022 se observaron menores niveles plasmáticos de TG en varios tratamientos respecto al grupo control. Los tratamientos con GLI 2 %, 2,4-D 0,12 %, CAP 0,03 %, IMI 0,2 % y las mezclas M2 y M3 coincidieron en presentar concentraciones de TG en valores inferiores a los observados en el grupo control en ambas réplicas experimentales (a excepción del 2,4-D para el cual el efecto se dio solo en

T2022). Esta repetibilidad indicaría un efecto consistente de estos compuestos y sus combinaciones sobre el metabolismo lipídico durante el desarrollo embrionario. Además, estos resultados fueron observados a la mitad de la concentración usualmente aplicada para los herbicidas GLI y 2,4-D (1 y 0,06 %, respectivamente), indicando un efecto incluso a bajas concentraciones de estos herbicidas. El impacto sobre los niveles de TGs debido a la exposición de plaguicidas durante del desarrollo embrionario también fue reportado en peces por Heusinkveld y col. (2024), quienes demostraron que la exposición embrionaria en *Danio rerio* a insecticidas neonicotinoide induce acumulación de TGs hepáticos, favoreciendo al desarrollo de esteatosis. Contrariamente a este resultado, donde la exposición promovió acumulación de lípidos hepáticos, en nuestro estudio la exposición a las FA durante la embriogénesis resultó en una disminución de TG plasmáticos post-eclosión. Este hallazgo podría reflejar una inhibición de la síntesis lipídica, un aumento en la utilización de lípidos como fuente energética ante estrés oxidativo, o una interferencia sobre factores de transcripción como *ppar*. Cabe destacar que no evaluamos los niveles hepáticos de TG, aunque sí analizamos la expresión de genes sensores de lípidos como los *ppar*, lo cual se discute más adelante. En este sentido, los niveles de expresión de *pparα* y *pparγ* acompañaron estos resultados, mostrando alteraciones significativas frente a los tratamientos que sugieren una modulación transcripcional asociada a la regulación del metabolismo lipídico. Estos resultados refuerzan la idea de que la etapa embrionaria representa una ventana crítica de sensibilidad metabólica frente a contaminantes, y que los plaguicidas evaluados, tanto individuales como en mezcla, pueden alterar significativamente la homeostasis lipídica en especies no objetivo desde las primeras etapas del desarrollo.

Contrariamente, en el experimento de exposición sub-crónica *in vivo*, los niveles de TG tendieron a aumentar en los tratamientos con GLI (+ 177 %), 2,4-D (+ 192 %) y CAP (+ 133 %) en comparación con el grupo control; mientras que en M3 el valor fue similar (+ 171 % mayor que el CN) pero sin diferencias significativas probablemente por la variabilidad de los datos en este grupo. Además, los resultados evidenciaron que en M1 las concentraciones de TG fueron notablemente más bajas que en los tratamientos individuales con GLI y 2,4-D, lo que sugiere un posible efecto antagónico entre ambos herbicidas sobre el metabolismo lipídico. Un efecto similar se observa en la mezcla M2, ya que el tratamiento con CAP 0,03 % produjo niveles significativamente mayores de TGs (+ 244,4 % comparado con la M2), este efecto no se mantuvo cuando CAP se

administró en combinación con IMI, indicando que la respuesta metabólica se modifica en presencia de ambos principios activos. Según Levesque y col. (2002), la detoxificación representa un proceso fisiológicamente costoso, por lo que el aumento de TG plasmáticos podría estar relacionado con la necesidad de sustento energético para llevarlo a cabo.

En cuanto a los niveles de colesterol total (CL) en plasma, si bien los resultados no fueron completamente consistentes entre todos los tratamientos en los ensayos de exposición embrionaria, se evidenció una mayor concentración de CL en los tratamientos con GLI 2 % y CAP 0,03 %, efecto que se mantuvo en ambas réplicas experimentales (T2021 y T2022). En el ensayo T2022, también se observaron concentraciones más altas en otros tratamientos, destacándose 2,4-D 0,12 %, IMI 0,2 %, así como las mezclas M1 y M2. Esta respuesta señala una posible estimulación del metabolismo o del transporte de CL inducida por la exposición temprana a estos compuestos.

Particularmente interesante es el caso del tratamiento con CAP 0,03 %, donde se observó un aumento en el CL plasmático, en contraste con la reducción CLy. Esta respuesta no se replicó en los demás tratamientos, donde las concentraciones de CLy permanecieron estables a pesar del aumento plasmático. En concordancia con esto, se observó una reducción significativa en la expresión hepática de *srebp-1c* en el mismo tratamiento. Este factor transcripcional, clave en la regulación de la síntesis endógena de CL y AG, podría estar respondiendo a un mecanismo de retroalimentación negativa frente al incremento de CL circulante. Esto refuerza la hipótesis de que CAP induciría una alteración en la dinámica de transporte y utilización del CL, promoviendo una movilización prematura o excesiva del CLy vitelino hacia la circulación embrionaria. Esta redistribución se traduciría en concentraciones plasmáticas elevadas pero una menor disponibilidad en la yema, acompañada de la inhibición de la síntesis endógena mediada por *srebp-1c*. Dado que el metabolismo del CL es esencial en la esteroidogénesis, especialmente en la diferenciación de tejidos regulados por señales hormonales, así como en la síntesis de glucocorticoides necesarios para los procesos fisiológicos que acompañan la eclosión (Vajda y col., 1997; Thomson y Speake, 1999; Jones, 2011), la alteración en la disponibilidad de CL inducida por CAP podría tener implicancias fisiológicas relevantes. Esta hipótesis también se ve respaldada por las características fisicoquímicas de CAP, cuya lipofilicidad favorece su disolución en medios lipídicos y su acumulación en tejidos grasos como el hígado, el tejido adiposo y las membranas celulares. En contraste, en los

demás tratamientos el aumento de CL en plasma podría responder a mecanismos compensatorios o de redistribución sin afectar las reservas de CLy en la yema.

Por otro lado, no se observaron alteraciones en la concentración plasmática de CL en el ensayo de exposición *in vivo.* Estos resultados son consistentes con los reportados por Yu y col. (2022), quienes evaluaron el impacto de CAP sobre lagartijas hembras de *Eremias argus* expuestas a CAP, y no observaron cambios en los niveles de TG ni de CL a concentraciones de 0,04 mg/kg de suelo; mientras que ambos parámetros disminuyeron a concentraciones de 0,2 y 1 mg/kg (Yu y col., 2022). Estos hallazgos contrastan parcialmente con nuestros resultados, ya que los niveles de TG fueron más elevados en animales expuestos sub-crónicamente a CAP y los niveles de CL se mantuvieron sin cambios. Considerando las diferentes etapas en las que los ejemplares de *C. latirostris* fueron expuestos a las FA, es posible inferir que la exposición durante el desarrollo embrionario ejerce un impacto más determinante sobre el metabolito CL. En contraste, durante la etapa post-eclosión, el CL tiende a desempeñar un rol más estructural y de regulación en la homeostasis lipídica, lo que podría explicar una menor sensibilidad de este parámetro a las alteraciones inducidas por la exposición en fases más avanzadas del desarrollo.

Respecto a los niveles de proteínas totales (PT), nuestros resultados mostraron niveles significativamente menores en el tratamiento con CAP 0,03 % en ambas temporadas (T2021 y T2022) en comparación con el grupo control, lo que indica un efecto consistente de este insecticida sobre este biomarcador plasmático. En la T2021 se observaron resultados con valores similares en tratamientos con concentraciones más bajas, como GLI al 1 %, CAP al 0,015 % e IMI al 0,1 %, aunque estos efectos no se replicaron en T2022. Estas variaciones interanuales podrían deberse a diferencias en la inversión materna, la calidad nutricional de los huevos o las condiciones microambientales durante la incubación. Sin embargo, los efectos observados en los tratamientos combinados M1 y M3, en comparación con sus respectivos compuestos individuales, fueron consistentes tanto en T2021 como en el ensayo sub-crónico *in vivo*, mostrando en ambos casos niveles significativamente inferiores de PT en las mezclas. Esta coherencia entre ensayos refuerza la hipótesis de que las interacciones antagónicas entre los principios activos presentes en M1 y M3 podrían atenuar o neutralizar los efectos que los compuestos ejercen individualmente sobre la síntesis o el metabolismo proteico.

Los niveles bajos en la concentración de PT evidenciados de manera sostenida en neonatos expuestos a CAP concuerda con lo reportado por Bantu y col. (2013), quienes observaron concentraciones significativamente menores de PT en peces expuestos a CAP. Este efecto fue interpretado como resultado de un aumento del catabolismo proteico para suplir las demandas energéticas derivadas del estrés, favoreciendo la gluconeogénesis. En este contexto, nuestros hallazgos en caimanes podrían reflejar un mecanismo similar, en el cual la movilización catabólica de reservas proteicas desde el hígado y el músculo esquelético contribuye a sostener la gluconeogénesis (Bantu y col., 2013). Asimismo, los niveles bajos de PT plasmática podrían indicar disfunción hepática que compromete la síntesis de proteínas como consecuencia de la exposición a plaguicidas (Khan y col., 2012).

En cambio, la exposición sub-crónica *in vivo* indujo niveles significativamente mayores de PT en los tratamientos con GLI 2 % y 2,4-D 0,12 % respecto al grupo control. Este incremento es coherente con escenarios de exposición crónica, que promueve una mayor síntesis de proteínas plasmáticas como respuesta compensatoria al costo energético y a las demandas de reparación tisular asociadas a la exposición a los plaguicidas (Javed y Usmani, 2015). Frente a la mezcla M1, estos tratamientos presentaron niveles de PT 32,0 % y 19,8 % mayores, respectivamente, lo cual apoya un posible efecto antagónico en M1. De forma similar, CAP e IMI presentaron niveles de PT 11,2 % y 26,9 % mayores, respectivamente, en comparación con M2. Asimismo, frente a M3, se observaron incrementos de 23,2 %, 11,7 % y 18,4 % en GLI, 2,4-D e IMI, respectivamente, sugiriendo una supresión metabólica asociada a las mezclas complejas de plaguicidas. Asimismo, estos hallazgos se relacionan con lo reportado por Araujo y col. (2024) y Gama y col. (2025), quienes documentaron variaciones en las concentraciones de TP en reptiles en función del grado de presión antrópica ambiental.

Las enzimas como GPT y GOT son esenciales en el metabolismo hepático, y sus niveles plasmáticos reflejan la integridad de los hepatocitos y la actividad metabólica, lo que las convierte en herramientas valiosas en estudios toxicológicos (Osman y col., 2010). En relación con los niveles plasmáticos de la enzima GPT, se observó un patrón diferenciado según el tipo de exposición. En los ensayos embrionarios *in ovo* (T2021 y T2022), los tratamientos con GLI al 1 y 2 % y 2,4-D al 0,12 % indujeron significativamente una mayor actividad de GPT en comparación con el grupo control. Esta consistencia en los

resultados de ambos ensayos sugiere un efecto hepático directo de estos herbicidas durante la embriogénesis, posiblemente vinculado a daño celular, activación de vías de detoxificación o inflamación hepática incipiente. Este hallazgo es coherente con estudios previos que reportan mayor actividad de transaminasas tras la exposición a GLI en reptiles, indicando hepatotoxicidad funcional desde etapas tempranas del desarrollo (Osman y col., 2010; Poletta y col., 2011).

En contraste, tanto en la exposición *in ovo* T2022 como en la exposición sub-crónica *in vivo*, se registró una menor actividad de GPT en los individuos expuestos a las mezclas M2 y M3 en comparación con el grupo control. Al mismo tiempo, los tratamientos individuales con GLI (al 1 y 2 %) y 2,4-D (al 0,06 y 0,12 %), mostraron niveles significativamente más elevados de GPT respecto a M3, mientras que CAP al 0,03 % e IMI al 0,2 % también presentaron valores superiores en comparación con M2 y M3. La menor actividad observada en la enzima GPT podría interpretarse como una respuesta de supresión o disfunción de la actividad hepática, posiblemente asociada a una interacción antagónica entre los p.a. presentes en las mezclas. Estos resultados apoyan la idea de que las mezclas de plaguicidas no solo generan respuestas fisiológicas distintas a las provocadas por cada compuesto individual, sino que también pueden modular negativamente la capacidad metabólica del organismo expuesto (Araujo y col., 2024).

En cuanto a los niveles plasmáticos de GOT, los resultados obtenidos en la exposición *in ovo* durante T2022 mostraron un patrón consistente con los de GPT, indicando alteraciones hepáticas tempranas asociadas a la exposición a herbicidas e insecticidas. Se observó que la actividad de GOT fue significativamente mayor en los tratamientos con GLI 2 %, CAP 0,03 % e IMI 0,2 % en comparación con el grupo control. De manera consistente, en el ensayo de exposición sub-crónica *in vivo*, también se registró una mayor actividad de GOT en los tratamientos con CAP 0,03 % y M3 respecto al control. Sin embargo, al comparar estos compuestos individuales con sus respectivas mezclas, se evidenció una que la actividad de GOT fue significativamente menor, indicando posibles interacciones antagónicas o efectos supresores.

En el ensayo *in ovo*, la mezcla M2 mostró una actividad de GOT 37,3 % menor en comparación con CAP 0,03 %, mientras que en el ensayo *in vivo* la actividad fue 9,5 % menor. De forma similar, los niveles de GOT en M3 fueron un 37,2 % y 14,7 % menores

que en IMI 0,2 % en las exposiciones *in ovo* e *in vivo*, respectivamente. Además, en el ensayo de exposición embrionaria, la mezcla M3 presentó una actividad de GOT 43,8 % menor en comparación con CAP 0,03 %. Es importante aclarar que estas comparaciones no buscan evaluar aditividad o antagonismo en términos de concentraciones equivalentes. Tal como señalan Bain y col. (2025), la interpretación de biomarcadores no siempre puede basarse en relaciones dosis-respuesta tradicionales, debido a la alta variabilidad intraespecífica y a la naturaleza no lineal de las respuestas fisiológicas. En este contexto, las comparaciones entre tratamientos individuales y mezclas se emplean como indicadores funcionales de modulación de la respuesta metabólica, permitiendo identificar si la combinación de p.a. atenúa o amplifica los efectos observados cuando los compuestos se administran de manera aislada. Considerando esto último, es posible los resultados observados en las mezclas M2 y M3 indiquen una atenuación de los efectos individuales de CAP e IMI sobre la función hepática, con una magnitud de inhibición significativamente mayor cuando la exposición ocurre durante la fase de desarrollo embrionario. Esta tendencia respalda los resultados obtenidos hasta el momento, indicando que el metabolismo hepático en etapas tempranas es particularmente sensible a las interacciones entre compuestos, generando una supresión enzimática más pronunciada que la observada en exposiciones sub-crónicas post-eclosión. En esta línea, Poletta y col. (2011) reportaron que las enzimas hepáticas GPT y GOT fueron significativamente mayores en caimanes expuestos a una formulación de GLI, así como a una mezcla que incluía GLI junto con END y CIP. Estas alteraciones se mantuvieron desde los 3 hasta los 12 meses de edad, lo que evidencia un estado de estrés hepático persistente asociado a la exposición temprana a plaguicidas. De manera similar, Gama y col. (2025) reportaron que ambas enzimas se vieron alteradas en *C. latirostris* expuestos a altos niveles de contaminación ambiental, lo que refuerza su utilidad como biomarcadores sensibles de alteración hepática en contextos de perturbación antrópica.

Hasta donde sabemos, no existen estudios previos que hayan evaluado la actividad de GPT y GOT frente a las mezclas específicas analizadas en este trabajo, lo que representa un desafío para interpretar plenamente la relevancia biológica de las alteraciones observadas. Sin embargo, la evidencia disponible indica que la exposición a contaminantes ambientales, incluidos plaguicidas y sustancias químicas industriales, puede inducir efectos hepatotóxicos que se manifiestan en cambios en la actividad de las

transaminasas (Anwar y Shakoori, 2010; Hemalatha y col., 2019; Gupta y Sharma, 2023; Araujo y col., 2024).

Los niveles de albúmina (ALB) observados en el ensayo de exposición sub-crónica difirieron de los reportados por Moleón y col. (2022), quienes describieron una disminución de este biomarcador en neonatos de *C. latirostris* tras cuatro semanas de restricción alimentaria, sin exposición a plaguicidas. En ese estudio, la reducción de ALB fue esperable como consecuencia directa del déficit nutricional; no obstante, en nuestro caso, los bajos niveles de ALB registrados a pesar de una alimentación regular, sugiere una disfunción hepática inducida por plaguicidas o una alteración en la capacidad de síntesis proteica, en concordancia con los cambios observados en el resto de los metabolitos analizados. Este efecto fue especialmente marcado tras la exposición a IMI, en línea con lo documentado por Khan y col. (2012), Javed y Usmani, (2015) y Araujo y col. (2024).

Además, los niveles de glucosa (GLUC) fueron significativamente más altos en los tratamientos con 2,4-D (0,12 %) y CAP (0,03 %) en comparación con el grupo CN. En contraste, las mezclas M1, M2 y M3 mostraron disminuciones de aproximadamente 32,7 %, 30,1 % y 27,4 %, respectivamente, en los niveles de GLUC con respecto al CN, aunque solo la reducción observada en M2 resultó estadísticamente significativa. Asimismo, las concentraciones de GLUC en M1 y M3 disminuyeron un 37,2 % y 32,2 %, respectivamente, en comparación con el tratamiento con 2,4-D, lo que sugiere un posible efecto modulador de este herbicida sobre los niveles de GLUC cuando se encuentra en mezcla. En relación con CAP, los niveles de GLUC fueron 39,7 % y 41,8 % menores en M2 y M3, respectivamente, mientras que se registró una disminución del 30,6 % en M3 respecto al tratamiento con GLI 2%. Alteraciones en los niveles de GLUC también fueron reportadas por Gama y col. (2025) en poblaciones silvestres de *C. latirostris* que habitan ambientes con distintos grados de actividad antrópica (agricultura, ganadería) en Brasil. En ese estudio, se observaron concentraciones más altas de GLUC en individuos provenientes de áreas fuertemente impactadas, mientras que los niveles fueron más bajos en caimanes de reservas naturales protegidas. Moleón y col. (2018), por su parte, reportaron alteraciones en los niveles de GLUC en neonatos de *C. latirostris* expuestos a otro estresor, temperaturas elevadas (37 ± 1 °C durante 8 h diarias) por un período de 60 días.

En tanto, los valores de GLUC, TG y CL obtenidos tras la exposición a pesticidas en este estudio superaron aquellos reportados por Barboza y col. (2008) para la misma especie bajo condiciones estacionales y asociadas al sexo, sin exposición directa a xenobióticos. Según Gama y col. (2025), los niveles de GLUC en *C. latirostris* (juveniles y adultos) varían ampliamente entre sitios con diferente presión antrópica, registrándose valores significativamente mayores en ambientes con alta intervención humana. Las discrepancias entre nuestros resultados y los estudios previos podrían atribuirse a diferencias en la frecuencia alimentaria, ya que los animales en nuestro experimento fueron alimentados tres veces por semana en condiciones controladas, mientras que los caimanes silvestres están sujetos a patrones de alimentación irregulares y a estresores ambientales adicionales propios del hábitat natural y por tratarse de animales de edades diferentes.

A pesar de estas variaciones, las diferencias observadas entre los tratamientos y el CN pueden atribuirse claramente a la exposición a plaguicidas, probablemente como resultado de la modulación de factores de transcripción relacionados con el metabolismo lipídico inducida por estas sustancias, tal como ha sido reportado en diversos taxones (Kou y col., 2020; Huang y col., 2022; Yu y col., 2022; Zhao y col., 2023). Estas alteraciones contribuyen a una disrupción metabólica, como lo evidencian los cambios en la CC y en los biomarcadores bioquímicos, lo que pone de manifiesto el impacto de las mezclas de plaguicidas sobre las vías de regulación lipídica.

La LDH es una enzima citoplasmática que se libera al torrente sanguíneo como consecuencia de daño celular. El ensayo *in vivo,* los niveles más bajos de LDH observados en la mezcla M1 en comparación con el tratamiento GLI 2 % solo podrían reflejar un antagonismo químico, donde la presencia de 2,4-D inhibiría potencialmente la síntesis o actividad de la LDH, ya sea de forma directa o indirecta, mediante la modulación de la expresión génica o mecanismos de retroalimentación. En este sentido, Storey (2015) demostró que, en *Trachemys scripta elegans* expuestas a anoxia, la actividad de LDH puede estar regulada por modificaciones postraduccionales reversibles, como la fosforilación, lo que permite una adaptación metabólica al estrés. Por lo tanto, no se descarta que el patrón observado en nuestro estudio refleje un mecanismo similar de regulación adaptativa inducido por la exposición combinada a herbicidas.

En línea con los resultados observados de las variables metabólicas, el presente estudio pone de manifiesto cambios significativos en los perfiles de eicosanoides en *C. latirostris* expuestos a pesticidas de forma sub-crónica, destacando el papel crítico de estos mediadores lipídicos en las respuestas adaptativas al estrés. Los eicosanoides son mensajeros lipídicos bioactivos derivados del AA que modulan diversos procesos fisiológicos y patológicos. En el presente estudio, los metabolitos evaluados pertenecen a las vías de la ciclooxigenasa (COX: PGE_2, 6-keto $PGF_{1\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$, PGD_2, TBX B_2 y 12-HHTrE) y de la lipooxigenasa (LOX: 5(S)-HETE, 12(S)-HETE y 15(S)-HETE).

Los resultados mostraron que la mezcla M1 presentó una concentración de PGD_2 un 58,9 % menor respecto del grupo control, y 76,5 % menor respecto a GLI 2 %, uno de sus constituyentes. La PGD_2 es considerada un metabolito inmunomodulador clave con funciones antiinflamatorias y participa en el mantenimiento de la homeostasis (Yasukawa y col., 2020). Además, se ha demostrado que la PGD_2 modula la inflamación y la diferenciación celular en los tejidos reproductivos (Kugathas y col., 2016). Los niveles más bajos de PGD_2 observados en M1 en comparación con GLI 2 % podrían indicar que, cuando GLI y 2,4-D se administran juntos, la presencia de 2,4-D modula o atenúa el efecto de GLI sobre la producción de PGD_2, lo que sugiere un posible efecto de supresión en la mezcla. Es importante señalar que, en este ensayo, la concentración de GLI en M1 fue del 1 %, mientras que en el tratamiento individual fue del 2 %; por lo tanto, la respuesta inflamatoria asociada a PGD_2 podría requerir un umbral de concentración que no habría sido alcanzado bajo las condiciones de exposición en la mezcla. Por su parte, Kugathas y col. (2016) observaron que diversas formulaciones de plaguicidas suprimieron la producción de PGD_2 en células de Sertoli de ratón, aunque GLI no inhibió directamente la síntesis de PGD_2, por lo que fue clasificado como inactivo en ese modelo. En contraste, nuestros resultados sugieren que las variaciones en PGD_2 observadas bajo exposición sub-crónica a GLI no se explican por un bloqueo enzimático directo, sino que podrían atribuirse a alteraciones sistémicas en la disponibilidad de ácidos grasos precursores en un contexto in *vivo*. Además, la metodología utilizada para medir PGD_2, junto con las diferencias fisiológicas entre especies modelo, pone de manifiesto los vacíos existentes en nuestra comprensión sobre los mecanismos mediante los cuales los plaguicidas alteran el metabolismo de los eicosanoides.

En un estudio de exposición aguda en peces tratados con acetoclor y butaclor a concentraciones subletales, se observó una regulación al alza de 18 PGs, incluidas la PGE_2 y la PGD_2 (Wu y col., 2023). En contraste, los resultados de nuestro estudio podrían reflejar una respuesta adaptativa en *C. latirostris*, en la cual otras vías metabólicas, antioxidantes o mecanismos inmunológicos compensan el estrés oxidativo o respuesta inflamatoria sin requerir una sobreexpresión de PGE_2.

La $PGF_{2\alpha}$ desempeña un papel clave en el sistema reproductor de las hembras, así como en funciones renales, vasoconstricción, disfunción miocárdica, daño cerebral y percepción del dolor (Calder, 2015). Tanto la PGE_2 como la $PGF_{2\alpha}$ se producen rápidamente a partir de PGH_2, y su síntesis depende del perfil enzimático celular y de las demandas fisiológicas específicas (Alba y col., 2023). Formulaciones a base de GLI han demostrado reducir la secreción de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ en tejido endometrial de mamíferos en estudios *in vitro*, incluso a dosis ambientalmente relevantes, lo que sugiere que el GLI o sus formulados podrían interferir en la fertilización o en el mantenimiento de la gestación (Wrobel y col., 2018). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron cambios significativos en los niveles de $PGF_{2\alpha}$ tras la exposición sub-crónica, lo cual sugiere que este metabolito podría no ser un buen biomarcador bajo estas condiciones experimentales.

No obstante, al evaluar la razón PGE_2:$PGF_{2\alpha}$, el tratamiento con 2,4-D (al 0,12 %) presentó valores significativamente menores en comparación con el grupo CN, mientras que el tratamiento con GLI mostró una razón significativamente mayor en relación con la mezcla M1. Esta razón refleja el equilibrio funcional entre ambas PGs, y permite detectar alteraciones fisiológicas que podrían pasar desapercibidas al analizar cada compuesto por separado. El desequilibrio en la síntesis de PGs que sugiere esta razón podría ser indicativo de una alteración en la señalización de eicosanoides. Este parámetro es especialmente relevante en procesos reproductivos, como el establecimiento del embarazo y el reconocimiento materno (Wrobel y col., 2005). Así, la razón PGE_2:$PGF_{2\alpha}$ podría ofrecer una representación más precisa de los cambios bioquímicos subyacentes. En la mezcla M1, la razón PGE_2:$PGF_{2\alpha}$ no se diferenció del grupo control, a pesar de que tanto GLI 2 % como 2,4-D 0,12 % por separado mostraron valores menores. Esto indica que, cuando ambos compuestos se administran en conjunto, el efecto de disminución observado en los tratamientos individuales se atenúa, sugiriendo una interacción antagónica entre los principios activos. Sin embargo, es importante considerar que esta

interacción puede ser dependiente del contexto de exposición, y que en ambientes naturales los organismos suelen estar expuestos a mezclas más complejas y dinámicas, lo que podría modificar este patrón.

El 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ es el metabolito estable e inactivo de la prostaciclina (PGI_2), la cual inhibe la activación plaquetaria y ejerce un efecto antitrombótico al contrarrestar las acciones del TXA_2 (Alba y col., 2023). El metabolito estable del TXA_2 evaluado en este estudio fue el TBX B_2. La exposición crónica al plomo (Pb) se ha asociado con una menor excreción urinaria de 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ y TBX B_2, lo que sugiere que estos metabolitos pueden actuar como biomarcadores confiables de exposición a largo plazo (Cardenas y col., 1993). Sin embargo, en este estudio no se observaron variaciones en las concentraciones de 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ ni de TBX B_2, lo que podría indicar que posibles alteraciones iniciales en la producción de PGI_2 o TXA_2 fueron compensadas por mecanismos de síntesis o degradación que enmascararon los efectos de los tratamientos sobre sus metabolitos estables. Además, otros eicosanoides con funciones similares podrían haber compensado parcialmente su rol fisiológico.

En este sentido, se observó una disminución significativa de 12-HHTrE en el tratamiento con M1 en comparación con el grupo CN. Este metabolito, producido por la degradación no enzimática del TXA_2 y PGH_2, está involucrado en la agregación plaquetaria y en la homeostasis vascular (Belhaj y col., 2021). En este contexto, aunque una baja concentración de 12-HHTrE no implica por sí misma una disminución efectiva de la agregación plaquetaria, sí sugiere que, ante un desafío fisiológico, como daño tisular, infección o activación inmunitaria, el funcionamiento de estas vías podría verse comprometido, reduciendo potencialmente la eficiencia de la respuesta inflamatoria y los procesos de reparación tisular.

Los productos derivados de la acción de las enzimas 5-LOX, 12-LOX y 15-LOX conducen a la formación de leucotrienos y de metabolitos intermedios como 5(S)-HETE, 12(S)-HETE y 15(S)-HETE, respectivamente, los cuales desempeñan funciones biológicas relevantes (Alba y col., 2023). El 5(S)-HETE actúa como un potente agente quimiotáctico, con propiedades tanto proinflamatorias como antiinflamatorias (Enyedi y col., 2013). De manera similar, se ha demostrado que el 12(S)-HETE induce la expresión de citocinas proinflamatorias, mientras que el 15(S)-HETE presenta efectos

antiinflamatorios al facilitar la resolución de la inflamación y regular el estrés oxidativo (Chakrabarti y col., 2009; Alba y col., 2023). Además, estos eicosanoides actúan como señales mitogénicas, promoviendo la regeneración tisular, facilitando la resolución inflamatoria y restaurando la homeostasis. En este marco, nuestros resultados mostraron que, en el tratamiento M1, las concentraciones de estos tres metabolitos fueron notablemente menores -58,0 %, 59,5 % y 69,7 % para 5(S)-HETE, 12(S)-HETE y 15(S)-HETE, respectivamente- en comparación con el CN. Asimismo, en relación con GLI 2 %, las disminuciones alcanzaron el 76,6 %, 50,9 % y 58,9 %, respectivamente.

En contraste, Wang y col. (2021) reportaron que los metabolitos de la vía LOX, incluyendo 5(S)-HETE, 12(S)-HETE y 15(S)-HETE, se encontraron en niveles significativamente altos en humanos expuestos a material particulado ambiental, sugiriendo su utilidad como biomarcadores de los efectos proinflamatorios tempranos de la contaminación ambiental aguda. Sin embargo, una disminución de 12(S)-HETE o 15(S)-HETE, mediada por la inhibición de las enzimas 12-LOX y 15-LOX, puede inducir apoptosis, como se ha demostrado en estudios previos (Ma y col., 2013; Yang y col., 2019). Esto sugiere que, mientras algunos contaminantes ambientales pueden inducir un aumento compensatorio de estos metabolitos durante la inflamación aguda, exposiciones a xenobióticos que generen una disminución de estos compuestos podrían afectar negativamente la regeneración tisular, dificultar la resolución inflamatoria e incluso contribuir a procesos apoptóticos y respuestas inflamatorias prolongadas. La respuesta a la exposición mediante la alteración de los niveles plasmáticos de eicosanoides en los tratamientos con mezclas resulta consistente con la expresión génica alterada de *pparα* y *pparγ* detectada en hígado de neonatos expuestos durante el desarrollo embrionario (T2022), lo cual será discutido más adelante.

4.1.5. Lipoperoxidación

Los resultados obtenidos en los tres ensayos (*in ovo* en la T2021, T2022 e *in vivo*) revelaron un patrón consistente de niveles más altos de peroxidación lipídica (TBARS) en neonatos de *C. latirostris* expuestos a diversas formulaciones de plaguicidas. Este efecto fue particularmente marcado en las mezclas M2 y M3, tanto *in ovo* como *in vivo*, reflejando un estrés oxidativo acumulativo y posiblemente sinérgico.

Estos resultados respaldan la hipótesis de que el desarrollo embrionario constituye una ventana crítica de alta sensibilidad al daño oxidativo (Burella y col., 2018; Odetti y col., 2020; 2023b). Esta susceptibilidad ha sido ampliamente documentada en estudios con especies silvestres, los cuales indican que el embrión presenta una elevada actividad metabólica junto con una capacidad antioxidante limitada, lo que lo vuelve particularmente vulnerable a la acumulación de EROs (Poletta y col., 2016; Burella y col., 2018; Odetti y col., 2020; 2023b). Los resultados de TBARS observados en neonatos expuestos durante el desarrollo embrionario a la M3, en la T2022, son consistentes con la disminución de tocoferoles detectada previamente en la yema, dado que el α-tocoferol, principal forma de vitamina E, actúa como antioxidante lipofílico clave, protegiendo las membranas celulares del daño oxidativo (Dierenfeld y col., 2002; Xiao y col., 2020). Su reducción sugiere una menor capacidad antioxidante embrionaria, lo que podría explicar el incremento en la peroxidación lipídica inducido por la mezcla de plaguicidas.

El uso de TBARS como biomarcador de daño oxidativo ha sido validado en caimanes expuestos *in ovo* a mezclas de pesticidas, representando uno de los primeros enfoques que demuestra desequilibrios oxidativos en embriones de reptiles como consecuencia de la exposición a xenobióticos (Dzul-Caamal y col., 2016; Poletta y col., 2016; Burella y col., 2018; Odetti y col., 2020; 2023a, b). En algunos de estos estudios, los niveles elevados de TBARS se acompañaron de alteraciones en otros biomarcadores de estrés oxidativo, como la actividad de enzimas antioxidantes (*superóxido dismutasa* y *catalasa*) y su expresión génica, como fue documentado en reptiles (López González y col., 2021a; Odetti y col., 2023b).

Adicionalmente, en la exposición sub-crónica *in vivo*, las mezclas M2 y M3 presentaron niveles de TBARS 70 % y 50 % mayores, respectivamente, en comparación con el control, evidenciando una intensificación del estrés oxidativo asociada a la exposición a mezclas de plaguicidas. En consonancia, López González y col. (2021a) también reportaron efectos sinérgicos en el mismo parámetro tras la exposición a una combinación de CIP, END y GLI. Asimismo, estos hallazgos coinciden con los resultados de Fasola y col. (2022), quienes observaron incrementos de hasta un 133 % en TBARS en lagartijas que habitaban áreas agrícolas de manejo intensivo, lo que refuerza la relevancia de considerar mezclas ambientalmente realistas en la evaluación de riesgos toxicológicos por estrés oxidativo.

4.1.6. Corticosterona y respuesta al estrés asociada a la exposición

En numerosos estudios, los glucocorticoides (GCs) se utilizan como indicadores fisiológicos del estrés en los organismos, aunque su función va mucho más allá de facilitar las respuestas al mismo (Breuner y col., 2013). Si bien los GCs se liberan típicamente ante un evento estresante, su papel es complejo, ya que intervienen en la movilización de reservas energéticas, la inmunomodulación y la mediación con otras hormonas (Breuner y col., 2013; Jimeno y col., 2018).

En este trabajo de tesis, se determinó el nivel de corticosterona (CORT) en neonatos luego de la exposición embrionaria a distintas formulaciones de plaguicidas (T2022). La CORT, es el principal GCs en reptiles que actúa como mediador endocrino clave frente al estrés ambiental (Moleón y col., 2018). Nuestros resultados mostraron que la concentración plasmática de CORT en neonatos expuestos *in ovo* al tratamiento con 2,4-D al 0,12 % fue significativamente mayor en comparación con el grupo control. Esta respuesta también se observó frente a la mezcla M3, que incluía el mismo p.a., aunque con menor magnitud. Este incremento reflejaría una respuesta fisiológica al estrés inducido por el agroquímico 2,4-D en su forma individual, que no se replicó del mismo modo en la combinación con otros compuestos, posiblemente debido a un efecto antagónico o modulador dentro de la mezcla. El aumento sostenido de CORT puede inducir inmunosupresión, reducción en el crecimiento y alteraciones en la homeostasis metabólica (Moleón y col., 2018; 2022). Esto concuerda con nuestros hallazgos, donde el tratamiento con 2,4-D mostró, además del aumento de CORT, niveles elevados de TBARS y alteraciones en los perfiles de CL y TG, lo que sugiere una disrupción metabólica generalizada. No obstante, se sabe que la acción de los GC es dependiente del contexto y puede variar según las condiciones experimentales y el momento dentro de la respuesta al estrés.

Investigaciones previas han demostrado que, durante un estresor agudo, por ejemplo, la exposición a la materia particulada fina, los GCs promueven la gluconeogénesis hepática, aumentando la disponibilidad de GLUC en sangre para mantener la actividad metabólica (Młynarska y col., 2025). Esta liberación de GCs y el consecuente aumento de la gluconeogénesis suelen ir acompañados de la inhibición del transporte y/o utilización de GLUC en los tejidos periféricos, lo que permite redirigir la energía hacia órganos prioritarios como el cerebro y el corazón, optimizando la respuesta al estresor (Herman y

col., 2016; Sapolsky, 2000; Młynarska y col., 2025). Si bien en el ensayo de exposición *in ovo* de la T2022 no se determinaron los niveles de GLUC en sangre, esta evaluación sí se realizó en el ensayo *in vivo*, observándose niveles más altos de GLUC en el tratamiento 2,4-D 0,12 %. En este sentido, la hiperactivación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) en etapas tempranas del desarrollo, no solo puede comprometer la homeostasis energética a corto plazo, sino también generar efectos duraderos sobre la sensibilidad tisular a la insulina o la eficiencia del metabolismo glucídico en etapas posteriores (Młynarska y col., 2025). Por otro lado, la ausencia de alteración de los niveles de CORT en otros tratamientos coincide con las observaciones en la serpiente *Thamnophis elegans vagrans*, donde la relación entre CORT y GLUC no muestra un aumento directamente proporcional (Neuman-Lee y col., 2023). Esto sugiere la intervención de otros mecanismos moduladores sobre la disponibilidad y la movilización de la GLUC (Neuman-Lee y col., 2023; Młynarska y col., 2025). Asimismo, este efecto hormonal podría tener implicancias sobre la regulación de genes sensibles al estado redox y al metabolismo lipídico, como los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (*ppar*) y *srebp1-c*, que se analizarán en detalle en secciones posteriores.

4.1.7. Expresión tisular específica de genes involucrados en el metabolismo lipídico

En una primera instancia, evaluamos el nivel relativo de ARNm de genes asociados a las vías lipídicas en distintos tejidos de *C. latirostris*, incluyendo la *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa* (*g-6-pdh*), *la sintasa de ácidos grasos* (*fas*), la *enzima málica* (*me*), la *lipoproteína lipasa* (*lpl*), los receptores nucleares *pparα*, *pparγ*, y la *proteína de unión al elemento regulador de esteroles 1c* (*srebp-1c*).

En este estudio se observó una mayor expresión relativa de *pparα*, *pparγ* y *srebp-1c* en el hígado en comparación con los otros tejidos evaluados. Este hallazgo concuerda con el rol central de estos factores de transcripción en el hígado como un nodo clave para el mantenimiento de la homeostasis lipídica y metabólica. El factor de transcripción *pparγ* está principalmente asociado con la regulación de la adipogénesis, el equilibrio energético y la biosíntesis de lípidos, influyendo en la expresión de genes involucrados en la liberación, el transporte y el almacenamiento de ácidos grasos, como *lpl* (Lehrke y col., 2005). Está bien establecido que la expresión de *pparγ* es más alta en los adipocitos que en el hígado (Fang y col., 2021). Sin embargo, su expresión elevada en este órgano

también tiene importancia funcional, ya que mejora la capacidad de amortiguación lipídica, previniendo la lipotoxicidad (Memon y col., 2000). A diferencia de los mamíferos, que dependen tanto del hígado como del tejido adiposo para el metabolismo lipídico, los crocodílidos utilizan el hígado como principal órgano para dicho metabolismo (Staton y col., 1990). El almacenamiento lipídico en los hepatocitos parece ser normal y posiblemente saludable en estas especies debido a sus hábitos nutricionales (Starck y col., 2007). No obstante, cuando la acumulación lipídica excede los niveles fisiológicos esperados, puede derivar en alteraciones histopatológicas, afectando la función hepática y la homeostasis metabólica. Además, la regulación de *lpl* como gen diana, que también muestra una alta expresión hepática, respalda el rol de *pparγ* en la promoción de la depuración de TGs de la circulación y su almacenamiento. En reptiles, se han identificado secuencias parciales de ARNm de *pparα*, *β* y *γ* en *C. niloticus*, en *Crocodylus porosus*, y en la tortuga *T. elegans* (Hughes y col., 1999; Seebacher y col., 2015). En *C. porosus*, niveles más altos de *pparγ* en el hígado se asociaron con un rol regulador en el metabolismo lipídico durante la aclimatación térmica (Seebacher y col., 2015). Por el contrario, la expresión de *pparγ* en el intestino fue menor que la de *lpl*, lo que sugiere un rol protector en el mantenimiento de la homeostasis de la mucosa intestinal. Esta observación es coherente con la función de *pparγ* como coordinador central de la barrera mucosa, especialmente en contextos de lesión inflamatoria (Fang y col., 2021).

Mientras tanto, la expresión de *lpl* podría estar regulada por otro factor de transcripción, como *receptor x hepático* (*lxr*), que se expresa ampliamente en tejidos metabólicamente activos como el intestino (Yang y col., 2023). En contraste con nuestros resultados, *pparγ* se expresa en niveles más bajos en el hígado que en el intestino en *G. gallus* (Meng y col., 2005). Además, *pparγ* también se expresa diferencialmente en el útero durante la gestación en la lagartija *Pseudemoia entrecasteauxii*, lo que sugiere mecanismos adaptativos específicos de expresión génica relacionados con la preñez (Griffith y col., 2016). En esta misma especie, el gen lpl también muestra una mayor expresión en el útero durante la gestación, asociada a una mayor capacidad de transporte lipídico durante este período (Griffith y col., 2013). La menor concentración de *pparγ* en bazo y sangre estaría asociada con su capacidad para modular la inflamación, la maduración de macrófagos y las respuestas inmunes, más que con funciones directamente vinculadas al metabolismo lipídico (Yang y col., 2023).

La concentración de *pparα* fue alta en el hígado, así como en el intestino y la sangre. Es un regulador principal de la oxidación de AG y se encuentra predominantemente en el hígado, aunque su expresión es ubicua (Qiu y col., 2023). En el hígado, *pparα* regula la oxidación peroxisomal, mitocondrial y microsomal, controlando el equilibrio lipídico y energético del organismo (Desvergne, 2006). Además, cumple un rol importante en la síntesis de lipoproteínas y en la respuesta inflamatoria (Qiu y col., 2023). Hallazgos similares en pollos sugieren una expresión conservada entre los saurópsidos (Meng y col., 2005). En el intestino, *pparα* regula la absorción lipídica, el procesamiento de lípidos dietarios, la motilidad intestinal y la defensa frente al estrés oxidativo (de Vogel-van den Bosch y col., 2008). Su expresión en el intestino del caimán es consistente con su función en la digestión y absorción de lípidos. Este resultado está respaldado por hallazgos similares en *G. gallus*, *Python molurus* y el gecko *Eublepharis macularius*, lo que indica un perfil de expresión conservado entre los saurópsidos (Meng y col., 2005; Astarita y col., 2006; Kato y col., 2008). En la misma línea, la alta expresión de *pparα* en sangre sugiere una función conservada en las vías de oxidación de AG y otras funciones relacionadas con el metabolismo lipídico, lo que coincide con lo hallado en sangre periférica humana (Bouwens y col., 2008).

El factor de transcripción *srebp-1c* se expresa altamente en el hígado, donde potencia la transcripción de genes implicados en la síntesis de AG y TGs, como *fas*, acetil-CoA carboxilasa (*acc*) y *estearoil-Coenzima A desaturasa 1* (*Scd-1*; Horton y col., 2002). Además, se reconoce que la insulina activa transcripcionalmente *srebp-1c* en el hígado (Desvergne, 2006). El gen *fas* es crucial para la síntesis *de novo* de AG, y su regulación es esencial para mantener la homeostasis lipídica (Ferré y Foufelle, 2007). Estudios recientes en reptiles bajo condiciones controladas han mostrado una mayor expresión de *srebp-1c* en el hígado, en concordancia con nuestros hallazgos (Hong y col., 2019; Khan y col., 2023). Además, este incremento está positivamente relacionado con la expresión de sus genes blanco, como *fas*, lo que resalta el papel conservado de estas vías en la homeostasis lipídica de los reptiles. Adicionalmente, se detectó una menor concentración de *srebp-1c*, y una concentración aún más baja de *fas* en la gónada. Estos resultados son consistentes con el rol fisiológico de las gónadas, que priorizan la biosíntesis de colesterol para la producción de hormonas, en lugar de la síntesis de ácidos grasos (Ferré y Foufelle, 2007). Finalmente, la baja concentración de ARNm de *fas* en sangre es coherente con la función de este tejido en el transporte de lípidos más que en su síntesis.

La actividad de la enzima *me* en la mitocondria es crucial para mantener la homeostasis energética y metabólica, ya que cataliza la descarboxilación oxidativa del malato a piruvato mientras reduce $NADP^+$ a NADPH, razón por la cual se expresa de forma ubicua (Al-Dwairi y col., 2014). El NADPH resultante es utilizado en rutas como la biosíntesis de ácidos grasos, colesterol y otras vías anabólicas (Ferré y Foufelle, 2007). En el hígado, nuestros resultados indicaron una alta expresión de *me* y *g-6-pdh*, lo cual es esperable dado que *srebp-1c* induce estas enzimas como parte del proceso de lipogénesis *de novo* (Bertile y Raclot, 2004). En mamíferos, se ha demostrado que *me* modula la producción celular de NADPH y promueve la proliferación y diferenciación de células estromales, contribuyendo a la decidualización uterina (Yu y col., 2020). En concordancia con investigaciones previas, la mayor expresión de *me* en las gónadas observada en este estudio sugiere que cumple una función importante también en los crocodílidos, potencialmente relacionada con procesos de proliferación, diferenciación o mantenimiento del tejido reproductivo. Asimismo, aunque *me* se expresa a niveles variables en diferentes tejidos, otros autores han reportado una expresión moderada en el intestino, lo cual coincide con nuestros resultados (Al-Dwairi y col., 2014). Por el contrario, la baja expresión observada en bazo y sangre sugiere que en estos tejidos *me* podría estar involucrada en otras rutas metabólicas, como el inmunometabolismo, particularmente en los macrófagos, donde se ha propuesto que regula su fenotipo de activación, es decir, el tipo de estado funcional que adoptan, y su plasticidad funcional (Santarsiero y col., 2024).

Además, la *g-6-pdh* es la segunda enzima clave para la generación de NADPH y actúa como enzima limitante de la vía de las pentosas fosfato. Se la considera una enzima de mantenimiento (housekeeping) debido a su expresión en una amplia variedad de tejidos y células (Simmen y col., 2020). En este estudio, se observó una expresión similar de *g-6-pdh* en bazo, hígado y gónada, lo que sugiere un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis redox celular, ya que se reconoce como la principal fuente de NADPH activada en respuesta al estrés oxidativo (Filosa y col., 2003). En este trabajo, el intestino mostró la mayor expresión de *g-6-pdh*. Este hallazgo coincide con investigaciones previas en mamíferos, donde se determinó su participación en los procesos apoptóticos responsables del recambio constante del epitelio intestinal (Ninfali y col., 2001). En crocodílidos, es probable que *g-6-pdh* cumple funciones similares, potenciando la capacidad de desintoxicación y manteniendo la homeostasis redox intestinal, dado que

este órgano está expuesto continuamente a oxidantes dietarios y metabolitos microbianos. Por otro lado, la capacidad de la sangre periférica para contrarrestar el estrés oxidativo depende críticamente de la actividad de *g-6-pdh*, necesaria también para reducir el daño celular (Santarsiero y col., 2024). La baja expresión de este gen en sangre periférica de crocodílidos, observada en este estudio, sugiere que, aunque cumple un papel esencial en el equilibrio redox, podrían existir otros mecanismos compensatorios en este tejido para afrontar el estrés oxidativo.

4.1.8. Expresión de genes asociados al metabolismo lipídico en respuesta a la exposición

En varios taxones, se ha reportado la sensibilidad de los genes involucrados en el metabolismo de los lípidos frente a estresores ambientales y cómo estas alteraciones pueden afectar el metabolismo general (Kou y col., 2020; Huang y col., 2022; Yu y col., 2022; Zhao y col., 2023). En este estudio, se observó una regulación diferencial de genes clave en la homeostasis de lípidos, lo que sugiere una respuesta específica al tipo de pesticida y a la forma de exposición (individual o en mezcla).

Numerosos contaminantes ambientales clasificados como disruptores endocrinos (DEs) pueden activar los factores de transcripción lipogénicos, como los *ppars*, los *srebps* y *lxr*, alterando las rutas hormonales y metabólicas, lo que ha llevado a definirlos como compuestos obesogénicos debido a su capacidad para promover la acumulación de lípidos y desregular el metabolismo energético (Grün y Blumberg, 2007). Por lo tanto, alteraciones en la expresión de los *ppars* se traducen en cambios directos en el almacenamiento y distribución de los metabolitos TGs, CL, GL y la GLUC (Chen y col., 2013; Huang y col., 2013; Huang y col., 2020). En línea con estos antecedentes, las variaciones observadas en las concentraciones plasmáticas de dichos metabolitos en este estudio se acompañaron de cambios en la expresión de los *ppar* y *srebp1-c*, lo que sugiere una relación funcional entre la modulación transcripcional inducida por la exposición a FA y las alteraciones en el metabolismo energético durante la embriogénesis.

La mayor expresión significativa de *g-6-pdh* y *me* observada en hígado en los tratamientos M1, M2 y M3, y su respuesta consistente en sangre en ambas temporadas (T2021 y T2022) sugiere una activación compensatoria de rutas lipogénicas frente al estrés

oxidativo o una mayor demanda energética hepática. Tal activación ha sido asociada con la desregulación del metabolismo lipídico, resistencia a la insulina y aumento del peso corporal en otros vertebrados (Park y col., 2005). Adicionalmente, *g-6-pdh* es una de las principales fuentes de NADPH inducidas por estrés oxidativo (Filosa y col., 2003), por lo que nuestros resultados son coherentes con los niveles elevados de lipoperoxidación observados en las mezclas en ambas temporadas. Por el contrario, menor expresión de *g-6-pdh* en el tratamiento con 2,4-D al 0,12 % podría reflejar una menor capacidad del hígado para generar NADPH, afectando tanto la biosíntesis lipídica como la protección antioxidante. Esta alteración metabólica se reflejó en una menor circulación de TGs plasmáticos, acompañada de un aumento en los niveles de CL y CORT en el tratamiento 2,4-D 0,12 %, como respuesta compensatoria al desequilibrio energético y al estrés fisiológico. Resultados similares han sido reportados en peces expuestos a contaminantes ambientales, donde una regulación negativa de *g-6-pdh* y *me* estuvo asociada a una disminución de la capacidad lipogénica hepática y del control del estrés oxidativo (Levesque y col., 2002).

Ambos tejidos, sangre e hígado, mostraron una respuesta similar frente a la modificación en la expresión de estos genes; sin embargo, el hígado se evidenció como el tejido más sensible a los cambios, incluso ante la exposición a las mezclas M1 y M2. Esto concuerda con lo planteado por Chen y col. (2013), quienes sugieren que el efecto de los xenobióticos sobre el metabolismo lipídico puede ser específico de cada tejido. En este contexto, la menor sensibilidad observada en sangre podría explicarse por la presencia de mecanismos reguladores sistémicos más conservadores o por un recambio celular más dinámico, que amortiguan las variaciones transcripcionales. No obstante, otros marcadores muestran resultados consistentes y respaldan los hallazgos de expresión génica observados en sangre. En particular, los elevados niveles de LPO detectados en las mezclas refuerzan la hipótesis de una activación metabólica compensatoria mediada por genes como *g-6-pdh* y *me,* cuya mayor expresión ha sido asociada a la respuesta compensatoria destinada a mitigar el daño celular y del estrés oxidativo en células inmunes, respectivamente (Santarsiero y col., 2024). Esta evidencia refuerza la hipótesis de que la acción individual del 2,4-D genera un efecto disruptivo más marcado sobre la homeostasis hepática que su inclusión en mezclas, posiblemente debido a interacciones de los p.a. que modulan sus efectos tóxicos.

Además, la menor expresión hepática de *lpl* en el tratamiento con 2,4-D al 0,12 %, sugiere una menor capacidad del hígado para captar TGs circulantes. En peces, este patrón ha sido vinculado con alteraciones en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, y con un incremento en el contenido lipídico de los tejidos periféricos tras la exposición a contaminantes (Liu y col., 2010). Sin embargo, en este estudio se observó una reducción significativa de TG plasmáticos en lugar de un aumento, lo que sugiere la activación de rutas catabólicas alternativas. En consistencia con Chen y col. (2013), mientras el hígado responde con una reducción en la actividad lipogénica, otros tejidos como el adiposo visceral podrían mantener su actividad basal. Esta hipótesis refuerza lo planteado previamente respecto a este herbicida, su elevado nivel de CORT en plasma, caracterizado por una movilización de reservas energéticas y una supresión de procesos anabólicos como la lipogénesis, serían indicios de un estado de estrés fisiológico. Adicionalmente, la CORT promueve la oxidación de lípidos y proteínas como estrategia para sostener el metabolismo bajo en condiciones adversas, lo que explicaría la disminución de TG en sangre. Este perfil metabólico, acompañado por niveles elevados de LPO, CL y una reducción en PT plasmáticas, es consistente con un cuadro de disfunción hepática inducida por la exposición individual a 2,4-D. En este contexto, Levesque y col. (2002) señalaron que el estrés crónico por contaminantes ambientales puede aumentar el consumo energético basal, reduciendo la energía disponible para funciones fisiológicas críticas como la inmunidad o la reproducción. Esto podría estar relacionado con el aumento en la expresión de *lpl* observado en tratamientos como IMI 0,2 %, M1 y M3, sugiriendo una intensificación en la utilización de lípidos como fuente energética. Estas alteraciones pueden ser asociadas a un incremento preferencial en su utilización por parte del hígado. De forma integrada, la sobreexpresión de *lpl* observada en IMI 0,2 %, M1 y M3, junto con menores reservas de TGs hepáticos y bajos niveles de AG plasmáticos, podría representar un ajuste metabólico inducido por la exposición crónica a pesticidas, orientado a sostener la homeostasis energética bajo condiciones de estrés ambiental (Levesque y col., 2002; Chen y col., 2013).

Complementariamente, y reforzando la hipótesis de una reasignación energética, se detectó un nivel significativamente menor en la expresión hepática de *fas* en el tratamiento con CAP al 0,03 % en relación con el grupo CN, comprometiendo posiblemente la vía metabólica de la síntesis de AG (Chen y col., 2013). De este modo, la acción combinada de la alta movilización lipídica (*lpl* alta) y la disminución de la

lipogénesis (*fas* baja) representa un mecanismo adaptativo hepático para desviar recursos lipídicos de la síntesis y el almacenamiento hacia la producción de energía inmediata, en un esfuerzo por mantener las funciones fisiológicas críticas ante la exigencia del estrés crónico. Esta hipótesis se ve respaldada por los valores de TG y de PT plasmáticas observados en el tratamiento con CAP. Las alteraciones en los niveles de expresión de *fas* debido a la exposición a xenobióticos han sido reportadas en otros organismos (Chen y col., 2013; Huang y col., 2013). En nuestro estudio, también se observó que los niveles de expresión relativa de *fas* fueron significativamente mayores en la M2 y M3 en relación dos de sus constituyentes individuales (CAP e IMI), lo que sugiere que el efecto supresor observado en los compuestos aislados se atenúa cuando los principios activos se combinan.

Respecto a los factores de transcripción, *pparα*, *pparγ* y *srebp1-c* son elementos centrales en la regulación de rutas lipídicas. En este estudio, la menor expresión en hígado de *pparα* en los tratamientos GLI 2 %, CAP 0,03 % e IMI 0,2 % sugiere una capacidad reducida del hígado para movilizar lípidos a través de oxidación, lo que podría comprometer el balance energético y favorecer la acumulación de lípidos hepáticos (Qiu y col., 2023). Resultados similares fueron reportados por Młynarska y col. (2025), quienes observaron que la exposición a IMI redujo significativamente la expresión de *pparα*, acompañándose de alteraciones en los niveles plasmáticos de TGs y GLUC. Esta interpretación es consistente con el incremento de lípidos observada en el tejido hepático que se discute en la siguiente sección, y las alteraciones en los parámetros de TG, GPT y LPO observados en GLI 2 % y CAP 0,03 %, mientras que CAP 0,03 % además mostró una fuerte disminución en PT y un aumento marcado en GOT. Conjuntamente, estas modificaciones indicarían una disfunción hepática combinada con una mayor peroxidación lipídica, posiblemente por acumulación de lípidos no metabolizados y estrés oxidativo asociado (Dunning y col., 2010). Estos resultados coinciden con lo reportado por Wang y col. (2021), quienes observaron que la disminución en la expresión de *pparα*, junto con valores reducidos de TGs, se asocia a una respuesta metabólica hepática deficiente. En contraste, la mezcla M2 mostró una sobreexpresión significativa de *pparα*, acompañada de una alta concentración de CL, niveles elevados de LPO y una disminución en la actividad de GPT, configurando un patrón metabólico distintivo frente a los tratamientos individuales, en concordancia con los resultados que evidencian mayor depósito lipídico en el tejido hepático. En cambio, su activación en M2 podría representar un mecanismo

compensatorio adaptativo ante el estrés metabólico, posiblemente desencadenado por la interacción entre compuestos, que favorecería la movilización de lípidos por β-oxidación. Este perfil metabólico es consistente con la sobreexpresión de las enzimas *g-6-pdh* y *me* en M2, ambas claves en la generación de NADPH. Este cofactor no solo es esencial para la neutralización del estrés oxidativo, sino también para sostener rutas de catabolismo lipídico asociadas a *pparα*. Así, el patrón observado sugiere una reprogramación hepática orientada a restablecer la homeostasis energética y redox ante condiciones de exposición combinada a plaguicidas, en un intento del organismo por minimizar el daño celular y mantener la funcionalidad hepática. Similar a nuestros resultados, el estudio de Valente y col. (2023) reportó una disminución de *pparα* tras la exposición a una formulación de GLI (0,95 µg/mL) en células hepáticas humanas. Además, este estudio demostró que el GLI y su metabolito AMPA compartían un patrón molecular en el transcriptoma, basado en la regulación de genes asociados al metabolismo de la GLUC y la activación de vías de señalización celular, indicando que ambos compuestos generan efectos similares en el transcriptoma hepático (Valente y col., 2023).

En este estudio, *pparγ* mostró una sobreexpresión significativa en tratamientos como GLI 2 % e IMI 0,2 %, así como en las tres mezclas, destacándose especialmente M3. Esta activación podría estar vinculada a una señalización compensatoria para aumentar la capacidad del hígado de amortiguar el exceso de lípidos circulantes, mediante su captación y almacenamiento intracelular, previniendo así la lipotoxicidad hepática (Memon y col., 2000; Chacón y col., 2024). Esta hipótesis es coherente con los niveles elevados de CL y la disminución de GPT observados en M3, que reflejan una alteración en la funcionalidad hepática sin una respuesta inflamatoria aguda marcada. A diferencia de *pparα*, que regula la oxidación de lípidos, *pparγ* promueve su depósito, por lo que una sobreexpresión de este factor, como se observó en GLI 2 % y M3, puede representar una estrategia fisiológica para contrarrestar el estrés metabólico generado por la exposición a plaguicidas. Sin embargo, en ausencia de una activación concomitante de *pparα*, como también se observó en M3, este almacenamiento podría no ir acompañado de una adecuada movilización y catabolismo de lípidos, favoreciendo así un desbalance metabólico y contribuyendo a los efectos observados en otros biomarcadores, como el aumento de LPO y CL. Por otro lado, es necesario destacar la capacidad de *pparγ* para modular la inflamación, la maduración de macrófagos y otras respuestas inmunes (Yang y col., 2023). En este sentido, la sobreexpresión significativa de *pparγ* en hígado

observada podría estar asociada a una respuesta inmunometabólica activa. En línea con esto, los cortes histológicos evidenciaron una marcada infiltración de células del sistema inmune, tales como eosinófilos, linfocitos y células estrelladas, como se discutirá a continuación. El patrón de expresión génica observado en este trabajo de tesis es consistente a lo reportado en peces expuestos a contaminantes de forma aguda, donde factores de transcripción tales como *pparα, pparγ* y *srebp 1,* se observaron relacionados positivamente con la expresión de genes asociados con la lipogénesis, tales como *g-6-pd, 6pgd, fas* y *acc* (Levesque y col., 2002; Zheng y col., 2013).

Debido a que su sitio de unión al ligando es lo suficientemente amplio como para acomodar diversas estructuras químicas, *pparγ* muestra una alta sensibilidad a compuestos químicos ambientales (Capitão y col., 2018). Además, el heterodímero *rxr:pparγ* es permisivo, lo que significa que la activación de la señalización puede ocurrir mediante la unión de ligandos a cualquiera de los dos receptores (Grün y Blumberg, 2009). En línea con esto, previamente hemos demostrado que las moléculas bioactivas y ligandos de estos receptores nucleares, responden a la exposición de los herbicidas GLI y 2,4-D y su mezcla (M1), por lo que el mecanismo de alteración de esta vía podría originarse en primer lugar debido a la alteración de los eicosanoides, y luego, propagar aún más las respuestas de interrupción de la vía *ppars.*

El estudio de Martini y col. (2016) mostró que el herbicida GLI (Atanor; 48% p.a), puede inhibir la expresión de *pparγ*, afectando la diferenciación de pre-adipocitos y generando estrés oxidativo en células 3T3-L1. En contraste, nuestros resultados indican un incremento en la expresión de *pparγ* tras la exposición a la formulación de GLI Panzer al 2 % (60,8 % de p.a.). Esta diferencia podría deberse a variaciones en la formulación del herbicida, la concentración utilizada o la sensibilidad específica del modelo biológico empleado. Además, considerando que *pparγ* también regula genes del sistema inmune, el aumento observado en este estudio podría estar relacionado con una respuesta adaptativa a la exposición prolongada al herbicida. No obstante, nuestros resultados comparados a otros estudios sugieren que los adyuvantes presentes en las formulaciones comerciales de GLI (al igual que otros p.a.) pueden potenciar su efecto sobre el metabolismo lipídico. En el cocodrilo americano, también se ha evaluado la alteración de *pparγ* en neonatos nacidos tras la exposición *in ovo* a contaminantes ambientales como la tributiltina (Bernhard, 2014). Este estudio investigó los efectos sobre la señalización de *rxrα:pparγ*, encontrando

que este xenobiótico activó la transcripción de estos receptores nucleares, indicando un potencial efecto obesogénico en la especie (Bernhard, 2014).

Por otra parte, Luo y col. (2021) demostraron que la exposición combinada a IMI y microplásticos de poliestireno (PM) afectó significativamente el metabolismo lipídico en *D. rerio*. La exposición a esta mezcla (IMI + PM) redujo la expresión de *pparα* y *pparγ*, un efecto que no se observó en los tratamientos con los compuestos individuales. Al mismo tiempo, y en coherencia con nuestros resultados, la exposición a IMI y a la mezcla compleja con PM redujo la concentración de TG (Luo y col., 2021). Dado el rol en el sistema inmunológico de *pparγ*, nuestros resultados sugieren una posible programación metabólica orientada a la modulación de genes del sistema inmune, con una mayor inversión energética para contrarrestar los efectos de la exposición durante el desarrollo embrionario. Si esto es así, se puede afirmar que el insecticida IMI genera una interacción entre la regulación metabólica y la respuesta inflamatoria, resaltando la complejidad de las respuestas metabólicas inducidas por la exposición a mezclas de contaminantes ambientales.

Adicionalmente, la exposición a CAP promueve la adipogénesis mediante la inhibición de la vía *ampk-α*, un regulador clave de la homeostasis lipídica. Dado que *ampk* suprime la diferenciación adipogénica al inhibir *pparγ*, su bloqueo por CAP sugiere una desregulación de esta señalización, favoreciendo la acumulación de lípidos y la activación de genes lipogénicos. Asimismo, se ha propuesto que el CAP aumenta los niveles intracelulares de Ca^{2+} a través de la activación de los receptores de rianodina (*ryr*), lo que podría contribuir indirectamente a la inhibición de *ampk* y generar un estado pro-adipogénico que potencia la expresión de *pparγ* y otros reguladores metabólicos (Yuan y col., 2020).

En un estudio previo, la exposición *in vivo* en mamíferos al IMI en concentraciones de 0,06, 0,6 y 6 mg/kg peso corporal/día indujeron un aumento en la expresión de *srebp-1c*, acompañado de cambios en la concentración plasmática de TGs y GLUC (Młynarska y col., 2025). Aunque nuestros resultados no mostraron alteraciones en el nivel de expresión de este factor de transcripción en IMI al 2%, sí se evidenció una mayor expresión en la M3, donde el IMI fue uno de sus constituyentes. Esta mayor expresión indicaría una activación lipogénica más marcada en la mezcla M3 que en los tratamientos

individuales. No obstante, este aumento no se acompañó de mayores niveles de CL plasmático en este tratamiento, de manera consistente a lo reportado por Młynarska y col. (2025). Estas observaciones sugieren que la acción coordinada de otros factores de transcripción, como *pparα* y *pparγ*, también alterados en las mezclas, habría favorecido la utilización o esterificación del CL a nivel tisular, evitando su acumulación en plasma. De este modo, los efectos lipogénicos de *srebp-1c* podrían haberse compensado mediante mecanismos de oxidación y almacenamiento mediados por los *ppar*, contribuyendo a mantener la homeostasis del CL circulante. Adicionalmente, los niveles de *srebp-1c* se relacionan positivamente con la expresión de sus genes blanco, como *fas*. En este estudio, *fas* presentó valores de expresión más altos en la mezcla M3, aunque sin alcanzar significancia estadística, mientras que en el tratamiento con CAP 0,03 % tanto *srebp-1c* como *fas* mostraron niveles significativamente menores respecto del grupo control. Estos resultados refuerzan el papel conservado de la vía *srebp-1c* / *fas* en la regulación de la homeostasis lipídica en reptiles. Además, los tratamientos individuales mostraron valores significativamente menores que la mezcla M3, que contenía todos los p.a. En concordancia con lo observado para *fas*, este patrón sugiere que, al combinarse, los compuestos reducen el efecto inhibitorio observado de forma individual, dando lugar a una mayor activación transcripcional de *srebp-1c* en la mezcla.

4.1.9. Alteraciones histológicas y disrupción endócrina como consecuencias de la exposición a formulaciones de agroquímicos

Las observaciones histopatológicas de este estudio revelaron que las alteraciones en la estructura hepática fueron dependientes del tratamiento, evidenciándose un daño más pronunciado en los grupos expuestos a mezclas. Dado que el hígado constituye el principal centro de detoxificación de compuestos tóxicos, las alteraciones hepáticas sugieren la activación de mecanismos de autoprotección en un intento de eliminar los residuos de las formulaciones de agroquímicos (FA) a los cuales estuvieron expuestos los embriones. Estudios previos han demostrado que la vacuolización hepática es una lesión "background" frecuente en reptiles por sus características metabólicas y nutricionales (Starck y col., 2007; Barboza y col., 2023). No obstante, pese a la condición "natural" de vacuolización hepática observada, nuestros resultados evidenciaron un mayor contenido graso en los neonatos expuestos a los tratamientos con GLI 2 %, M1 y M2; mientras que en la M3 se registró contenido lipídico menor en relación con el grupo control. Lane y

col. (2013), reportaron que la acumulación excesiva de lípidos en el tejido hepático en el cocodrilo *Crocodylus niloticus* habría inducido la inflamación del tejido adiposo, desencadenando pansteatitis y alteraciones en los niveles de metabolitos lipídicos plasmáticos, lo que favoreció al desarrollo de atrofia hepática y esteatosis (Lane y col., 2013). En cocodrilianos, estas condiciones incrementan el riesgo de mortalidad (Azeez y col., 2017). De manera similar, en el lagarto *Pogona vitticeps,* un exceso en la vacuolización hepatocelular se asoció a un proceso histopatológico de lipidosis, generando como consecuencia el deterioro de la función celular, insuficiencia hepática y muerte (Barboza y col., 2023). Un estudio previo reportó que *C. latirostris* posee la capacidad de acumular cantidades considerables de lípidos en sus hepatocitos sin manifestar efectos patológicos evidentes (Starck y col., 2007). No obstante, el exceso de lípidos intracelulares promueve procesos de peroxidación lipídica, asociados con daño histológico en diversos órganos (Dunning y col., 2010; Ortiz-Ordoñez y col., 2015; Wang y col., 2021). Por lo tanto, aun cuando la acumulación lipídica no se traduzca inmediatamente en lesiones evidentes en la especie, una vacuolización sostenida podría aumentar la susceptibilidad del tejido hepático al daño oxidativo y, en consecuencia, favorecer la aparición de alteraciones histológicas como las observadas en este estudio. Hasta el momento, los estudios morfológicos e histológicos hepáticos en cocodrilianos se han centrado principalmente en aspectos nutricionales, por lo que no existe bibliografía disponible que evalúe las lesiones derivadas de la exposición a contaminantes. Considerando estos antecedentes, nuestros resultados podrían indicar que la acumulación de vesículas lipídicas observada en estos tratamientos constituye un indicio de posible esteatosis.

Adicionalmente, la presencia de focos linfocitarios rodeados de abundante colágeno en los tratamientos con CAP 0,03 %, IMI 0,2 % y M3 es compatible con una respuesta inflamatoria crónica. Esta alteración coincide con los resultados observados en la expresión génica de *pparγ*. Las mezclas M1 y M3 presentaron un incremento notable de células del sistema inmune, incluyendo linfocitos, eosinófilos y células estrelladas, junto con signos de fibrosis en las tríadas portales, especialmente marcado en M3. La degeneración de los hepatocitos y las estructuras celulares circundantes evidencia el esfuerzo marcado del hígado de los neonatos expuestos para detoxificar el compuesto químico de su organismo. Resultados similares fueron encontrados en lagartos, tortugas y otros cocodrilianos, lo que refuerza la evidencia sobre los efectos hepatotóxicos de

agroquímicos en reptiles (Chang y col., 2018; Lu y col., 2022; Verderame y col., 2023). El estudio de Chang y col. (2018) analizó los impactos de los pesticidas benzoylurea, diflubenzuron y flufenoxuron, en el hígado de *E. argus* expuestos a suelo contaminado, detectando lesiones hepáticas severas, como fibrosis, sinusoides estrechas, pérdida completa de la arquitectura lobulillar normal y agrupación de hepatocitos. En nuestro estudio, la fibrosis hepática se formó principalmente alrededor de los tractos periportales y adyacente a la cápsula hepática; mientras que, en los casos más graves, la fibrosis abarcó múltiples áreas portales. En concordancia con nuestros resultados, Verderame y col. (2023) reportaron en *Podarcis siculus* expuestos experimentalmente a GLI en concentraciones de 0,05 y 0,5 µg/kg, alteraciones histológicas hepáticas con un marcado patrón dosis-dependiente. En dicho estudio, los ejemplares tratados con GLI mostraron un incremento progresivo del tejido conectivo, inicialmente localizado alrededor de los vasos sanguíneos y, a dosis más elevadas, formando estructuras nodulares y quísticas con abundantes fibras colágenas, indicativas de un proceso de fibrosis hepática (Verderame y col., 2023). Estas alteraciones resultan coherentes con las observadas en los neonatos expuestos a GLI 2 %, donde se evidenció un proceso inflamatorio crónico acompañado de remodelación del parénquima hepático. En el estudio de Verderame y col. (2023), y en consistencia con nuestras observaciones, las lesiones registradas se asociaron a una pérdida progresiva de la arquitectura funcional del hígado. Reportes similares fueron realizados por Piras y col. (2024) en *A. mississippiensis*, donde la fibrosis hepática se relacionó con un defecto cutáneo caracterizado por hiperqueratosis, atrofia epidérmica y degeneración celular. Este fenómeno se asoció con desbalances en la distribución sistémica de micronutrientes, lo que podría comprometer la regeneración y la integridad estructural de la piel. Estas alteraciones coinciden con los cambios en los indicadores de actividad hepática (GPT y GOT) detectados en los ensayos de exposición embrionaria, que también se manifestaron en el estudio de exposición *in vivo* en pichones. En conjunto, los hallazgos histopatológicos reflejan un impacto significativo en la función hepática, ampliamente documentado en reptiles expuestos a xenobióticos (Kou y col., 2020; Wang y col., 2021; Tian y col., 2022; Chen y col., 2023; Lin y col., 2023). Esto sustenta la hipótesis de que los formulados analizados en este trabajo de tesis generan un efecto hepatotóxico en los caimanes, comprometiendo la función hepática desde etapas tempranas del desarrollo.

La determinación sexual en *C. latirostris* ocurre durante el periodo termosensible (PTS), que abarca los estadios 19-24 del desarrollo embrionario. Durante esta ventana crítica, la temperatura de incubación dirige la diferenciación gonadal, promoviendo el desarrollo ovárico a temperaturas bajas (29 y 31 ºC) y altas (34°C), mientras que a temperaturas de ~33°C, se favorece la formación testicular (Iungman y col., 2011; Parachú Marcó y col., 2017). Durante esta etapa, en cocodrilianos las gónadas atraviesan un rápido proceso de diferenciación morfológica y hormonal, donde la actividad de aromatasa impulsa la vía ovárica al favorecer la conversión de andrógenos a estrógenos; mientras que en machos la proliferación de células de Sertoli y la organización de los túbulos seminíferos consolidan el desarrollo testicular (Iungman y col., 2011; Galoppo y col., 2017). Esta etapa de rápido desarrollo podría representar una ventana de especial vulnerabilidad a perturbaciones ambientales o químicas (Moore y col., 2008; 2009). En este trabajo de tesis, la exposición ocurrió en las primeras etapas del desarrollo embrionario, lo que sugiere que los efectos observados podrían estar relacionados con alteraciones tempranas en la regulación hormonal y en la estructura tisular (Iungman y col., 2015).

Las observaciones histológicas revelaron desórdenes en la arquitectura del tejido germinal ovárico, caracterizados por una baja diferenciación de los nidos ovocitarios y la desorganización del epitelio germinativo. La expansión del sistema lagunar observada en el tratamiento GLI 2 % reflejó una disposición anómala en la región cortical, acompañada de difusión del límite córtex-médula e infiltración de células inmunológicas. Resultados similares fueron reportados para la especie luego de la exposición embrionaria a DEs (Stoker y col., 2003). Estas observaciones se relacionan con la desorganización tisular generalizada evidenciada en la formulación M1 (GLI 1 % + 2,4-D 0,06 %), donde se registró un aumento de espacios vacíos en el córtex y la presencia destacada de eosinófilos. Estos hallazgos se acompañaron de infiltrados celulares focales en la región cortical y perimedular, compuestos por linfocitos y eosinófilos con morfología y patrón de tinción específicos, que podría estar indicando un proceso inflamatorio inducido por los tratamientos aplicados. Adicionalmente, los mayores reordenamientos estructurales se observaron en las mezclas M2 y M3, con cambios morfológicos en el epitelio superficial y un aumento del tejido conectivo subepitelial, indicando procesos de reorganización y remodelación del estroma. Estos resultados sugieren un efecto temprano sobre procesos clave de diferenciación. En este sentido, investigaciones recientes sugieren que factores como el estrés y la exposición a xenobióticos, tienen el potencial de

influir en la determinación sexual y la funcionalidad gonadal (Akbulut y col., 2021; Yu y col., 2022; Verderame y col., 2022; Rosati y col., 2023).

Se ha reportado que la exposición sub-crónica a GLI (0,05 y 0,5 µg/kg) en hembras adultas de *P. siculus* interfiere con la función ovárica, induciendo el reclutamiento de células germinales, alteraciones en la anatomía folicular, regresión apoptótica anticipada de células piriformes, fibrosis tecal y desorganización del citoplasma y de la zona pelúcida del ovocito (Rosati y col., 2023). En un ensayo agudo *in vivo* de 5 días en *D. rerio*, la exposición a una concentración de 38 mg/L de IMI resultó en lesiones ováricas severas, incluyendo vacuolización y unificación en alveolos corticales, aumento en el número de oocitos atrésicos, y aperturas en las capas perifoliculares (Akbulut y col., 2021). Este mismo compuesto fue evaluado previamente en hembras de *E. argus* a una dosis de 20 mg/kg de peso corporal. Aunque en ese estudio no se detectaron alteraciones histológicas en el ovario, sí se observaron efectos significativos a nivel funcional, evidenciados por la alteración de las concentraciones plasmáticas de E2 (Yang y col., 2020). En consistencia con este antecedente, un estudio realizado en esta misma especie expuesta *in vivo* a CAP en concentraciones de 1−5 mg CAP/kg de suelo tampoco ecidenció daño histológico en los ovarios; sin embargo, los autores sugirieron que, a largo plazo, podría inhibir el desarrollo folicular y reducir el número de folículos en crecimiento, afectando potencialmente la reproducción (Yu y col., 2022). Estos estudios evidencian que distintos plaguicidas, incluidos GLI, IMI y CAP, pueden no generar alteraciones histológicas detectables; sin embargo, sí son capaces de comprometer la funcionalidad del tejido ovárico como órgano endócrino. Esta interpretación se refuerza con las alteraciones en las concentraciones de E2 y T observadas tras la exposición a dichos contaminantes, como se discute a continuación. En conjunto, estos hallazgos indican que la disrupción del eje HPG puede afectar procesos esenciales del ovario, como la maduración y la viabilidad ovocitaria, sugiriendo que la ausencia de daño morfológico no necesariamente refleja su integridad funcional.

Otras alteraciones reportadas en especies de vertebrados expuestos a contaminantes ambientales incluyen una disminución en el peso de los ovarios, alteraciones en la dinámica folicular, folículos atrésicos, fibrosis intersticial y una disminución de los folículos maduros, junto con una alteración en la expresión de los genes involucrados en la esteroidogénesis (Rauschenberger y col., 2008; Moore y col., 2012; Ren y col., 2018;

Hale y col., 2022; Rosati y col., 2023). Los cambios en el peso de los ovarios se asociaron con una reducción en los lípidos y el CL, ambos necesarios como fuente de energía para el desarrollo de los oocitos (Chacón y col., 2024). Esto compromete las reservas de energía para la actividad reproductiva en hembras adultas y la disponibilidad de CL como precursor de los esteroides sexuales, alterando la esteroidogénesis y, posteriormente, la reproducción (Chacón y col., 2024).

El oviducto cumple un rol central en la producción de componentes del huevo y su funcionamiento depende del desarrollo glandular (Tavalieri y col., 2024). En cocodrilianos, la adenogénesis del oviducto inicia después del nacimiento a partir de la formación de pequeñas invaginaciones epiteliales (*buds*) y de la reorganización del estroma subepitelial (Moore y col., 2008; 2009; Cooke y col., 2013; Tavalieri y col., 2024). Dado que la actividad ovárica regula en gran medida la morfología y funcionalidad del oviducto, las alteraciones observadas en este estudio podrían reflejar disrupciones inducidas por la exposición a las mezclas evaluadas, tales como la M1, M2 y M3, comprometiendo la organización tisular y la funcionalidad del epitelio glandular.

El epitelio oviductal de *C. latirostris* nacidas luego de la exposición *in ovo* a distintas FA reflejaron alteraciones estructurales comparables a las descritas por Tavalieri y col. (2024) en la diferenciación postnatal del oviducto. En los individuos no expuestos, el epitelio columnar simple se mantuvo intacto, sin modificaciones ni signos de alteraciones sobre la lámina basal, consistente con la morfología esperada en neonatos no expuestos según la bibliografía existente (Galoppo y col., 2017; Tavalieri y col., 2020; 2024). Contrariamente, las muestras de oviductos provenientes de tratamientos como el GLI 2%, M1, M2 y M3 mostraron desordenes estructurales tales como protrusiones epiteliales, desórdenes epiteliales con inmersión de células epiteliales al interior del estroma y proyecciones. Resultados similares en la misma especie fueron reportados por Tavalieri y col. (2024) tras la exposición a END y atrazina (ATZ). En esta línea, múltiples estudios han documentado que la exposición postnatal temprana a diversos xenobióticos puede inducir modificaciones estructurales y funcionales en tejidos diana de hormonas esteroides, comprometiendo su desarrollo y diferenciación (Altamirano y col., 2017; Galoppo y col., 2017; Alarcón y col., 2019).

La exposición embrionaria a FA y sus mezclas indujo alteraciones morfológicas evidentes en el testículo de neonatos de *C. latirostris*. Entre los principales cambios se destacó un marcado incremento del espacio luminar en los túbulos seminíferos, así como una notable desorganización del tejido germinal, lo que dificultó la identificación de las distintas poblaciones celulares en comparación con el grupo control. En consistencia con algunas de nuestras observaciones en neonatos expuestos a IMI, en *E. argus* este compuesto también provocó una marcada desorganización del epitelio espermatogénico, vacuolación en los túbulos seminíferos y una reducción significativa de la espermatogénesis, acompañada por alteraciones en la concentración plasmática de T (Yang y col., 2020). Asimismo, nuestros resultados se alinean con evidencias previas en *C. latirostris* donde la exposición embrionaria a contaminantes ambientales también generó una alteración de la arquitectura testicular normal, caracterizada por túbulos seminíferos desorganizados y luces agrandadas y vacías (Stoker y col., 2003). Además, dichos autores reportaron alteraciones en la programación gonadal, particularmente en individuos genotípicamente machos, evidenciando que la exposición a DEs puede inducir reversión sexual en esta especie (Stoker y col., 2003). Más adelante, Stoker y col. (2008) observaron que la exposición *in ovo* a END y ATZ inducía una feminización parcial de las gónadas masculinas, con nidos ovocitarios poco definidos y organización anómala del tejido germinal. Durando y col. (2013) ampliaron estos hallazgos al documentar que la exposición a END alteraba de forma persistente la histoarquitectura testicular, incluyendo incremento del área luminar, desorganización tubular y modificaciones duraderas desde neonatos hasta juveniles. En línea con estos resultados, Canesini y col. (2017, 2023) describieron efectos similares tras la exposición a END y ATZ, con alteraciones estructurales y cambios en la expresión de genes clave para la diferenciación gonadal, como *sox9*, *amh* y *cyp19a1*. En este último estudio, se observó un patrón transcripcional alterado indicativo de desbalance hormonal, incluso en ausencia de cambios morfológicos evidentes, lo que sugiere un compromiso funcional de la gónada masculina. En *P. siculus*, Verderame y col. (2022) demostraron que incluso bajas concentraciones de GLI administradas por vía oral cada 48 h durante tres semanas (0,05 y 0,5 µg/kg) generan alteraciones morfológicas severas en los túbulos seminíferos, incluyendo daño del epitelio seminíferos, desprendimiento de células germinales y signos de fibrosis testicular. En consistencia con nuestro análisis, los disruptores metabólicos (DMs) inducen la formación de túbulos seminíferos desorganizados, con pérdida de conexiones intercelulares intratubulares, que son fundamentales para el control de la proliferación y

diferenciación celular durante la espermatogénesis (de Montgolfier y col., 2007; Verderame y col., 2022). Además, el engrosamiento del tejido conectivo peritubular, con desarrollo de fibras colágenas, podría interferir con la señalización parácrina testicular, comprometiendo la funcionalidad gonadal. En esta línea, Rey y col. (2009) demostraron que la exposición embrionaria a END durante el PTS altera el equilibrio entre proliferación y apoptosis en células testiculares de neonatos, reforzando la hipótesis de que el testículo en desarrollo es altamente sensible a la acción de DMs.

En línea con la hipótesis de que las mezclas de contaminantes presentes en el ambiente pueden impactar negativamente la reproducción en crocodílidos, diversos estudios han documentado alteraciones morfológicas y funcionales asociadas a la exposición embrionaria. Por ejemplo, en *A. mississippiensis* se observó una reducción del tamaño del pene, junto con cambios en la expresión de genes esteroidogénicos y una pérdida del patrón dimórfico sexual característico (Milnes y col., 2008). De manera consistente, alguno de nuestros resultados se corresponde con las alteraciones reportadas en otros crocodílidos expuestos ambientalmente, como los juveniles de *A. mississippiensis* que presentaron ovarios con folículos poliovulares, ovocitos polinucleados y testículos con túbulos seminíferos desorganizados, acompañados de una marcada reducción del tamaño del pene y niveles anómalamente bajos de testosterona (Guillette y col., 1994; 1999). Complementariamente, Vonier y col. (1996) identificaron que diversos contaminantes ambientales presentes en huevos de aligatóridos tienen afinidad por los receptores de estrógeno y progesterona del oviducto, confirmando su potencial para modular negativamente la señalización hormonal esteroidea. Moore y col. (2012) profundizaron en los mecanismos funcionales, describiendo una menor respuesta ovárica a la hormona folículo estimulante, junto con una reducción en la expresión de *aromatasa*, *inhibina βA* y *follistatina* en hembras expuestas a contaminantes ambientales, lo que refleja una alteración persistente en la capacidad de regulación endocrina postnatal.

Nuestros resultados mostraron que, seis meses después de la exposición *in vivo*, los animales expuestos presentaron alteraciones en los niveles de E2 y T, lo que sugiere que el efecto de la exposición sub-crónica sobre la esteroidogénesis puede sostenerse en el tiempo. Se observaron niveles significativamente mayores de E2 en los tratamientos con GLI 2 %, 2,4-D 0,12 % y en la mezcla M3, mientras que los niveles de T fueron significativamente menores en el tratamiento con IMI 0,2 % en comparación con el grupo

control. Resultados similares fueron observados en machos de *E. argus,* donde la exposición al IMI (20 mg/kg de peso corporal) también redujo significativamente las concentraciones plasmáticas de T (Yang y col., 2020). En concordancia con estos hallazgos y con las lesiones gonadales registradas, otros autores han reportado que los cambios histológicos en las gónadas de *A. mississippiensis* expuestas a contaminantes ambientales se asociaron con alteraciones en la función esteroidogénica (Guillette y col., 1994; 1997; 1999; Vonier y col., 1996; Crain y col., 1998; Hale y col., 2022). Entre estos estudios, se reportó que machos juveniles del cocodrilo americano provenientes del lago contaminado Apopka presentaron niveles significativamente mayores de E2 y menores de T y reducción en el tamaño del falo (genitales externos) en comparación con un lago no contaminado, mientras que las hembras juveniles mostraron niveles de E2 significativamente elevados (Guillette y col., 1994; 1999). De manera similar a lo observado en nuestro ensayo de exposición embrionaria, la exposición *in ovo* a 2,4-D a concentraciones de 0,14 ppm, 1,4 ppm y 14 ppm, no actuó como un DEs visible en *A. mississippiensis*, ya que no alteró los niveles de hormonas sexuales (Crain y col., 1997). Las discrepancias observadas en los resultados de los dos estadios de exposición (durante el desarrollo en ambas especies y a los 6 meses de edad para *C. latirostris*) puede deberse, entre otros factores, a que el ensayo de exposición *in vivo* presentó mayor biodisponibilidad del compuesto ya que los animales estaban en contacto directo con la solución cada vez que ingresaban al agua, como así también, a los cambios en la maduración de los órganos reproductivos que podría derivar en alteraciones fisiológicas más severa. Se ha propuesto que la exposición a compuestos con actividad estrogénica puede alterar el equilibrio hormonal al favorecer la producción de E2 sobre T. Este tipo de desbalance ha sido documentado previamente en cocodrilianos expuestos a contaminantes ambientales (Doheny, 2016). Otras investigaciones informaron la presencia de hembras con reversión sexual y función gonadal intermedia, y actividad cerebral masculinizada (Gunderson y col., 2001; Stoker y col., 2003). De manera similar, en machos, el daño a la histoarquitectura testicular está relacionado con niveles alterados de T (Rey y col., 2009) y una sobreconversión de andrógenos a E2, lo que causa un desequilibrio hormonal que posteriormente da lugar a hipogonadismo (Liu y col., 2017).

Yu y col. (2022) investigaron los posibles cambios en las estrategias de asignación energética en hembras de *E. argus* expuestas de manera sub-crónica a CAP, y reportaron concentraciones reducidas de T, junto con una disminución en las reservas energéticas,

principalmente TG y CL. Además, los autores sugirieron que este efecto podría inhibir la secreción de E2 como consecuencia de una alteración del eje HPG (Yu y col., 2022). Si bien el tratamiento con CAP no mostró alteraciones en el nivel plasmático de T, sí se observó un aumento en la relación E/T tras la exposición al CAP, una alteración que también se manifestó en las mezclas M2 y M3, las cuales contienen CAP como p.a. Este hallazgo sugiere que el CAP es un componente clave que impulsa la alteración de este indicador sensible del equilibrio esteroidogénico, tanto cuando se administra individualmente como en combinación.

Hasta la fecha, los estudios sobre la histoarquitectura intestinal en aligatóridos y caimanes se han centrado principalmente en aspectos relacionados con la alimentación y patologías asociadas a sistemas intensivos de cría (Staton y col., 1990; Huchzermeyer, 2003; Starck y col., 2007). Sin embargo, el impacto de la contaminación ambiental sobre la estructura y funcionalidad intestinal en cocodrílidos ha sido escasamente abordado, y menos aún en estadios neonatales. Durante el desarrollo embrionario en caimanes, el intestino cumple un rol central como una barrera inmunológica y participa en la absorción de nutrientes del vitelo a través del conducto vitelino, el cual permanece funcional hasta la eclosión (Huchzermeyer, 2003; Siddiqui y col., 2022). Esta actividad temprana hace que el intestino sea un órgano altamente activo y, por lo tanto, vulnerable durante la transición post-eclosión. En este contexto, la exposición a bacterias patógenas y factores estresantes como variaciones de temperatura y exposición a xenobióticos, puede desencadenar cuadros de enteritis, caracterizados por inflamación intestinal con exudación de fibrina y oclusión del lumen intestinal (Huchzermeyer, 2003). Nuestros resultados son consistentes con los reportes realizados por Tang y col. (2021) en peces expuestos a contaminantes, evidenciando infiltrados focales de células mononucleares basófilas compatibles con inflamación, hiperplasia epitelial en criptas y pérdida de organización estructural en la lámina propia, observadas en neonatos de *C. latirostris* expuestos *in ovo* a formulaciones individuales y mezclas de agroquímicos (GLI 2 %, 2,4-D 0,12 %, CAP 0,03 %, M2 y M3). En concordancia con nuestras observaciones, algunos estudios han evaluado los efectos de contaminantes sobre la histología intestinal en peces, evidenciando alteraciones estructurales como fusión de vellosidades, infiltrado celular y necrosis (Ferrando y col., 2006; Gaber y col., 2014; Barišić y col., 2018), lo que sugiere un potencial riesgo similar para reptiles expuestos a condiciones ambientales adversas. La alteración morfofisiológica del intestino luego de la exposición, podría impedir la alimentación

adecuada, provocar pérdida de peso y distensión abdominal, afectando su salud inmunológica y comprometiendo severamente la viabilidad del individuo (Huchzermeyer, 2003; Siddiqui y col., 2022; Murphy y col., 2022; Gawin y col., 2024).

La evidencia disponible muestra que las alteraciones metabólicas inducidas por contaminantes pueden persistir más allá de la exposición directa. Aunque los mecanismos transgeneracionales no fueron evaluados en este estudio, trabajos previos demuestran que DMs pueden generar cambios duraderos en la expresión de factores de transcripción como *pparα* y *pparγ,* así como otros reguladores del metabolismo de lípidos, entre ellos *lpl*, *srebp-1c* y *fasn* (Chamorro-García y col., 2013; Coimbra y col., 2015). En *D. rerio*, por ejemplo, estas alteraciones hepáticas incluso variaron entre generaciones, lo que indica que pueden mantenerse y manifestarse de forma diferencial a lo largo del tiempo. En este contexto, las modificaciones que detectamos en la expresión de *pparγ* y en los perfiles lipídicos podrían no limitarse al individuo expuesto, sino constituir el inicio de cambios de mayor alcance que, de mantenerse en el tiempo, podrían incluso transferirse a la descendencia. En línea con estos hallazgos, Kubsad y col. (2019) documentaron que la exposición a plaguicidas, como el GLI, puede inducir cambios epigenéticos persistentes, afectando la expresión de los mismos genes involucrados en la regulación lipídica evaluados en este trabajo. Dichas modificaciones han sido asociadas con una mayor susceptibilidad a trastornos metabólicos crónicos en generaciones descendientes (Kubsad y col., 2019). Adicionalmente, estudios recientes han confirmado que la exposición a contaminantes durante etapas críticas del desarrollo embrionario puede inducir alteraciones epigenéticas heredables, incluso en ausencia de exposición directa en la descendencia (Gore y col., 2008; Roza y col., 2024).

En este contexto, los hallazgos de esta tesis, en particular, las alteraciones observadas en genes reguladores del metabolismo lipídico, los cambios tisulares y las diferencias en la composición bioquímica en yema y plasma, se alinean con los patrones descritos en la literatura sobre reprogramación metabólica inducida por contaminantes ambientales. Aunque no se evaluaron las generaciones F1 o F2 o biomarcadores epigenéticos, los resultados aquí presentados refuerzan la necesidad de considerar los efectos diferidos y modulados epigenéticamente por parte de los agroquímicos durante ventanas críticas del desarrollo embrionario. Esta perspectiva adquiere especial relevancia para especies silvestres expuestas a ambientes contaminados, donde la presión ambiental puede operar

como un factor epigenético modulador, con implicancias severas en la fisiología reproductiva y en la conservación de las poblaciones naturales.

4.2. Etapa 2

4.2.1. Monitoreo ambiental de poblaciones silvestres de *C. latirostris*

En relación con los resultados obtenidos de neonatos en áreas ambientalmente expuestas, si bien el número de datos es limitado, es posible observar ciertos patrones que permiten arribar a conclusiones preliminares.

El éxito de eclosión no fue estadísticamente menor en los neonatos provenientes de áreas ambientalmente expuestas, aunque se observó una disminución del 6,5 % respecto del sitio no expuesto. Es posible que, debido al bajo número de nidos colectados, no se haya alcanzado significancia estadística. Sin embargo, Ortiz y col. (2026) reportaron un éxito de eclosión significativamente menor en neonatos de *C. latirostris* provenientes del sitio "El Lucero", en comparación con otros sitios con menor presión antrópica. Es necesario destacar que este sitio corresponde al mismo lugar donde fueron colectados los huevos utilizados en la Etapa 2 de este estudio. Este sitio se caracteriza por ser una zona agro-productiva intensiva, además de una marcada fragmentación del hábitat. Previamente, en este mismo sitio, Poletta y col. (2024) detectaron concentraciones de 5,3 mg/kg de GLI, 0,5 mg/kg de AMPA y 2,5 mg/kg de 2,4-D en el material vegetal de un nido de yacaré perteneciente al conjunto de nidos recolectados en el marco del presente estudio y utilizado para la obtención de los ejemplares incluidos en esta tesis doctoral. Además, en el agua asociada a este mismo sitio se cuantificaron concentraciones de hasta 1,9 µg/L de GLI, 0,8 µg/L de AMPA y 1,6 µg/L del insecticida cipermetrina. En otras muestras de agua provenientes de sitios expuestos, se detectaron concentraciones de 0,5 µg/L de IMI, 1,8 µg/L de cipermetrina y 0,6 µg/L de atrazina (Poletta y col., 2024). Recientemente en el trabajo de Ortiz y col. (2026), el sitio "El Lucero" fue identificado como uno de los ambientes más vulnerables a la contaminación, registrando el mayor porcentaje de embriones inviables y huevos infértiles entre todas las zonas de nidificación monitoreadas en 18 años de registros ambientales. En este contexto, nuestros resultados preliminares sugieren que la exposición ambiental podría estar afectando el desarrollo embrionario y reduciendo la viabilidad de las posturas, aunque el tamaño muestral limitado podría haber

impedido detectar diferencias significativas. Cabe destacar que, en los sitios sin exposición directa a agroquímicos de los cuales se recolectaron los nidos utilizados como referencia o controles, no se detectaron residuos de plaguicidas en muestras de agua ni en el material de nido por encima del límite de cuantificación (Poletta y col., 2024).Los caimanes provenientes de áreas potencialmente expuestas y no expuestas a xenobióticos de la actividad agrícola revelaron menor peso e índice de CC en los neonatos provenientes de ambientes considerados perturbados. Nuestros resultados son consistentes con lo reportado por otros autores, quienes observaron que ambientes con un alto grado de antropización y la presencia de residuos de plaguicidas se asocian con menores índices de condición corporal en pichones de aves y otros reptiles (Araujo y col., 2024; Gama y col., 2025; Fuentes y col., 2025).

El análisis inicial del perfil de AG en la yema residual de neonatos provenientes de áreas ambientalmente expuestas a formulaciones agroquímicas reveló alteraciones significativas en los niveles de AGS, AGMI y AGPI. Este patrón de disrupción no fue observado en los tratamientos experimentales, donde únicamente los AGPI presentaron modificaciones. Estos resultados evidencian un impacto más profundo ejercido por la exposición ambiental a mezclas complejas e inespecíficas de xenobióticos sobre la composición lipídica de la yema residual, la cual representa una fuente energética esencial durante los primeros días post-eclosión. Además, debido a las funciones fisiológicas de estos AG durante los primeros días de vida de los neonatos, la alteración en su composición podría traducirse en una reducción de la tasa de eclosión, disminución de la capacidad adaptativa y del estado general de salud de los individuos expuestos. Nuestros resultados también indicaron que el AA aportó un 2,71 % del total de AGPI en los neonatos de áreas controles, mientras que representa el 5,13 % en los neonatos del grupo de áreas expuestas. Esta diferencia porcentual refleja un cambio sustancial en la composición de AGPI, los cuales son predominantemente de origen materno y desempeñan un papel clave en procesos fisiológicos como la inflamación, la señalización celular y la maduración del sistema inmunológico (Navarro y col., 2001; Lábaque y col., 2013). Al mismo tiempo, esta variación en la composición lipídica permite inferir de manera indirecta el estado metabólico de las hembras reproductoras, dado que la transferencia materna de lípidos hacia la progenie está estrechamente relacionada con la disponibilidad energética, la dieta y la regulación endocrina durante la gestación y la vitelogénesis (Navarro y col., 2001; Labaque y col., 2013; Leiva y col., 2018).

Consistente con nuestros resultados, Patino-Martínez y col. (2025) reportaron un valor medio de AA del 3,7 % (rango 2,6-6,2 %) en huevos de *Dermochelys coriacea*, indicando una inversión materna considerable en este AGPI, incluso en contextos de exposición ambiental. En este sentido, los valores observados en nuestro estudio se sitúan dentro del rango previamente documentado para reptiles ovíparos, lo que refuerza la relevancia del AA como biomarcador sensible de variaciones ambientales y fisiológicas. Estas diferencias indicarían que el perfil lipídico de la yema no es estático, sino que puede presentar variabilidad natural entre cohortes o ser modulado por factores ambientales, lo cual debe considerarse al momento de utilizar estos compuestos como indicadores de referencia para estudios de exposición a contaminantes.

Adicionalmente, en la etapa de monitoreo ambiental se observaron alteraciones que resultan comparables con las registradas en los tratamientos experimentales con mezclas, particularmente con la mezcla M3. Variaciones en los niveles de metabolitos lipídicos, actividad hepática, expresión génica y marcadores de estrés oxidativo, muestran patrones consistentes entre ambas condiciones de exposición. Por ejemplo, los neonatos provenientes de áreas ambientalmente expuestas a xenobióticos relacionados con la actividad agrícola presentan una baja concentración de TGs junto con un aumento en los niveles de CL, una combinación bioquímica que también se manifiesta en los individuos tratados con la M3. Además, los niveles de la actividad enzimática de GPT en el sitio expuesto fue 8,1 % mayor en comparación con el sitio sin exposición, aunque esta diferencia no haya sido estadísticamente significativa, presentó un patrón de comportamiento también observado en la M3 en el ensayo de exposición embrionaria. Por su parte, los niveles de GOT mostraron valores significativamente menores en el área ambientalmente expuesta (- 23,6 %), efecto evidenciado en ambos ensayos experimentales. Nuestros resultados, aunque preliminares, se encuentran en línea con lo reportado en otros reptiles en ambientes expuestos a diferentes presiones antrópicas. Por ejemplo, Gama y col. (2025) reportaron que ambas enzimas se vieron alteradas en *C. latirostris* expuestos a altos niveles de contaminación ambiental, lo que refuerza su utilidad como biomarcadores sensibles de alteración hepática en contextos de perturbación antrópica. A su vez, tanto el peso corporal como el índice de CC en los animales provenientes de áreas agrícolas resultaron marcadamente inferiores respecto a aquellos de zonas no expuestas, reflejando un deterioro en el estado fisiológico general. De manera concordante, la falta de crecimiento fue observada en los pichones expuestos

sub-crónicamente a la mezcla M3, indicando una posible interferencia de dicha combinación de agroquímicos en los procesos de crecimiento y desarrollo.

Complementariamente, los análisis preliminares de expresión génica evidenciaron alteraciones significativas en los niveles relativos de transcriptos asociados al metabolismo lipídico entre individuos provenientes de áreas expuestas y no expuestas. En particular, se registraron niveles inferiores de *g-6-pdh* tanto en sangre como en hígado, mientras que *me* presentó una subexpresión en sangre, pero una sobreexpresión en hígado, juntamente con *lpl*, *fas*, *pparα* y *pparγ* en neonatos de áreas expuestas. De manera comparativa, muchos de estos resultados también fueron observados en los ensayos experimentales controlados, especialmente en aquellos tratamientos con las mezclas M1, M2 y M3. Notablemente, los niveles de expresión del gen *srebp1-c* fueron significativamente menores en neonatos provenientes de áreas ambientalmente expuestas, aunque su gen objetivo, *fas,* no mostró un comportamiento de expresión esperado, como sí se observó en la M3 del ensayo *in ovo*. Esta discrepancia podría deberse a que los individuos provenientes de áreas ambientalmente expuestas, caracterizadas por una intensa actividad agrícola, están sometidos a una exposición simultánea de múltiples plaguicidas con diferentes mecanismos de acción y sin un patrón definido de dosis-respuesta (Bain y col., 2025). Además, al tratarse de organismos derivados de hembras expuestas crónicamente en el ambiente, es posible que presenten respuestas transcripcionales moduladas por efectos acumulativos o adaptativos, lo que explicaría las diferencias observadas respecto a la mezcla M3 del ensayo *in ovo*, donde las condiciones y concentraciones de exposición fueron controladas y conocidas.

Los hallazgos histológicos obtenidos en neonatos de *C. latirostris* provenientes de áreas naturales expuestas, si bien preliminares, evidencian posibles alteraciones estructurales a nivel tisular que podrían estar asociadas a la exposición crónica de los parentales o a la exposición de los huevos a sustratos contaminados como el pasto o suelo. En el tejido hepático, se observaron regiones con desarrollo marcado de fibras colágenas, así como infiltrado de células inmunitarias (linfocitos y eosinófilos), características compatibles con un proceso inflamatorio focal. Acompañando estas observaciones, el contenido lipídico hepático fue menor en neonatos provenientes de ambientes contaminados, un patrón similar al descrito en aves expuestas a contaminantes ambientales (Wang y col., 2021). Aunque en condiciones normales la movilización de lípidos tras el nacimiento es

esperable y necesaria para el metabolismo neonatal (Chacón y con., 2024), en este caso, la reducción del contenido hepático de lípidos podría estar vinculada al desarrollo de fibrosis perivascular observada en el parénquima hepático. En neonatos, este proceso fibrogénico puede comprometer la arquitectura tisular y limitar la capacidad de almacenamiento lipídico, afectando la homeostasis metabólica, tal como se ha documentado en otras especies (Chang y col., 2018; Verderame y col., 2023). Esta hipótesis se ve reforzada por los niveles plasmáticos más bajos de TG, reflejando una baja disponibilidad sistémica de lípidos asociada a un disfuncionamiento hepático incipiente.

En las gónadas de hembras, se observó la presencia de focos de células inmunes en el estroma cortical y modificaciones en la organización epitelial del oviducto, con *buds* e invaginaciones más marcadas respecto a los controles. En los testículos, se registró un aumento del espacio luminar de los túbulos seminíferos y la presencia de células necrosadas, lo cual, de confirmarse, podría reflejar una alteración en la integridad del epitelio germinal. Estos cambios coincidieron con los observados en el experimento de exposición embrionaria a los tratamientos con GLI, IMI, CAP y las mezclas. Además, estos resultados, aunque preliminares, son consistentes con las modificaciones histológicas en el tejido gonadal reportada en otros reptiles (Rosati y col., 2023; Akbulut y col., 2021; Yu y col., 2022).

En el intestino, se identificaron lesiones compatibles con edema subepitelial o con un desprendimiento incipiente del epitelio, cambios que coinciden con reportes en otros vertebrados expuestos a distintos xenobióticos (Tang y col., 2021). Dada la función crítica del intestino en la absorción de nutrientes del vitelo a través del conducto vitelino en neonatos, cualquier alteración en su morfofisiología puede comprometer severamente la nutrición, el desarrollo y la viabilidad del individuo (Huchzermeyer, 2003; Siddiqui y col., 2022). La alteración estructural intestinal observada, en concordancia con los menores índices CC y TGs plasmáticos en neonatos provenientes de áreas expuestas ambientalmente, sugiere una absorción deficiente del vitelo residual a través del intestino durante los primeros días post-eclosión.

Si bien es necesario continuar la recolección de datos y ampliar el número de individuos analizados, estos hallazgos preliminares, en consonancia con lo documentado en otros estudios de campo (Fasola y col., 2022; Gama y col., 2025), permiten inferir que las áreas

sujetas a mayor presión antrópica por actividad agrícola, y, por ende, a la exposición crónica a mezclas complejas de formulaciones plaguicidas, inducen disrupciones significativas en el metabolismo lipídico de los neonatos. Estas alteraciones se manifiestan desde niveles moleculares (como la modulación de genes asociados a la homeostasis lipídica), metabólicos y tisulares, hasta consecuencias observables a nivel de organismo, como una menor condición corporal, factor crítico para la supervivencia de los neonatos en sus primeros meses de vida (Poletta y col., 2011; Siroski y col., 2024).

El análisis de componentes principales (PCA) basado en los parámetros metabólicos de neonatos de *C. latirostris*, incluyendo niveles de TGs, CL, actividad de GOT, expresión génica de *g6pdh* y *me* en sangre, niveles de lipoperoxidación y CC, permitió identificar patrones metabólicos diferenciales entre individuos provenientes de áreas con y sin exposición ambiental. Complementariamente, el análisis de PCA aplicado a hembras adultas y sus crías, permitió explorar la relación metabólica entre hembras y neonatos provenientes de ambientes con diferente grado de exposición ambiental. Estos resultados preliminares coinciden con estudios previos en crocodílidos, donde la exposición parental a contaminantes orgánicos persistentes, como pesticidas organoclorados, se asoció a alteraciones metabólicas, reducción en la viabilidad de las nidadas y modificaciones en la composición lipídica de los huevos (Rauschenberger y col., 2007). No obstante, investigaciones recientes en *C. latirostris* procedentes de zonas agrícolas del centro-norte de Santa Fe han registrado que las áreas con alto grado de perturbación por agroquímicos se correlacionan con nidadas de menor éxito de eclosión y una mayor proporción de embriones inviables (Ortiz, 2023).

Un mecanismo posible detrás de estas alteraciones es la transferencia materna de contaminantes. En este sentido, muchos agroquímicos son lipofílicos y, por lo tanto, pueden acumularse en los tejidos grasos de las hembras expuestas crónicamente durante la vitelogénesis y ser transferidos a los huevos, representando un riesgo crítico para el desarrollo embrionario (Humphries y col., 2021). En concordancia, se han reportado niveles elevados de plaguicidas persistentes en tejidos y huevos de distintas especies de cocodrilianos (Rauschenberger y col., 2007; Stoker y col., 2011; Buah-Kwofie y col., 2017; Humphries y col., 2021). Entre los efectos documentados de esta transferencia materna se incluyen la disminución del éxito de eclosión, el aumento de la mortalidad embrionaria y del porcentaje de huevos infértiles, así como una reducción en el tamaño

de las posturas (Rauschenberger y col., 2004, 2007, 2009; Stoker y col., 2011). En *C. latirostris*, donde el desempeño reproductivo depende estrechamente del estado fisiológico y metabólico de la hembra (Leiva, 2019), la exposición prolongada a agroquímicos podría comprometer la eficiencia reproductiva respecto de los valores normales reportados para la especie. Asimismo, se ha demostrado que algunos contaminantes presentes en el material de anidación también pueden transferirse a los huevos de cocodrilianos en incubación; por lo tanto, la transferencia materna no sería la única fuente de contaminación (Nilsen y col., 2020). En línea con esta evidencia, Barraza y col. (2021) encontraron efectos reproductivos negativos tras la exposición a diferentes contaminantes en diversas especies de cocodrilos a nivel mundial (Barraza y col., 2021). Estos antecedentes son consistentes con la relación observada en los perfiles metabólicos de hembras y crías provenientes de áreas expuestas y no expuestas, lo que podría reflejar una influencia de la transferencia materna asociada al entorno de origen.

5. Conclusión general

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis respaldan la hipótesis de que la exposición a agroquímicos formulados genera alteraciones sobre mediadores, vías de señalización y genes involucrados en el metabolismo lipídico de *C. latirostris*. Estas alteraciones se reflejaron en cambios en el perfil lipídico y en la actividad hepática, acompañados por modificaciones en la expresión de genes clave como *pparα*, *pparγ* y *srebp-1c*, así como en las concentraciones de metabolitos bioactivos derivados del metabolismo lipídico, como los eicosanoides. Asimismo, se observaron consecuencias fisiológicas sobre el sistema reproductivo, incluyendo alteraciones hormonales, desorganización gonadal y daños histológicos en hígado e intestino, que reflejan un compromiso funcional potencialmente persistente.

Los resultados obtenidos en los ensayos experimentales de esta tesis muestran una notable coherencia con los datos preliminares registrados en el monitoreo de poblaciones naturales, a pesar de que su extrapolación debe realizarse con cautela. Las pruebas con formulaciones comerciales y sus mezclas permitieron evidenciar, cómo estos compuestos impactan sobre el estado metabólico general y particularmente asociado a lípidos en *C. latirostris*. Esta respuesta se acentúa especialmente cuando la exposición ocurre en etapas tempranas del desarrollo embrionario, antes de la organogénesis. Esta ventana es crítica y podría predisponer a los individuos a fallas en la programación fisiológica normal y en la consolidación de un estado saludable.

El análisis del perfil lipídico basal en yemas de huevos provenientes de un área sin exposición directa a agroquímicos formulados permitió establecer valores de referencia para las distintas fracciones lipídicas bajo condiciones naturales. Estos resultados constituyen una línea base indispensable para interpretar las variaciones observadas en huevos expuestos a ambientes contaminados, facilitando la identificación de alteraciones atribuibles a la acción de plaguicidas y contribuyendo a una mejor comprensión del metabolismo lipídico embrionario en *C. latirostris*.

La determinación del perfil lipídico, su metabolismo y los indicadores de actividad hepática en neonatos expuestos bajo condiciones controladas a formulaciones de glifosato, 2,4-D, clorantraniliprole, imidacloprid y sus mezclas permitió evidenciar

alteraciones en la homeostasis lipídica y en la función hepática, reflejadas en cambios en los metabolitos plasmáticos y en la expresión de genes reguladores del metabolismo lipídico. Estas respuestas variaron según el tipo de compuesto y la combinación de principios activos, mostrando en general efectos más marcados en las mezclas. A partir de estos hallazgos y en relación con el perfil lipídico basal previamente establecido en yemas, los resultados confirman que la exposición a concentraciones equivalentes a las de uso agrícola puede alterar procesos metabólicos clave desde etapas embrionarias, comprometiendo la regulación energética y la función hepática en *C. latirostris*.

La evaluación de los eicosanoides bajo exposición *in vivo* a formulaciones comerciales de glifosato, 2,4-D y su mezcla permitió evidenciar alteraciones en los mediadores lipídicos derivados de las vías COX y LOX, reflejando una modulación de los procesos inflamatorios y del metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados. Estos hallazgos confirman que la exposición sub-crónica a formulaciones de agroquímicos puede inducir un desbalance en los mecanismos de señalización lipídica, comprometiendo la respuesta fisiológica y la homeostasis del *C. latirostris*.

La evaluación de los niveles de corticosterona y de los indicadores de lipoperoxidación permitió identificar, por un lado, la activación del eje adrenocortical y, por otro, la presencia de daño oxidativo a nivel celular, dos procesos fisiológicos completamente distintos que respondieron a la exposición embrionaria a formulaciones comerciales de plaguicidas y sus mezclas.

Las variaciones observadas en ambos parámetros sugieren un aumento del daño oxidativo a los lípidos y un mayor estado de estrés sistémico en los organismos expuestos, especialmente bajo la acción combinada de los compuestos. Estos resultados fortalecen la hipótesis de que las mezclas de agroquímicos pueden generar desequilibrios en la regulación endocrina y redox del *C. latirostris*, afectando su capacidad de respuesta fisiológica frente a condiciones ambientales adversas.

El análisis histológico del hígado, las gónadas y el intestino de neonatos expuestos experimentalmente a plaguicidas reveló alteraciones estructurales indicativas de disfunciones tisulares. Entre los principales cambios se observaron desorganización celular, modificaciones en la histoarquitectura del parénquima y signos de degeneración

hepática, acompañados de alteraciones en la organización gonadal ovárica, testículo y en la integridad del epitelio intestinal. Dado que la exposición ocurrió durante etapas críticas del desarrollo embrionario, particularmente durante la organogénesis y antes del periodo termosensible en el que se definen las gónadas, los resultados presentados en este trabajo de tesis aportan sustento empírico de que dicha ventana de vulnerabilidad es determinante para el desarrollo apropiado de los órganos reproductores. Por lo antes mencionado, es posible inferir que la exposición a formulaciones de plaguicidas, incluso a concentraciones potencialmente presentes en el ambiente por procesos de transporte y persistencia ambiental, puede comprometer la estructura y funcionalidad de órganos clave, constituyendo un indicador sensible de los efectos tóxicos subletales en *C. latirostris.*

Más aún, el seguimiento de los neonatos permitió demonstrar que la exposición sub-crónica a agroquímicos formulados puede generar efectos persistentes sobre la función reproductiva, reflejados en alteraciones en los niveles plasmáticos de hormonas sexuales como el estradiol y la testosterona, evidentes incluso seis meses después de finalizada la exposición. Este hallazgo sugiere que el daño endocrino podría perdurar en el tiempo, afectando potencialmente la maduración y la función gonadal. Estos resultados adquieren especial relevancia ecológica si se considera que el área de distribución de *C. latirostris* se encuentra fuertemente solapada con regiones de expansión agrícola intensiva, donde la liberación de plaguicidas ocurre de manera continua y en forma de mezclas, exponiendo a los animales de manera crónica. Bajo estas condiciones, los efectos sobre el eje endócrino podrían ser aún más severos que los observados en este trabajo, en el cual las exposiciones se realizaron bajo concentraciones específicas y condiciones controladas, y por un periodo de tiempo limitado luego de la exposición.

De manera comparativa, los hallazgos del monitoreo ambiental, aunque limitados en número y alcance, refuerzan la hipótesis central de esta tesis. La necesidad de fortalecer dichos monitoreos es evidente, ya que dependen fuertemente de factores climatológicos, como sequías, régimen de lluvias y temperatura ambiental, que regulan directamente el régimen reproductivo de la especie. En este sentido, muchas poblaciones silvestres enfrentan una exposición crónica a agroquímicos, cuya aplicación suele coincidir con dos períodos clave: la reproducción (simulada aquí en los ensayos *in ovo*) y el desarrollo post-

eclosión (ensayado en crías *in vivo*), etapas altamente sensibles para la supervivencia y programación metabólica de los caimanes.

La respuesta observada en los múltiples biomarcadores evaluados, desde los moleculares hasta los sistémicos, sugieren un detrimento potencial en la salud y la aptitud de los caimanes que habitan regiones sometidas a intensa actividad agrícola, subrayando la necesidad de integrar estudios de campo con enfoques de evaluación de mezclas para estimar con mayor precisión los riesgos ecotoxicológicos reales. Si bien las alteraciones observadas no siempre comprometen de forma directa la viabilidad de los neonatos, otros parámetros, como los bioquímicos, endócrinos y moleculares evaluados podrían verse modulados de forma persistente, afectando el desempeño fisiológico y reproductivo a largo plazo. En este marco, los efectos observados adquieren relevancia ecológica y de conservación, ya que podrían repercutir en la dinámica reproductiva de *C. latirostris* con efectos incluso, transgeneracionales. La evaluación futura de estas dimensiones resulta imprescindible para comprender en profundidad el alcance ecológico de la contaminación por agroquímicos en ambientes naturales.

6. Bibliografía

Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. (EPA). 2015. *Preliminary Ecological Risk Assessment in Support of the Registration Review of Glyphosate and Its Salts*; U.S. EPA: Washington, DC, USA. 318

Akbulut C. 2021. Acute exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid of zebrafish (*Danio rerio*) Gonads: A histopathological approach. In *Annales de Ann. Limnol. Int. J. Lim. 57, 23.* EDP Sciences. https://doi.org/10.1051/limn/2021021

Alaoui A, Christ F, Silva V, Vested A, Schlünssen V, González N, Geissen V. 2024. Identifying pesticides of high concern for ecosystem, plant, animal, and human health: A comprehensive field study across Europe and Argentina. *Sci. Total Environ.* 948:174671. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.174671

Alarcón R, Ingaramo PI, Rivera OE, Dioguardi GH, Repetti, MR, Demonte, LD, Milesi MM, Varayoud J, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. 2019. Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters the histofunctional differentiation of the ovaries and uterus in lambs. *Mol. Cell. Endocrinol.* 482:45–56. https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.12.007

Alba MM, Ebright B, Hua B, Slarve I, Zhou Y, Jia Y, Louie SG, Stiles BL. 2023. Eicosanoids and other oxylipins in liver injury, inflammation and liver cancer development. *Front. Physiol.* 14:1098467. *https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1098467*

Al-Dwairi A, Brown AR, Pabona JMP, Van TH, Hamdan H, Mercado CP, Simmen FA. 2014. Enhanced gastrointestinal expression of cytosolic malic enzyme (ME1) induces intestinal and liver lipogenic gene expression and intestinal cell proliferation in mice. *PloS one*. 9(11), e113058. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113058

Altamirano GA, Delconte MB, Gomez AL, Alarcón R, Bosquiazzo VL, Luque EH, Muñoz-de-Toro M, Kass L. 2017. Early postnatal exposure to endosulfan interferes with the normal development of the male rat mammary gland. *Toxicol Lett.* 281:102–109. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.09.012

Anguiano OL, and Ferrari A. 2019. Riesgo ecotoxicológico de plaguicidas utilizados en Argentina. *Universidad Nacional del Comahue. Buenos Aires, Argentina*, 63. Disponible en: https://probien.conicet.gov.ar/wp-content/uploads/sites/56/2019/11/RIESGO-

ECOTOXICOL%C3%93GICO-DE-PLAGUICIDAS...-ANGUIANO-Y-FERRARI-1_compressed.pdf

Anwar K, and Shakoori AR. 2010. Cypermethrin toxicity in the liver of developing chick embryo. *Pak J Zool*, 42(6). ISSN: 0030-9923

Aparicio VC, De Gerónimo E, Marino D, Primost J, Carriquiriborde P, Costa JL. 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere*, *93*(9), 1866-1873. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.041

Aparicio VC, De Gerónimo E. 2024. Absorption and Accumulation of Glyphosate and AMPA Residues from Soil to Agricultural Crops. Disponible en: SSRN: https://ssrn.com/abstract=4934210 or http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4934210

Aparicio VC, Rizzalli R, Panaggio H, Andrade F, Costa JL. 2025a. Ecological Intensification Reduces Pesticide Residues in Soils and Water: A Cleaner Production Strategy for Argentine Agriculture. Disponible en: *SSRN 5224991*. https://ssrn.com/abstract=5224991 or http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.5224991

Aparicio VC, and De Gerónimo, E. 2025b.Pesticide Pollution in Drinking Water in the Argentine Pampas: A Call for Action to Ensure Safe and Affordable Access to Water. *Environ. Challenges*. 14:100808 https://doi.org/10.1016/j.envc.2023.100808

Araujo JF, Valgas AAN, de Oliveira DR, Verrastro L, Oliveira GT. 2024. Pesticides compromise health: a comparison between lizards collected within and outside an agricultural area. *Environ. Monit. Assess. 196*(4), 334. https://doi.org/10.1007/s10661-024-12498-1

Arcaute CR, Soloneski S, Larramendy ML. 2016. Toxic and genotoxic effects of the 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 128:222-229. http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.02

Arfat Y, Mahmood N, Tahir MU, Rashid M, Anjum S, Zhao F, Qian AR. 2014. Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice. *Toxicol. Rep.* 1:554-561. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.08.004

Arregui MC, Puricell EC. 2013. Mecanismos de acción de plaguicidas. Rosario, Ed UNR. ISSN 978-987-702-017-5.

Arrojeria AO, Zaldibar AB. 2016. Efecto del glifosato en la morfologia del tubo dogestivo y en la actividad acetilcolinesterasa de la lombriz *Eisenia fetida*. http://hdl.handle.net/10810/17999

Astarita G, Bryan CR, Johnnie BA, Jin F, Janet HK, Albert FB, James WH, Daniele P. 2006. Postprandial increase of oleoylethanolamide mobilization in small intestine of the Burmese python (*Python molurus*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290:1407–1412 https://doi.org/10.1152/ajpregu.00664.2005

Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo. Universidad Nacional de San Martín (ACUMAR-UNSAM). 2022. Guía sobre tratamiento de aguas para la adecuación ambiental. Pp 81.

Ayarragaray M, Regaldo L, Reno U, Gutiérrez MF, Marino D, Gagneten AM. 2014. Monitoreo de glifosato y ácido aminometilfosfónico (AMPA) en ambientes acuáticos cercanos a la ciudad de San Justo (Provincia de Santa Fe, Argentina).V Congreso SETAC Argentina. Neuquén, 22-25/10/14. Disponible en: https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=glifosato&id=38564&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=2420343

Azeez OI, Myburgh JG, Bosman AM. Featherston J, Sibeko-Matjilla KP, Oosthuizen MC, Chamunorwa JP. 2019. Next generation sequencing and RNA-seq characterization of adipose tissue in the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) in South Africa: Possible mechanism (s) of pathogenesis and pathophysiology of pansteatitis. *Plos one*, 14(11), e0225073. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225073

Azeez OI, Myburgh JG, Meintjes RA, Oosthuizen MC, Chamunorwa JP. 2017. Histomorphology, ultrastructure and fatty acid composition of the adipose tissue in pansteatitis, the potentials in understanding the underlying mechanism and diagnosis of pansteatitis in the Nile crocodile. *Lipids Health Dis.* 16(1), 47. https://doi.org/10.1186/s12944-016-0405-2

Bain M, Pain-Devin S, Sohm B, De Vernisy C, Devin S. 2025. Tissue concentration, mortality, and response of subcellular biomarkers in *Dreissena polymorpha* exposed to nickel: absence of dose-response relationships for biomarkers despite dose-dependent toxicity. *Aquat. Toxicol.* 107517. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2025.107517

Banaee M, Gholamhosseini A, Sureda A, Soltanian S, Fereidouni MS, Ibrahim AA. 2021. Effects of microplastic exposure on the blood biochemical parameters in the pond turtle

(*Emys orbicularis*). *Environ. Sci. Pollut. Res*. 28(8), 9221-9234 https://doi.org/10.1007/s11356-020-11419-2

Bantu N, Vakita VR, Karra S. 2013. Effect of chlorantraniliprole on biochemical and certain biomarkers in various tissues of freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton). *Environ. Ecol. Res.* 1(4), 205-215. https://doi.org/10.13189/eer.2013.010403

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.

Barboza T, Beaufrère H, Reavill D, Susta L. 2023. Morphological features of hepatic lipid changes in bearded dragons (*Pogona vitticeps*), and a proposed grading system. *Vet. Pathol.* 60(1), 123-132. https://doi.org/10.1177/03009858221128921

Barišić J, Marijić VF, Mijošek T, Čož-Rakovac R, Dragun Z, Krasnići, N, Erk, M. 2018. Evaluation of architectural and histopathological biomarkers in the intestine of brown trout (Salmo trutta Linnaeus, 1758) challenged with environmental pollution. *Sci. total Environ.* 642:656-664. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.045

Barraza AD, Finlayson KA, Leusch FD, and van de Merwe JP. 2021. Systematic review of reptile reproductive toxicology to inform future research directions on endangered or threatened species, such as sea turtles. *Environ. Pollut*., 286:117470. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117470

Beale DJ, Hillyer K, Nilsson S, Limpus D, Bose U, Broadbent JA, Vardy S. 2022a. Bioaccumulation and metabolic response of PFAS mixtures in wild-caught freshwater turtles (*Emydura macquarii macquarii*) using omics-based ecosurveillance techniques. *Sci. Total Environ*. 806:151264. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151264

Beale DJ, Nilsson S, Bose U, Bourne N, Stockwell S, Broadbent JA, Gonzalez-Astudillo V, Braun C, Baddiley B, Limpus D, Walsh T, Vardy S. 2022b. Bioaccumulation and impact of maternal PFAS offloading on egg biochemistry from wild-caught freshwater turtles (*Emydura macquarii macquarii*). *Sci. Total Environ*. 817:153019. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153019

Belhaj MR, Lawler NG, Hoffman NJ. 2021. Metabolomics and lipidomics: expanding the molecular landscape of exercise biology. *Metabolites*, 11(3), 151. https://doi.org/10.3390/metabo11030151

Bernasconi C, Demetrio PM, Alonso LL, Mac Loughlin TM, Cerdá E, Sarandón SJ, Marino DJ. 2021. Evidence for soil pesticide contamination of an agroecological farm from a neighboring chemical-based production system. *Agr. Ecosyst. Environ. 313*:107341. https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107341

Bernhard MC. 2014. The effects of *in ovo* tributyltin exposure on PPARγ-RXRα signaling and development in the American alligator (Tesis de maestría). The Graduate School of the University of Charleston, College of Charleston.

Bertile F, Raclot T. 2004. mRNA levels of SREBP-1c do not coincide with the changes in adipose lipogenic gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 325(3), 827-834. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.110

Blackburn DG, Barnes MS, Reimers CD, Appiah FA, Lestz LL, Bonneau L J, Hanson M, Smith-Paredes D, Bhullar BA. 2021. How do Crocodylian embryos process yolk? Morphological evidence from the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *J. Morphol.* 282(7), 953-958. https://doi.org/10.1002/jmor.21252

Bolsa de Comercio de Rosario (BCR). 2025. *Estimaciones nacionales de producción* [Página web]. Disponible en: https://www.bcr.com.ar/es/mercados/gea/estimaciones-nacionales-de-produccion/estimaciones

Borges RM, Pressinotti LN, Marcus FA, Iunes RS, Aleixo VM, Portela TCL, da Silva JRMC. 2018. Histological organization of intestinal villi in the crocodilian *Caiman yacare* (Daudin, 1802) during dietary lipid absorption. *Zoomorphol.* 137(3), 419-432. https://doi.org/10.1007/s00435-018-0401-3

Bougarne N, Mylka V, Ratman D. Beck IM, Thommis J, De Cauwer L, Tavernier J, Staels B, Libert C, De Bosscher K. 2019. Mechanisms underlying the functional cooperation between PPARα and GRα to attenuate inflammatory responses. *Front. immunol.* 10, 1769. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01769

Bouwens M, Afman LA, Müller M. 2008. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in human peripheral blood mononuclear cells reveals an individual gene expression profile response. *BMC genomics*. 9:1-9. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-262

Braeuning A, Balaguer P, Bourguet W, Carreras-Puigvert J, Feiertag K, Kamstra JH, Knapen D, Lichtenstein D, Marx-Stoelting P, Rietdijk J, Schubert K, Spjuth O, Stinckens

E, Thedieck K, van den Boom R, Bergauwen L, von Bergen M, Wewer N and Zalko D 2023. Development of new approach methods for the identification and characterization of endocrine metabolic disruptors—a PARC project. *Front. toxicol*. 5. https://doi.org/10.3389/ftox.2023.1212509

Breuner, C.W., Delehanty, B., Boonstra, R. 2013. Evaluating stress in natural populations of vertebrates: total CORT is not good enough. *Funct. Ecol.* 27(1), 24-36. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12016

Brovini EM, Cardoso SJ, Quadra GR, Vilas-Boas J, Paranaiba JR, Pereira RDO, Mendonca RF. 2021. Glyphosate concentrations in global freshwaters: are aquatic organisms at risk?. *Environ. Sci. Pol. Res.* 28(43), 60635-60648. https://doi.org/10.1007/s11356-021-14609-8

Buah-Kwofie A, Humphries MS, Combrink X, Myburgh JG. 2018. Accumulation of organochlorine pesticides in fat tissue of wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) from iSimangaliso Wetland Park, South Africa. *Chemosphere*, 195:463-471. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.084

Burella PM, Odetti LM, Simoniello MF, Poletta GL. 2018. Oxidative damage and antioxidant defense in *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) exposed *in ovo* to pesticide formulations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 161:437-443. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.006

Cain W, Song L, Stephens G, Usher D. 2003. Characterization of lipoproteins from the turtle, *Trachemys scripta elegans*, in fasted and fed states. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 134(4), 783-794. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00012-6

Calder PC. 2020. Eicosanoids. *Essays in Biochemistry*, *64*(3), 423-441.

Campbell HA, Micheli MA, Abe A. 2008. A seasonally dependent change in the distribution and physiological condition of *Caiman crocodilus* yacare in the Paraguay River Basin. *Wildlife Res.* 35(2), 150-157.

Canesini G, Stoker C, Galoppo GH., Durando ML, Tschopp MV, Luque EH, Ramos JG. 2018. Temperature-vs. estrogen-induced sex determination in *Caiman latirostris* embryos: Both females, but with different expression patterns of key molecules involved

in ovarian development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 259:176-188. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.11.024

Canesini G, Galoppo GH, Tavalieri YE, Lazzarino GP, Stoker C, Luque H, Ramos J.G., Muñoz-de-Toro M. 2023. Disruption of the developmental programming of the gonad of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) after in ovo exposure to atrazine. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 30(14), 40132–40146. https://doi.org/10.1007/s11356-022-25104-z

Cantu TM, Bowden JA, Scott J, Pérez-Viscasillas JB, Huncik K, Guillette MP, Guillette JrLJ. 2016. Alterations in eicosanoid composition during embryonic development in the chorioallantoic membrane of the American alligator (*Alligator mississippiensis*) and domestic chicken (*Gallus gallus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 238, 78-87. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00012-6

Capitão AMF. 2017. *Screening obesogens in aquatic model organisms* (Doctoral dissertation, Universidade do Porto (Portugal).

Cardenas A, Roels H, Bernard AM, Barbon R, Buchet JP, Lauwerys RR, Franchini I. 1993. Markers of early renal changes induced by industrial pollutants. II. Application to workers exposed to lead. *JOEM*, 50(1), 28-36. https://doi.org/10.1136/oem.50.1.28

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. (Ed) Jorge L. Frangi. *SeDiCI* (Servicio de Difusión de la Creación Intelectual), UNLP La Plata, Argentina. ISSN 2314-1743, Monografía Nº 1: 135 p.

Chacón CF, González López EC, Poletta GL. 2021. Biomarkers of geno-and cytotoxicity in the native broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*): Chromosomal aberrations and mitotic index. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 867, 503353. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2021.503353

Chacón CF, Parachú Marcó MV, Poletta GL, Siroski PA. 2024. Lipid metabolism in crocodilians: a field with promising applications in the field of ecotoxicology. *Environ. Res.* 119017. https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119017

Chacón CF, Parachú Marcó MV, Siroski PA, Poletta GL. 2025. Identification and tissue-specific expression of genes involved in lipid metabolism in broad-snouted caiman. *JOZ*. https://doi.org/10.1111/jzo.70071

Chai L, Chen A, Luo P, Zhao H, Wang H. 2017. Histopathological changes and lipid metabolism in the liver of *Bufo gargarizans* tadpoles exposed to Triclosan. *Chemosphere*, 182, 255-266. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.040

Chakrabarti SK, Cole BK, Wen Y, Keller SR, Nadler JL. 2009. 12/15-lipoxygenase products induce inflammation and impair insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Obes*. 17 (9), 1657–1663. https://doi.org/10.1038/oby.2009.192

Chamorro-García R, Sahu M, Abbey RJ, Laude J, Pham N, Blumberg B. 2013. Transgenerational inheritance of increased fat depot size, stem cell reprogramming, and hepatic steatosis elicited by prenatal exposure to the obesogen tributyltin in mice. *EHP*, 121(3), 359-366. https://doi.org/10.1289/ehp.120570

Chang J, Li J, Hao W, Wang H, Li W, Guo B, Xu P. 2018. The body burden and thyroid disruption in lizards (*Eremias argus*) living in benzoylurea pesticides-contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 347:218-226. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.01.005

Chen G, Wang G, Xu W, Xiao Y, Peng Y. 2022. Transcriptome analysis of fat accumulation in 3T3-L1 adipocytes induced by chlorantraniliprole. *Front. Nutr.* 9:1091477. https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1091477

Chen GH, Luo Z, Hogstrand C, Wu K, Ling SC. 2018. SREBP1, PPARG and AMPK pathways mediated the Cu-induced change in intestinal lipogenesis and lipid transport of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Food Chem.* 269, 595-602. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.048

Chen GH, Zhang KY, Tian G, Bai SP, Ding XM, Wang JP, Lv L, Xuan, Y, Zeng QF. 2023. Effects of a high-fat diet on the growth performance, lipid metabolism, and the fatty acids composition of liver and skin fat in Pekin ducks aged from 10 to 40 days. *Poult. Sci.* 102(3), 102429. https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102429

Chen L, Diao J, Zhang W, Zhang L, Wang Z, Li Y, Deng Y, Zhou Z. 2019. Effects of beta-cypermethrin and myclobutanil on some enzymes and changes of biomarkers between internal tissues and saliva in reptiles (*Eremias argus*). *Chemosphere*, 216, 69-74. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.099

Chen QL, Luo Z, Zheng JL, Li XD, Liu CX, Zhao YH, Gong, Y. 2012. Protective effects of calcium on copper toxicity in *Pelteobagrus fulvidraco*: copper accumulation, enzymatic activities, histology. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76, 126-134. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.10.007

Chen QL, Luo, Z, Pan YX, Zheng JL, Zhu QL, Sun LD, Zhuo M, Q Hu W. 2013. Differential induction of enzymes and genes involved in lipid metabolism in liver and visceral adipose tissue of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to copper. *Aquat. Toxicol.* 136:72-78. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.04.003

Chen W, Chen G, Head DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW. 2007. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab.* 5(1), 73-79. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.11.012

Chen Z, Yang T, Walker DI, Thomas DC, Qiu C, Chatzi L, Gilliland FD. 2020. Dysregulated lipid and fatty acid metabolism link perfluoroalkyl substances exposure and impaired glucose metabolism in young adults. *Environ. Int.* 145, 106091. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106091

Clyde-Brockway CE, Ferreira CR, Flaherty EA, Paladino FV. 2021. Lipid profiling suggests species specificity and minimal seasonal variation in Pacific Green and Hawksbill Turtle plasma. *Plos one*, 16(7), e0253916. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253916

Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas. 2015. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura / Organización Mundial de Salud (FAO/OMS), Roma. ISBN 978-92-5-308548-4 (edición impresa)/ E-ISBN 978-92-5-308549, 37 p.

Coimbra AM, Peixoto MJ, Coelho I, Lacerda R, Carvalho AP, Gesto M, Santos M. 2015. Chronic effects of clofibric acid in zebrafish (*Danio rerio*): a multigenerational study. *Aquat. Toxicol.* 160:76-86. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.013

Comisión Europea. 2022. Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council Amending Directive 2000/60/EC Establishing a Framework for Community Action in the field of Water Policy, Directive 2006/118/EC on the Protection of Groundwater Against Pollution and Deterioration and Directive 2008/105/EC on Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy, pp. 1–81. Disponible en:

https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:d0c11ba6-55f8-11ed-92ed-01aa75ed71a1.0001.02/DOC_2&format=PDF.

Cooke PS, Spencer TE, Bartol FF, Hayashi K. 2013. Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Mol. Hum. Reprod.* 19:547–558. https://doi.org/10.1093/molehr/gat031

Corcoran S, Menone ML, Amé MV, Lukaszewicz G, Garanzini D, Iturburu FG, Metcalfe C. 2017. Detection of current- use pesticides in Argentinian surface waters using polar organic chemical integrative samplers (POCIS), SETAC Latin America 12th Biennial Meeting, Santos- Brasil.

Corcoran S, Metcalfe CD, Sultana T, Amé MV, Menone ML. 2020. Pesticides in Surface Waters in Argentina Monitored Using Polar Organic Chemical Integrative Samplers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 104:21–26. https://doi.org/10.1007/s00128-019-02758-z

Crain DA, Guillette JrLJ. 1998. Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. *Anim. Reprod. Sci.* 53(1-4), 77-86. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(98)00128-6

de Montgolfier B, Dufresne J, Letourneau M, Nagler JJ, Fournier A, Audet C, Cyr DG. 2007. The expression of multiple connexins throughout spermatogenesis in the rainbow trout testis suggests a role for complex intercellular communication. *Biol. Reprod.* 76(1), 2-8. https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054288

de Vogel-van den Bosch HM, Bünger M, de Groot PJ, Bosch-Vermeulen H, Hooiveld GJ. Müller M. 2008. PPARalpha-mediated effects of dietary lipids on intestinal barrier gene expression. *BMC genomics*. 9:1-13. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-231

Demonte LD. 2020. Estudio de métodos alternativos para la determinación de glifosato y otros plaguicidas de solución analítica compleja en matrices ambientales y alimentarias de interés prioritario regional (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Córdoba. Disponible en: https://hdl.handle.net/11185/5652

Desvergne B, Michalik L, Wahli W. 2006. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev*. 86(2), 465-514. https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2005

Dierenfeld ES, Norkus EB, Carroll K, Ferguson GW. 2002. Carotenoids, vitamin A, and vitamin E concentrations during egg development in panther chameleons (*Furcifer*

pardalis). *Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association*, *21*(3), 295-303. https://doi.org/10.1002/zoo.10039

Dohen, BM. 2016. Estrogen Signaling and Endocrine Disruption Potential in the Embryonic Development of the Female Reproductive Tract of the American Alligator, *Alligator mississippiensis*. Tesis Doctoral. Medical *University of South Carolina*.

Donayo P, Piña C, Larriera A. 2002. Período de incubación, banda de calcificación, peso de los huevos y desarrollo embrionario de Caiman latirostris a tres temperaturas diferentes. La conservación y el manejo de Caimanes y Cocodrilos de América Latina, 2:6-109.

Duggan AE, Paolucci M, Tercyak A, Gigliotti M, Small D, Callard I. 2001. Seasonal variation in plasma lipids, lipoproteins, apolipoprotein AI and vitellogenin in the freshwater turtle, *Chrysemys picta*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol*. 130(2), 253-269. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00364-6

Duggan AE, Callard IP. 2003. Lipids and lipid-transporting proteins in *Chrysemys picta*: role of gonadal steroids and growth hormone in intact and hypophysectomized turtles. *Gen. Comp. Endocrinol*. 131(2), 176-184. https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00009-1

Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. 2010. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol. Reprod*. 83(6), 909-918. https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084145

Dunning KR, Russell DL, Robker RL. 2014. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β-oxidation. *Reproduction*, 148(1), R15-R27. https://doi.org/10.1530/REP-13-0251

Durando M, Cocito L, Rodríguez HA, Varayoud J, Ramos JG, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. 2013. Neonatal expression of amh, sox9 and sf-1 mRNA in *Caiman latirostris* and effects of *in ovo* exposure to endocrine disrupting chemicals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 191:31-38. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.05.013

Dzul-Caamal R, Hernández-López A, Gonzalez-Jáuregui M, Padilla SE, Girón-Pérez MI, Vega-López A. 2016. Usefulness of oxidative stress biomarkers evaluated in the snout scraping, serum and peripheral blood cells of *Crocodylus moreletii* from Southeast

Campeche for assessment of the toxic impact of PAHs, metals and total phenols. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 200:35-46. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.05.006

Enyedi B, Kala S, Nikolich-Zugich T, Niethammer P. 2013. Tissue damage detection by osmotic surveillance. *Nat. Cell Biol.* 15 (9), 1123–1130. https://doi.org/10.1038/ncb2818

Estimaciones agrícolas. Informe mensual. 2025. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Ministerio de Economía. República Argentina.

European Food Safety Authority (EFSA). 2013 Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance [chlorantraniliprole]. EFSA Journal 2013;11(6):3143. [107 pp.] https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3143. Disponible en: www.efsa.europa.eu/efsajournal

European Food Safety Authority (EFSA). 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid considering all uses other than seed treatments and granules. EFSA Journal 2015;13(8):4211, [82 pp.]. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4211 Disponible en: www.efsa.europa.eu/efsajournal

Eversole CB, Henke SE, Powell RL, Janik LW. 2013. Effect of drought on clutch size and hatchling production of american alligators (*Alligator mississippiensis*) in texas. *Herpetol. Conserv. Biol.* 8(3), 756-763.

Faghani M. 2018. Effect of glyphosate on honey bee (*Apis mellifera*) performance. *Arthropods*, *7*(3), 77. ISSN 22244255

Fang J, Wang H, Xue Z, Cheng Y, Zhang X. 2021. *PPARγ:* The Central Mucus Barrier Coordinator in Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis*. 27(5), 732–741.https://doi.org/10.1093/ibd/izaa273

FAO y OMS. 2022. *Guidance on good labelling practice for pesticides* (Second revision) – International Code of Conduct on Pesticide Management. Rome. Disponible en: https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/63cc86f5-c519-4021-ace3-5aa42adb7e49/content

FAO. 2006. Expert Committee on Food Additives. Meeting Staff. Compendium of food additive specifications, 67(3). *Food & Agriculture Organization of the United Nations.* Disponible en: https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/a0675e

FAO. 2017. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Global assessment of the impact of plant protection products on soil functions and soil ecosystems. Rome, Italy. ISBN, 978-92-5-130031-2. Disponible en: https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/i8168en

FAO. 2025 (15 de julio). *Pesticides use and trade, 1990–2023*. Disponible en: https://www.fao.org/statistics/highlights-archive/highlights-detail/pesticides-use-and-trade-1990-2023/

FAOSTAT. 2021. *Pesticides use: Definitions and classifications of pesticides*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en: https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/faoweb/statistics/questionnaires/FAO_Definitions_and_classifications_of_pesticides__2021_.xlsx

Fasola E, Biaggini M, Ortiz-Santaliestra ME, Costa S, Santos B, Lopes I, Corti C. 2022. Assessing stress response in lizards from agroecosystems with different management practices. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 108(2), 196-203. https://doi.org/10.1007/s00128-021-03404-3

Fathi MA, Abdelghani E, Shen D, Ren X, Dai P, Li Z, Tang Q, Li Y Li C. 2019. Effect of in ovo glyphosate injection on embryonic development, serum biochemistry, antioxidant status and histopathological changes in newly hatched chicks. J. *Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 103(6), 1776-1784. https://doi.org/10.1111/jpn.13181

Ferrando S, Maisano M, Parrino V, Ferrando T, Girosi L, Tagliafierro, G. 2006. Gut morphology and metallothionein immunoreactivity in Liza aurata from different heavy metal polluted environments. *Italian JOZ,* 73(1), 7–14. https://doi.org/10.1080/11250000500502228

Ferraro DO, Ghersa F, de Paula R, Duarte Vera AC, Pessah S, 2020. Historical trends of the ecotoxicological pesticide risk from the main grain crops in rolling Pampa (Argentina). *PLoS One*. 15 (11), e0238676. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238676.

Ferré J, Van Rie J, MacIntosh SC. 2008. Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM). In *Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs* (pp. 41-85). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8373-0

Ferre P, and Foufelle F. 2007. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm. Res. Paediatr*. 68(2), 72-82.

Ferreira MF, Torres C, Bracamonte E. Galetto L. 2017. Effects of the herbicide glyphosate on non-target plant native species from *Chaco forest* (Argentina). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 144, 360-368.

Fielding CJ, and Fielding PE. 2008. Dynamics of lipoprotein transport in the circulatory system. In Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. *Elsevier*. 533-553.

Filosa S, Fico A, Paglialunga F, Balestrieri M, Crooke A, Verde P, Abrescia P, Bautista JM, Martini G. 2003. Failure to increase glucose consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress. *Biochem. J.* 370:935–943 https://doi.org/10.1042/bj20021614

FMC Corporation. 2023. *Coragen*® eVo insect control product label and safety data sheet (mpJ20003.pdf). FMC Agricultural Solutions. Disponible en: https://ag.fmc.com/us/sites/default/files/2023-11/mpJ20003.pdf

Fonseca Peña SVD, Brodeur JC. 2023. Toxicity and effects on anuran tadpole metamorphosis of the anthranilic diamide insecticides chlorantraniliprole and cyantraniliprole. *J. Toxicol. Environ. Health Part A*. 86(15), 518-533. https://doi.org/10.1080/15287394.2023.2224366

Frye FL, and Schelling SH. 1973. Steatitis in a caiman. *VM, SAC*, 68(2), 143–145.

Fuentes E, Moreau J, Millet M, Bretagnolle V, Monceau K. 2025. Pesticide mixture effects on physiological stress and morphology of growing wild nestlings. *J Hazard. Mater.* 139346. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.139346

Funke T, Han H, Healy-Fried ML, Fischer M, Schönbrunn E. 2006. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(35), 13010-13015. https://doi.org/10.1073/pnas.0603638103

Gaber HS, Abbas WT, Authman MMN, Gaber SA. 2014. Histological and biochemical studies on some organs of two fish species in Bardawil Lagoon, North Sinai, Egypt. *Glob. Vet.* 12(1), 1–11. https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.12.01.76199

Galoppo GH, Canesini G, Tavalieri YE, Stoker C, Kass L, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. 2017. Bisphenol A disrupts the temporal pattern of histofunctional changes in the

female reproductive tract of *Caiman latirostris*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 254:75-85. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.09.021

Galoppo GH, Tavalieri YE, Schierano-Marotti G, Osti MR, Luque EH, Muñoz-de-Toro MM. 2020. Long-term effects of *in ovo* exposure to an environmentally relevant dose of atrazine on the thyroid gland of *Caiman latirostris*. *Environ. Res*. 186:109410. https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109410

Gama GM, Passos LF, Paglia AP, Coutinho ME. 2025. Body Condition and Blood Biochemistry of Free-Range *Caiman latirostris* in Northeast Brazilian Atlantic Forest. *J. Exp. Zool. A. 343*(3), 383-399. https://doi.org/10.1002/jez.2897

Gawin R. 2024. *The Effect of Environmental Pollutants on the Spotted Turtle Gut Microbiota* (Tesis de Master, *Loyola University Chicago*).

Geng D, Musse AA, Wigh V, Carlsson C, Engwall M, Orešič M, Scherbak N Hyötyläinen T. 2019. Effect of perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) on the liver lipid metabolism of the developing chicken embryo. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170:691-698. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.040

Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK. 2013. Principles for valid histopathologic scoring in research. *Vet. Pathology. 50*(6), 1007-1015. https://doi.org/10.1177/0300985813485099

Gore, AC. 2008. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol*. 29(3), 358–374. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.02.002

Griffith OW, Brandley MC, Belov K, Thompson MB. 2016. Reptile pregnancy is underpinned by complex changes in uterine gene expression: a comparative analysis of the uterine transcriptome in viviparous and oviparous lizards. *Genome Biol. Evol*. 8(10), 3226-3239. https://doi.org/10.1093/gbe/evw229

Griffith OW, Ujvari B, Belov K, Thompson MB. 2013. Placental lipoprotein lipase (LPL) gene expression in a placentotrophic lizard, *Pseudemoia entrecasteauxii*. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 320(7), 465-470. https://doi.org/10.1002/jez.b.22526

Grün F, and Blumberg B. 2007. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. *Rev. Endocr. Metab*. 8:161-171. https://doi.org/10.1007/s11154-007-9049-x

Guillette Jr LJ, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR. 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Perspect. 102*(8), 680-688. https://doi.org/10.1289/ehp.94102680

Guillette Jr LJ, Woodward AR, Crain DA, Masson GR, Palmer BD, Cox MC, You-Xiang Q, Orlando EF. 1997. The reproductive cycle of the female American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Gen. Comp. Endocrinol*. 108(1), 87-101. https://doi.org/10.1006/gcen.1997.6953

Guillette Jr LJ, Woodward AR, Crain DA, Pickford DB, Rooney AA, Percival HF. 1999. Plasma steroid concentrations and male phallus size in juvenile alligators from seven Florida lakes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 116(3), 356-372. https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7375

Gunderson MP, LeBlanc GA, Guillette JrLJ. 2001. Alterations in sexually dimorphic biotransformation of testosterone in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated lakes. *Environ. Health Perspect.* 109(12), 1257-1264. ISSN: 0091-6765

Gupta A, Sharma B. 2023. A study on transaminases in lindane exposed fish *C. punctatus.* Journal ISSN, 2766, 2276.

Hagenaars A, Vergauwen L, Benoot D, Laukens K, Knapen D. 2013. Mechanistic toxicity study of perfluorooctanoic acid in zebrafish suggests mitochondrial dysfunction to play a key role in PFOA toxicity. *Chemosphere*, 91(6), 844-856. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.056

Hale MD, Koal T, Pham TH, Bowden JA, Parrott BB. 2022. Transcriptional networks underlying a primary ovarian insufficiency disorder in alligators naturally exposed to EDCs. *Mol. Cell. Endocrinol*. 557:111751. https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111751

Hamann M, Limpus C, Whittier J. 2002. Patterns of lipid storage and mobilisation in the female green sea turtle (*Chelonia mydas*). *J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol*. 172(6), 485-493. https://doi.org/10.1007/s00360-002-0271-2

Hanna and Hafez, EAA, 2018. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *J. Adv. Res.*11,23-32. https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.005

Hansen M, Flatt T, Aguilaniu H. 2013. Reproduction, fat metabolism, and life span: what is the connection? *Cell Metab*. 17(1), 10-19. http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.003

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

Heindel JJ, Blumberg B, Cave M, Machtinger R, Mantovani A, Mendez MA, Nadal A, Palanza P, Paznica G, Sargis R, Vandenberg, L.N, Vom Saal F. 2017. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reprod. Toxicol*. 68:3-33. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.10.001

Hemalatha D, Rangasamy B, Nataraj B, Ramesh M. 2019. Assessment of triclosan impact on enzymatic biomarkers in an Indian major carp, *Catla catla*. *The J. Bas. App Zoo.* 80:1-8. https://doi.org/10.1186/s41936-019-0094-2

Hermann M, Mahon MG, Lindstedt KA, Nimpf J, Schneider, W. J. 2000. Lipoprotein receptors in extraembryonic tissues of the chicken. *J. Biol. Chem.* 275(22), 16837-16844. https://doi.org/10.1074/jbc.M000163200

Heusinkveld H, Zwart EP, de Haan A, Braeuning A, Alarcan J, van der Ven LT. 2024. The zebrafish embryo as a model for chemically-induced steatosis: A case study with three pesticides. *Toxicol.* 508:153927. https://doi.org/10.1016/j.tox.2024.153927

Hong M, Li N, Li J, Li W, Liang L, Li Q, Wang R, Shi H, Storey KB, Ding L. 2019. Adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling regulates lipid metabolism in response to salinity stress in the red-eared slider turtle *Trachemys scripta elegans*. *Front. physiol*. 10:962. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00962

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest*. 109(9), 1125-1131. https://doi.org/10.1172/JCI15593

Huang C, Chen QL, Luo Z, Shi X, Pan YX, Song YF, Khuo M-Q, Wu, K. 2013. Time-dependent effects of waterborne copper exposure influencing hepatic lipid deposition and metabolism in javelin goby *Synechogobius hasta* and their mechanism. *Aquat. Toxicol.* 155:291-300. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.013

Huang JC, Wun WS, Goldsby JS, Wun IC, Falconi SM, Wu KK. 2003. Prostacyclin enhances embryo hatching but not sperm motility. *Hum. Rep. 18*(12), 2582-2589. https://doi.org/10.1093/humrep/deg490

Huang T, Jiang H, Zhao Y, He J, Cheng H, Martyniuk CJ. 2022. A comprehensive review of 1, 2, 4-triazole fungicide toxicity in zebrafish (*Danio rerio*): A mitochondrial and metabolic perspective. *Sci. Total Environ.* 809:151177. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151177

Huang W, Xie P, Cai Z. 2020. Lipid metabolism disorders contribute to hepatotoxicity of triclosan in mice. *J. Hazard. Mater.* 384:121310. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121310

Huang YR, Tsai YH, Liu CL, Syue WZ, Su YC. 2017. Chemical Characteristics of Different Tissues of Spectacled Caiman (*Caiman crocodilus*). *J. Aquat. Food Prod. Technol*. 27(2), 132-143. https://doi.org/10.1080/10498850.2017.1407854

Huchzermeyer FW. 2003. Crocodiles: biology, husbandry and diseases. CABI. Publishing, Cambridge, Massachusetts, USA. ISBN 0 85199 656 6

Hughes S, Zelus D, Mouchiroud D. 1999. Warm-blooded isochore structure in Nile crocodile and turtle. *Mol. Biol. Evol*. 16(11), 1521-1527. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026064

Humphries MS, Myburgh JG, Campbell R, Buah-Kwofie A, Combrink X. 2021. Organochlorine pesticide bioaccumulation in wild Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) fat tissues: environmental influences on changing residue levels and contaminant profiles. *Sci. Total Environ.* 753:142068. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142068

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 2015. Archivo, Plaguicidas agregados al suelo. Ediciones INTA. Libro de edición Argentina. ISBN 978-987-521-665-567. Disponible en: https://www.manualfitosanitario.com/InfoNews/INTA%20Aplicacion%20eficiente%20de%20fitosanitarios%20Cap%202.%20%20Formulaciones.pdf

International Agency for Research on Cancer (IARC). 2015. Some Organophosphate Insecticides and Herbicides. Disponible en: https://www.iarc.who.int/

Islam MA, Hossen MS, Sumon KA. 2019. Acute Toxicity of Imidacloprid on the Developmental Stages of Common Carp *Cyprinus carpio*. *Toxicol. Environ. Health Sci*. 11, 244–251 (2019). https://doi.org/10.1007/s13530-019-0410-8

Iturburu FG, Zömisch M, Panzeri AM, Crupkin AC, Contardo-Jara V, Pflugmacher S, Menone ML. 2017. Uptake, distribution in different tissues, and genotoxicity of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. *Environ. toxicol. Chem,* 36(3), 699-708 https://doi.org/10.1002/etc.3574

Iungman JL. 2011. Influencia de la concentración de oxígeno sobre el desarrollo y diferenciación sexual de embriones de *Caiman latirostris* (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Rosario, Argentina.

Iungman JL, Somoza GM, Piña CI. 2015. Are stress-related hormones involved in the temperature-dependent sex determination of the broad-snouted caiman?. *S. A. J. Herpetol.*, *10*(1), 41-49. https://doi.org/10.2994/SAJH-D-14-00027.1

Jacobsen AV, Nordén M, Engwall M, Scherbak N. 2018. Effects of perfluorooctane sulfonate on genes controlling hepatic fatty acid metabolism in livers of chicken embryos. *Environ. Sci. Pol. Res.* 25:23074-23081. https://doi.org/10.1007/s11356-018-2358-7

Jakobsson T, Treuter E, Gustafsson JÅ, Steffensen KR. 2012. Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends Pharmacol. Sci*. 33(7), 394-404. https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.03.013

Javed M and Usmani N. 2015. Stress response of biomolecules (carbohydrate, protein and lipid profiles) in fish *Channa punctatus* inhabiting river polluted by Thermal Power Plant effluent. *S. J. Biol. Sci.* 22(2), 237-242. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.09.021

Jimeno B, Hau M, Verhulst S. 2018. Corticosterone levels reflect variation in metabolic rate, independent of 'stress'. *Sci. Rep.* 8(1), 13020. https://doi.org/10.1038/s41598-018-31258-z

Johnson JM, Bock SL, Smaga CR, Lamber, MR, Rainwater TR, Wilkinson PM, Parrott BB. 2023. Relationships between maternally-transferred mercury and hatchling development, behavior, and survival in the American alligator (Alligator

mississippiensis). *Sci. Total Environ.* 870:162010. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162010

Jonas A, and Phillips MC. 2008. Lipoprotein structure. In Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. 485-506. *Elsevier*. https://doi.org/10.1016/B978-044453219-0.50019-2

Jones SM. 2011. Hormonal regulation of ovarian function in reptiles. In Hormones and reproduction of vertebrates. *Acad. Press*. 89-115. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374930-7.10004-4

Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, Collins JL, O sborn, TF, Tontonoz P. 2002. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J. Biol. Chem*. 277(13), 11019-11025. https://doi.org/10.1074/jbc.M111041200

Jote CA. 2019. A review of 2, 4-D environmental fate, persistence and toxicity effects on living organisms. *Org. Med. Chem. Int. J.* 9:22-32. https://doi.org/10.19080/OMCIJ.2019.09.555755

Junqueira LCU, Junqueira LMMS. 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. *São Paulo: Santos*, *8*(3).

Kato K, Oka Y, Park MK. 2008. Identification and expression analysis of peroxisome proliferator-activated receptors cDNA in a reptile, the leopard gecko (*Eublepharis macularius*). *Zool. Sci.* 25(5), 492-502. https://doi.org/10.2108/zsj.25.492

Keller KA. 2019. Perinatology, In: Divers SJ, Stahl SJ (eds.), Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery (Third Edition). *Elsevier*, St. Louis (MO)., (85)951-959. ISBN: 978-0-323-48253-0

Kersten S. 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports*, 2(4), 282-286. https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve071

Khan A, Ahmad L, Khan MZ. 2012. Hemato-Biochemical Changes Induced by Pyrethroid Insecticides in Avian, Fish and Mammalian Species. Int. J. Agric. Biolo. 14(5), 834-842. ISSN Print: 1560–8530; ISSN Online: 1814–9596.

Khan I, Lu Y, Li N, Shi H, Ding L, Hong M, Fang Z. 2023. Effect of ammonia stress on AMPK regulating-carbohydrate and lipid metabolism in Chinese striped-neck turtle

(*Mauremys sinensis*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 263:109491. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109491

Koelmel JP, Napolitano MP, Ulmer CZ, Vasiliou V, Garrett TJ, Yost RA, Prasad MNV, Godri Pollitt KJ, Bowden JA. 2020. Environmental lipidomics: understanding the response of organisms and ecosystems to a changing world. *Metabolomics*. 16:1-22. https://doi.org/10.1007/s11306-020-01665-3

Koelmel JP, Ulmer CZ, Fogelson S, Jones CM, Botha H, Bangma JT, Guillette TC, Luus-Powell JW, Sara JR, Smit WJ, Albert K, Miller HA, Guillette MP, Olsen BC, Cochran JA, Garrett TJ, Yost RA, Albert K. 2019. Lipidomics for wildlife disease etiology and biomarker discovery: a case study of pansteatitis outbreak in South Africa. *Metabolomics*, 15(3), 38. https://doi.org/10.1007/s11306-019-1490-9

Kou H, Ya J, Gao X, Zhao H. 2020. The effects of chronic lead exposure on the liver of female Japanese quail (*Coturnix japonica*): Histopathological damages, oxidative stress and AMP-activated protein kinase based lipid metabolism disorder. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 190:110055. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110055

Kubsad D, Nilsson EE, King SE, Sadler-Riggleman I, Beck D, Skinner MK. 2019. Assessment of glyphosate-induced epigenetic transgenerational inheritance of pathologies and sperm epimutations: Generational toxicology. *Sci. Rep.* 9:6372. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42860-0

Kugathas S, Audouze K, Ermler S, Orton F, Rosivatz E, Scholze M, Kortenkamp A. 2016. Effects of common pesticides on prostaglandin D2 (PGD2) inhibition in SC5 mouse Sertoli cells, evidence of binding at the COX-2 active site, and implications for endocrine disruption. *Environ. Health Perspect.* 124(4), 452-459.

Kuo T, McQueen A, Chen TC, Wang JC. 2015. *Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids*. *Springer New York*. 99-126 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_5

Lábaque MC, Martella MB, Maestri DM, Navarro JL. 2013. The influence of diet composition on egg and chick traits in captive Greater Rhea females. *British Poul. Sci. 54*(3), 374-380. https://doi.org/10.1080/00071668.2013.791965

Lajmanovich R, Lorenzatti E, Maitre MI, Enrique S, Peltzer P. 2003. Comparative acute toxicity of the commercial herbicides glyphosate to neotropical tadpoles *Scinax nasicus* (Anura, Hylidae). *Fres. Environ. Bul.* 12(4), 364-367.

Lance VA, Morici LA, Elsey RM, Lund ED, Place AR. 2001. Hyperlipidemia and reproductive failure in captive-reared alligators: vitamin E, vitamin A, plasma lipids, fatty acids, and steroid hormones. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol*. 128(2), 285-294. https://doi.org/10.1016/S1096-4959(00)00321-3

Lance VA. 2003. Alligator physiology and life history: the importance of temperature. *Exp. Gerontol*. 38(7), 801-805. https://doi.org/10.1016/S0531-5565(03)00112-8

Lance VA, Rostal DC, Elsey RM, Trosclair III, PL. 2009. Ultrasonography of reproductive structures and hormonal correlates of follicular development in female American alligators, *Alligator mississippiensis*, in southwest Louisiana. *Gen. Comp. Endocrinol*. 162(3), 251-256. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.021

Lane EP, Huchzermeyer FW, Govender D, Bengis RG, Buss PE, Hofmeyr M, Myburgh JC, Steyl JCA, Pienaar DJ, Kotze A. 2013. Pansteatitis of unknown etiology associated with large-scale nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) mortality in Kruger National Park, South Africa: Pathologic findings. *J. Zoo. Wildl. Med.* 44(4), 899-910. https://doi.org/10.1638/2012-0264R.1

Lares BA, Vignatti AM, Echaniz SA, Gutiérrez MF. 2022. Effects of glyphosate on cladocera: A synthetic review. *Aquat. Toxicol.* 249:106232.

Larramendy ML, Molinari G, González NV, Pilili JP, Vera Candioti J, Reigosa M, Soloneski S. 2010. Agroquímicos en Argentina. Genotoxicidad y citotoxicidad inducida por principios activos y sus formulaciones comerciales. *J. Bas. App. Gen.* 21(2), 6.

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

Larriera A, Imhof A, Siroski P. 2008. Estado actual de los programas de conservación y manejo de género Caiman en Argentina. In: Castroviejo, J., Ayarzaguena, J., Velasco, A.

(Eds.), Contribución al conocimiento del Genero Caiman de Suramerica, *Public. Asoc. Amigos de Doña Ana* 18, Sevilla, España. 139–179.

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

Lawniczak CJ, and Teece MA. 2009. Lipid metabolism during embryonic development of the common snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 153(1), 73-80. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.01.016

Lehrke M, Lazar MA. 2005. The many faces of PPARγ. *Cell*. 123(6), 993-999. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.026

Leineweber C, Geisler G, Öfner S, Marschang RE. 2025. Blood Vitamin Concentrations in Pond Sliders (*Trachemys scripta*) Under Human Care in Central Europe and Possible Seasonal and Sex-Specific Influences. *Animals. 15*(6), 859. https://doi.org/10.3390/ani15060859

Leiva PMDL, Labaque MC, Fernández ME, Piña CI, Simoncini MS. 2018. Physical and chemical characteristics of fertile and infertile eggs of wild *Caiman latirostris*. *Aquaculture*. 497:287-291. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.002

Leiva PML. 2019. Influencia de los atributos corporales maternos y su interacción con factores climáticos sobre las características de los huevos y la progenie de *Caiman latirostris*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNC).

Levesque HM, Moon TW, Campbell PGC, Hontela A. 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch *(Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquat. Toxicol*. 60(3-4), 257-267. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00012-7

Li H, Xie L, Xu Z, Cheng F, You J. 2025. Advancing aquatic ecological risk assessment of imidacloprid in global surface water with mesocosm-based thresholds. *Water Res.* 123728. https://doi.org/10.1016/j.watres.2025.123728

Li W, Zan Y, Wu T, Yang S, Liu L, Li S, Gao J. 2024. Impact of chlorantraniliprole on honey bees: Differential sensitivity and biological responses in Apis mellifera and Apis cerana. *Sci. Total Environ.* 957:177417. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.177417

Liu XJ, Luo Z, Xiong BX, Liu X, Zhao YH, Hu GF, Lv GJ. 2010. Effect of waterborne copper exposure on growth, hepatic enzymatic activities and histology in *Synechogobius hasta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73(6), 1286-1291. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.06.019

Liu Y, Ding Z. 2017. Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. *Reproduction* 154(4), 123-131. https://doi.org/10.1530/REP-17-0161

Loomba R., Quehenberger O, Armando A, Dennis EA. 2015. Polyunsaturated fatty acid metabolites as novel lipidomic biomarkers for noninvasive diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis1. *J. Lipid Res*. 56(1),185-192. https://doi.org/10.1194/jlr.P055640

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 Environ Saf.* 136:84-91. http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.12.009

López González EC, Romito ML, Latorre MA, Siroski PA, Poletta GL. 2021a. Biomarkers of genotoxicity, immunotoxicity and oxidative stress on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings exposed to pesticide formulations and mixtures widely used in agriculture. *Environ. Adv.* 5:100114. https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100114

López González EC, Odetti LM, Poletta GL, Denslow N, Kroll KJ, Siroski PA, Marcó MVP. 2021b. Optimizing protocols for high-quality rna extraction from blood and liver tissues of the broad-snouted caiman. *R. J. Herpetol.* 28(4). https://doi.org/10.30906/1026-2296-2021-28-4-197-204

López González EC, Odetti LM., Latorre MA, Ávila OB, Contini LE, Siroski PA, Poletta GL. 2022. A comprehensive approach using multiple biomarkers to detect damage induced by pesticides in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) under *ex-situ* conditions. *Heliyon*, 8(1). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08667

López González EC, Siroski PA, Poletta GL. 2019. Genotoxicity induced by widely used pesticide binary mixtures on *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman). *Chemosphere*, 232:337-344. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.218

Lu HL, Kang CQ, Meng QY, Hu JR, Melvin SD. 2022. Functional and hepatic metabolite changes in aquatic turtle hatchlings exposed to the anti-androgenic fungicide vinclozolin. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 231:113220. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113220

Luo T, Weng Y, Huang Z, Zhao Y, Jin Y. 2021. Combined hepatotoxicity of imidacloprid and microplastics in adult zebrafish: Endpoints at gene transcription. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 246:109043. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109043

Lupi L, Bedmar F, Puricelli Marino M, Marino D, Aparicio V, Wunderlin D, Miglioranza K. 2019. Glyphosate runoff and its occurrence in rainwater and subsurface soil in the nearby area of agricultural fields in Argentina. *Chemosphere*. 225:906-914.

Ma J, Zhang L, Zhang J, Liu M, Wei L, Shen T, Zhu D. 2013. 15-Lipoxygenase-1/15-hydroxyeicosatetraenoic acid promotes hepatocellular cancer cells growth through protein kinase B and heat shock protein 90 complex activation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45(6), 1031-1041. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.018

Magnoli K, Carranza C, Aluffi M, Magnoli C, Barberis C. 2023. Fungal biodegradation of chlorinated herbicides: An overview with an emphasis on 2, 4-D in Argentina. *Biodegradation*, 34(3), 199-214. https://doi.org/10.1007/s10532-023-10022-9

Manolis SC, and Webb GJ. 2016. Best management practices for crocodilian farming. *IUCN-SSC Crocodile Specialist Group, Australia*, *455*.

Mapa Nacional de Cultivos campaña 2023/2024. Versión 1. Publicación N°6. Programa Nacional de Recursos Naturales y Gestión Ambiental, INTA. Visto el 25 de marzo del 2025. https://zenodo.org/records/13984185

Maradonna F, Nozzi V, Santangeli S, Traversi I, Gallo P, Fattore E, Mita DC, Mandich A, Carnevali O. 2015. Xenobiotic-contaminated diets affect hepatic lipid metabolism: Implications for liver steatosis in *Sparus aurata* juveniles. *Aquat. Toxicol*. 167:257-264. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.006

Martin JH, Nixon B, Cafe SL, Aitken RJ, Bromfield EG, Lord T. 2022. Oxidative stress and reproductive function: Oxidative stress and *in vitro* ageing of the post-ovulatory oocyte: an update on recent advances in the field. *Reproduction*, 164(6), 109-124. https://doi.org/10.1530/REP-22-0206

Martini CN, Gabrielli M, Brandani JN, Vila MDC. 2016. Glyphosate inhibits PPAR gamma induction and differentiation of preadipocytes and is able to induce oxidative stress. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 30(8), 404-413. https://doi.org/10.1002/jbt.21804

McKeegan PJ, and Sturmey RG. 2011. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. *Reprod. Fertil. Dev.* 24(1), 59-67. http://dx.doi.org/10.1071/RD11907

Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, Feingold KR. 2000. Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: Troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology*.141:4021e4031. https://doi.org/10.1210/endo.141.11.7771

Meng H, Li H, Zhao JG, Gu ZL. 2005. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma gene in various chicken tissues. *Domest. Anim. Endocrinol*. 28(1), 105-110. https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2004.05.003

Mentesana L, Andersson MN, Casagrande S, Goymann W, Isaksson C, Hau M. 2021. Natural variation in yolk fatty acids, but not androgens, predicts offspring fitness in a wild bird. *Front. Zool.* 18:1-12. https://doi.org/10.1186/s12983-021-00422-z

Mescher AL. 2024. Junqueira's basic histology: text and atlas. Fourteenth Edition. ISBN: 978-0-07-184268-6.

Milnes MR, Bermudez DS, Bryan TA, Gunderson MP, Guillette JrLJ. 2005. Altered neonatal development and endocrine function in Alligator mississippiensis associated with a contaminated environment. *Biol. Reprod.* 73(5), 1004-1010. https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041012

Milnes MR, Bryan TA, Katsu Y, Kohno S, Moore BC, Iguchi T., Guillette LJJr. 2008. Increased posthatching mortality and loss of sexually dimorphic gene expression in alligators (*Alligator mississippiensis*) from a contaminated environment. *Biol. Reprod.* 78(5), 932–938. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064915

Milnes MR. 2011. Hormones and reproductive cycles in crocodilians. In Hormones and Reproduction of Vertebrates. *Academic Press*. 305-319. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374930-7.10011-1

Minegishi K, Tanaka M, Nishimura O, Tanigaki S, Miyakoshi K., Ishimoto, H., and Yoshimura, Y. (2002). Reactive oxygen species mediate leukocyte-endothelium interactions in prostaglandin F2α-induced luteolysis in rats. *American Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283(6), 1308-1315. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00240.2002

Miranda RA, Silva BS, de Moura EG, Lisboa PC. 2023. Pesticides as endocrine disruptors: programming for obesity and diabetes. *Endocrine*, 79(3), 437-447. https://doi.org/10.1007/s12020-022-03229-y

Miyamoto K, Sato EF, Kasahara E, Jikumaru M, Hiramoto K, Tabata H, Katsuragia M, Odob S, Utsumi K, Inoue M. 2010. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 49(4), 674-681. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.025

Młynarska E, Grabarczyk M, Leszto K, Luba G, Motor J, Sosińska A, Franczyk B. 2025. Environmental Insults to Glucose Metabolism: The Role of Pollutants in Insulin Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 26(18), 8979. https://doi.org/10.3390/ijms26188979

Moleón MS, Parachú Marcó MV, Pietrobon EO, Jahn GA, Beldomenico PM, Siroski PA. 2018. Corticosterone levels and immunological indices in stressed juvenile broad-snouted caimans. *JOZ*, 304(3), 151-158. https://doi.org/10.1111/jzo.12513

Moleón MS, Cuervo PF, Parachú Marcó MV, Pietrobon EO, Jahn GA, Siroski, PA. 2022. Effects of physical restraint and endogenous adrenocorticotropin challenges on corticosterone levels and immunological indexes in the Broad-snouted Caiman (*Caiman latirostris*). *Can. J. Zool.* 101(1), 11-19. https://doi.org/10.1139/cjz-2022-0053

Moore BC, Uribe-Aranzábal M, Boggs A, Guillette JrLJ. 2008. Developmental morphology of the neonatal alligator (*Alligator mississippiensis*) ovary. *J. Morphol.* 269(3), 302-312. https://doi.org/10.1002/jmor.10583

Moore BC, Hamlin HJ, Botteri NL, Lawler AN, Mathavan KK, Guillette JrLJ. 2010. Posthatching development of Alligator mississippiensis ovary and testis. *J. Morphol.* 271(5), 580-595. https://doi.org/10.1002/jmor.10818

Moore BC, Roark AM, Kohno S, Hamlin HJ, Guillette JrLJ. 2012. Gene–environment interactions: the potential role of contaminants in somatic growth and the development of

the reproductive system of the American alligator. *Mol, Cell. Endocrinol. 354*(1-2), 111-120. https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.10.020

Murphy KM, Watkins MM, Finger JrJW, Kelley MD, Elsey RM, Warner DA, Mendonça MT. 2022. Xenobiotic estradiol-17ß alters gut microbiota of hatchling American alligators (*Alligator mississippiensis*). *Environ. Microbiol. 24*(12), 6336-6347. https://doi.org/10.1111/1462-2920.16222

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. Assoc.* 85:1–10. https://doi.org/10.4102/jsava.v85i1.965

Nagle RD, Burke VJ, Congdon JD. 1998. Egg Components and Hatchling Lipid Reserves: Parental Investment. PII S0305-0491(98)10003-2

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2024). *Chlorantraniliprole*. PubChem, Compound Summary for CID 1151990. U.S. National Library of Medicine. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorantraniliprole

Navarro I, De la Torre A, Sanz P, Abrantes N, Campos I, Alaoui A, Martínez MÁ. 2024. Assessing pesticide residues occurrence and risks in water systems: A Pan-European and Argentina perspective. *W. Res.* 254:121419. https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121419

Navarro JL, López ML, Maestri DM, Labuckas DO. 2001. Physical characteristics and chemical composition of Greater Rhea (Rhea americana) eggs from wild and captive populations. *Brit. Pou. Sci.* 42(5), 658-662. https://doi.org/10.1080/00071660120088515

Nelson TC, Groth KD, Sotherland PR. 2010. Maternal investment and nutrient use affect phenotype of American alligator and domestic chicken hatchlings. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 157(1), 19-27. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.05.010

Neuman-Lee LA, Hudson SB, Webb AC, French SS. 2020. Investigating the relationship between corticosterone and glucose in a reptile. *J. Exp. Biol*. 223(2), jeb203885. https://doi.org/10.1242/jeb.203885

Newman MM, Hoilett N, Lorenz N, Dick RP, Liles MR, Ramsier C, Kloepper JW. 2016. Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. *Sci. Total Environ*. 543:155-160.

Nilsen FM, Rainwater TR, Wilkinson PM, Brunell AM, Lowers RH, Bowden JA, Guillette LJ, Long SE, Schock TB. 2020. Examining maternal and environmental transfer of mercury into American alligator eggs. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 189:110057. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110057

Ninfali P, Malatesta M, Biagiotti E, Aluigi G, Gazzanelli G. 2001. Glucose-6-phosphate dehydrogenase in small intestine of rabbit: biochemical properties and subcellular localization. *Acta Histochem*. 103(3), 287-303. https://doi.org/10.1078/0065-1281-00599

Noble RC, McCartney R, Ferguson MJ. 1993a. Lipid and fatty acid compositional differences between eggs of wild and captive-breeding alligators (*Alligator mississippiensis*): an association with reduced hatchability?. *JOZ.* 230(4), 639-649. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1993.tb02712.x

Noble RC, Deeming DC, Ferguson MJ, McCartney R. 1993b. The effect of incubation temperature on yolk lipid parameters during embryonic development of the alligator (*Alligator mississippiensis*). *Lipids*. 28(2), 135-140. https://doi.org/10.1007/BF02535777

Odetti LM, López González EC, Romito ML, Simoniello MF, Poletta GL. 2020. Genotoxicity and oxidative stress in *Caiman latirostris* hatchlings exposed to pesticide formulations and their mixtures during incubation period. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 193:110312. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110312

Odetti LM, Simoniello MF, Poletta GL. 2023a. Alterations in the Expression of Antioxidant Enzyme Genes in Response to Pesticide Exposure During Embryonic Development in the Native Reptile Species *Caiman latirostris*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 110(1), 3. https://doi.org/10.1007/s00128-022-03652-x

Odetti LM, Chacón CF, Siroski PA, Simoniello MF, Poletta GL. 2023b. Effects of glyphosate, 2, 4-D, chlorantraniliprole, and imidacloprid formulations, separately and in mixtures in *Caiman latirostris* hatchlings. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 469:116544. https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116544

OMS Organización Mundial de la Salud. (OMS). 2019. Clasificación recomendada por la OMS de los plaguicidas por el peligro que presentan y directrices para la clasificación de 2019. ISBN 978-92-4-001605-7 (versión electrónica)

Organización Mundial para la Salud (OMS). 2011. Guidelines for Drinking-water Quality, en: Organization, World Health (Ed.), Suiza, pp. 668.

Ortiz RN., Zamboni LP., Tentor FR., Larriera A., Siroski PA., Parachú Marcó MV. (2026). Long-term assessment of reproductive parameters of broad-snouted caiman populations in agroecosystem areas of central-northern Santa Fe, Argentina. *JoZ*. https://doi.org/10.1111/jzo.70104

Ortiz-Ordoñez E, López-López E, Sedeño-Díaz JE, Uría E, Morales IA, Pérez ME, Shibayama M. 2015. Liver histological changes and lipid peroxidation in the amphibian *Ambystoma mexicanum* induced by sediment elutriates from the Lake Xochimilco. *J. Environ. Sci*. 46:156-164. https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.06.020

Osborne TF, and Espenshade PJ. 2009. Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism that regulates SREBP action: what a long, strange tRIP it's been. *Genes Dev*. 23(22), 2578-2591. https://doi.org/10.1101/gad.1854309

Osman AG, Koutb M, Sayed AEDH. 2010. Use of hematological parameters to assess the efficiency of quince (Cydonia oblonga Miller) leaf extract in alleviation of the effect of ultraviolet–A radiation on African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *J. Photochem Photobiol. B: Biol.* 99(1), 1-8. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.01.002

Parachú Marcó, MV, Leiva PM, Iungman JL, Simoncini MS, Piña CI. 2017. New evidence characterizing temperature-dependent sex determination in broad-snouted caiman, *Caiman latirostris*. http://hdl.handle.net/11336/67020

Paradis E, Schliep K. 2019. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35:526–528. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633

Park J, Rho HK, Kim KH, Choe SS, Lee YS, Kim JB. 2005. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. *Mol. Cell. Biol*. 25(12), 5146-5157. https://doi.org/10.1128/MCB.25.12.5146-5157.2005

Patino-Martínez J, De Andrés E, Negro-Balmaseda JJ, Navarro JC, Marco A. 202). Lipid and carotenoid quantification in leatherback turtle eggs: insights into reproductive success and conservation. *ESR.* 57:9-19. https://doi.org/10.3354/esr01402

Peluso J, Aronzon CM, Martíınez Chehda A, Cuzziol Boccioni AP, Peltzer PM, De Geronimo E, Aparicio V, Gonzalez F, Valenzuela L, Lajmanovich RC, 2022. Environmental quality and ecotoxicity of sediments from the lower Salado River basin (Santa Fe, Argentina) on amphibian larvae. *Aquat. Toxicol*. 253:106342. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106342.

Peluso J, Aronzon CM, Martíınez Chehda A, Cuzziol Boccioni AP, Peltzer PM, , Gonzalez F, Valenzuela L, De Geronimo E, Aparicio V, Lajmanovich RC. 2023. Water and sediment quality of an agro-industrial area through different approaches: Physicochemical parameters and ecotoxicity with amphibians. *W. Environ. Res.* 95(6), e10899. https://doi.org/10.1002/wer.10899

Pérez DJ, Iturburu FG, Calderon G, Oyesqui LA, De Gerónimo E, Aparicio V. C. 2021. Ecological risk assessment of current-use pesticides and biocides in soils, sediments and surface water of a mixed land-use basin of the Pampas region, Argentina. *Chemosphere*. 263:128061. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128061

Pérez DJ, Okada E, De Gerónimo E, Menone M, Aparicio V, Costa J. 2017. Spatial and temporal trends and flow dynamics of glyphosate and other pesticides within an agricultural watershed in Argentina. *Enviromen. Toxicol. Chem*. 36:3206-3216. https://doi.org/10.1002/etc.3897

Perry SM, Mitchell MA, Clulow S. 2021. Reptile assisted reproductive technologies: can ART help conserve 300 million years of evolution by preserving extant reptile biodiversity? *Reprod. Fertil. Dev*. 34(5), 385-400. https://doi.org/10.1071/RD21034

Peruzzo PJ, Porta AA, Ronco AE. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. pol.* 156(1), 61-66. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015

Piras IM, Bezuidenhout A, Díaz-Delgado J, Slawski D, Kelly PA. 2024. Pathology of "double scale" skin defect in farmed American alligators (*Alligator mississippiensis*) and

the possible association with hepatic fibrosis. *Vet. Pathol.* 61(5), 815-828. https://doi.org/10.1177/03009858241238685

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. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 650(2), 202-209. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.12.001

Poletta GL, Kleinsorge E, Mudry MD, Larriera A. 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. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.10.007

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. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.12.005

Poletta GL, Simoniello MF, Mudry MD. 2016. Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defense capacity in *Caiman latirostris* blood. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*. 179:29-36. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.08.003

Poletta GL., López González EL, Burella PM, Romito ML, Siroski PA, Mudry MD. 2017. Biomarkers of environmental contamination in reptile species: the effect of pesticide formulations on broad-snouted caiman *Caiman latirostris* (Crocodilia, Alligatoridae). *In Ecotoxicol. Genotoxicol.* (467-517). https://doi.org/10.1039/9781782629887-00467

Poletta GL, Odetti LM., Parachú Marcó MV, López González EC, Denslow N, Siroski PA. 2018. Transcriptomic of blood and liver tissues of *Caiman latirostris* through Next generation sequencing after acute exposure to glyphosate-base formulation Roundup®. 25th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group (CSG/SSC/IUCN), Santa Fe, Argentina.

Poletta GL, Odetti LM., Parachú Marcó MV, López González EC, Denslow N, Siroski PA. 2019. Modification in gene expression pattern as biomarkers of pesticide exposure in native reptile species". Simposio XII "Especies nativas como indicadores de efectos genotóxicos", XI Congreso Latinoamericano de Mutagénesis, Carcinogénesis y

Teratogénesis Ambiental. I Jornada de la Sociedad Paraguaya De Genética, Asunción del Paraguay, Paraguay, Abril de 2019.

Poletta GL, Odetti LM., López González EC., Amavet, PS., Siroski, PA. (2024). Assessing the Impacts of Anthropogenic Stress Factors on Health Status of Wild Caiman Populations. SETAC Latin America 15th Biennial Meeting, Montevideo, Uruguay.

Price ER. 2016. The physiology of lipid storage and use in reptiles. *Biol. Rev*. 92(3), 1406-1426. https://doi.org/10.1111/brv.12288

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. Pol.* 229:771-779. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.006

Qiu YY, Zhang J, Zeng FY, Zhu YZ. 2023. Roles of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Pharmacol. Res*. 192:106786. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106786

R Core Team (2024). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/.

Rathnamma VV, Nagaraju B. 2013. Median lethal concentrations (LC50) of Chlorantraniliprole and its effects on behavioral changes in freshwater fish Labeo rohita. *Int. J. Public Health Sci*. 2:137-142. http://dx.doi.org/10.11591/ijphs.v2i4.4208v

Rauschenberger RH. 2004. Developmental mortality in American alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed to organochlorine pesticides. Dissertation, University of Florida, Gainesville.

Rauschenberger RH, Wiebe JJ, Sepúlveda MS, Scarborough JE, Gross TS. 2007. Parental exposure to pesticides and poor clutch viability in American alligators. *Environ. Sci. Technol*. 41(15), 5559-5563. https://doi.org/10.1021/es0628194

Rauschenberger RH, Sepúlveda MS, Wiebe JJ, Szabo NJ, Gross, TS. 2009. Predicting maternal body burdens of organochlorine pesticides from eggs and evidence of maternal transfer in *Alligator mississippiensis*. *Environ. Toxicol. Chem*. 23(12), 2906-2915. https://doi.org/10.1897/03-584.1

Ren X, Li R, Liu J, Huang K, Wu S, Li Y, Li, C. 2018. Effects of glyphosate on the ovarian function of pregnant mice, the secretion of hormones and the sex ratio of their fetuses. *Environ. Pollut.* 243:833-841. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.049

Reno U, Regaldo L, Ayarragaray M, Méndez E, Gagneten AM. 2018. Monitoreo de Plaguicidas y Empleo de Bioindicadores domo Herramientas de Gestión Ambiental para dar Respuesta a Demandas Sociales. PERIURBANO hacia el consenso. Ediciones INTA. Disponible en: https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/handle/20.500.12123/3035

Repa J, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JMA, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRα and LXRβ. *Genes Dev.* 14(22), 2819-2830. https://doi.org/10.1101/gad.844900

Reregistration Eligibility Decision (RED) 2,4-D; EPA 738-R-05-002. 2005. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office: Washington, DC.

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. Endocrinol.162*(3), 286-292. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.032

Rodrigues AC, Gravato C, Quintaneiro C, Bordalo MD, Golovko O, Žlábek V, Pestana JL. 2017. Exposure to chlorantraniliprole affects the energy metabolism of the caddisfly *Sericostoma vittatum*. *Environ. Toxicol. Chem.* 36(6), 1584-1591. https://doi.org/10.1002/etc.3684

Ronco AE, Marino DJ, 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 (8), 458. https://doi.org/10.1007/s10661-016-5467-0.

Ronco JL, Gnecco GAF, Consolo VF, Puricelli M, Delgado SG, García GV, Covacevich F. 2024. Crop intensification influences water infiltration and microbial activity in agricultural soils from the southeast of the Argentinean Pampas. *Ecol. Aus.* 330-345.

Rosati L, Chianese T, De Gregori V, Verderame M, Raggio A, Motta CM, Scudiero R. 2023. Glyphosate interference in follicular organization in the wall lizard *Podarcis siculus*. *Int. J. Mol. Sci.*, 24(8), 7363. https://doi.org/10.3390/ijms24087363

Roza M, Eriksson ANM, Svanholm S, Berg C, Karlsson O. 2024. Male-transmitted transgenerational effects of the herbicide linuron on DNA methylation profiles in *Xenopus tropicalis* brain and testis. *Sci. Total Environ*. 923:170949. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170949

Santarsiero A, Todisco S, Convertini P, De Leonibus C, Infantino V. 2024. Transcriptional Regulation and Function of Malic Enzyme 1 in Human Macrophage Activation. *Biomedicines*, 12(9), 2089. https://doi.org/10.3390/biomedicines12092089

Santos X, and Llorente G. 2004. Lipid dynamics in the viperine snake, Natrix maura, from the Ebro Delta (NE Spain). *Oikos*. 105(1), 132-140. https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.12222.x

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *End. Rev.* 21(1), 55-89. https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389

Sasal MC, Wilson MG, Sione SM, Beghetto SM, Gabioud EA, Oszust JD, Schulz GA. 2017. Monitoreo de glifosato en agua superficial en Entre Ríos: La investigación acción participativa como metodología de abordaje. *RIA.* 43(2), 195-205. versión *On-line* ISSN 1669-2314

Satorre EH, y Andrade FH. 2021. Cambios productivos y tecnológicos de la agricultura extensiva argentina en los últimos quince años.

Seebacher F, Murray SA, Else PL. 2009. Thermal acclimation and regulation of metabolism in a reptile (*Crocodylus porosus*): the importance of transcriptional mechanisms and membrane composition. *Physiol. Biochem. Zoo*. 82(6), 766-775. https://doi.org/10.1086/605955

Seewagen CL, Elowe CR, Gerson AR, Groom DJ, Ma Y, Yildirim M, Guglielmo, CG. 2022. Short-term mercury exposure disrupts muscular and hepatic lipid metabolism in a migrant songbird. *Sci. Rep.* 12(1), 11470. https://doi.org/10.5061/dryad.47d7wm3g3

Sen P, Qadri S, Luukkonen PK, Ragnarsdottir O, McGlinchey A, Jäntti S, Hyötyläinen T. 2022. Exposure to environmental contaminants is associated with altered hepatic lipid

metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *J. hepatol.* 76(2), 283-293. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.09.039

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 2014. *Resolución 367/2014. Normas para el Etiquetado de los Productos Fitosanitarios Formulados de Uso Agrícola*. Boletín Oficial de la República Argentina. Disponible en: https://digesto.senasa.gob.ar/items/show/596

Servicio Nacional De Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 2019. *Resolución N.º 466/2019 – Prohibición de formulaciones de ésteres butílicos e isobutílicos del ácido 2,4-D* [Aviso en el Boletín Oficial Nº 53 506]. Boletín Oficial de la República Argentina. Disponible en: https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/211961/20190724

Shaney KJ, Card DC, Schield DR, Ruggiero RP, Pollock DD, Mackessy SP, Castoe TA. 2014. Squamate Reptile Genomics and Evolution. Toxinology, 1–18. https://doi:10.1007/978-94-007-6649-5_34-2

Siddiqui R, Maciver SK, Khan NA. 2022. Gut microbiome–immune system interaction in reptiles. *J. App. Microbiol. 132*(4), 2558-2571. https://doi.org/10.1111/jam.15438

Simmen FA, Alhallak I, Simmen RC. 2020. Malic enzyme 1 (ME1) in the biology of cancer: it is not just intermediary metabolism. *J. Mol. Endocrinol.* 65(4), R77-R90. https://doi.org/10.1530/JME-20-0176

Sirard MA. 2011. Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet*. 28, 483-488. https://doi.org/10.1007/s10815-011-9554-4

Siroski PA, Poletta GL, Latorre MA, Merchant ME, Ortega HH., Mudry MD. 2016. Immunotoxicity of commercial-mixed glyphosate in Broad Snouted Caiman (*Caiman latirostris*). *Chem. Biol. Interact*. 244:64–70.

Siroski PA, Bassetti L, Braga Mascarenhas-Júnior P, Cardoso Nóbrega Y, Bauer F, Motte M, Martínez N, Llobet-Querejazu A, Morales JC, Borteiro C, Gutiérrez F, Gutiérrez F, Larriera A. 2022. *Broad-Snouted Caiman (Caiman latirostris) geographic distribution and population update*. En Crocodiles: Proceedings of the 26th Working Meeting of the IUCN-SSC Crocodile Specialist Group (pp. 72–XX). IUCN – The World Conservation Union. Mérida, México. Disponible en:

https://www.iucncsg.org/365_docs/attachments/protarea/6958919d36d18a92cb009cfa33bce8b4.pdf

Siroski PA, Ciocan H, Hilevski S, Larriera A. 2024. Increasing Population Status of Broad-Snouted Caiman (*Caiman latirostris*) Based on Sustainable Use Strategies in a Managed Protected Area in Santa Fe, Argentina. *Animals.* 14:1288. https://doi.org/10.3390/ani14091288

Sistema de Información Simplificado Agrícola (SISA). 2024. Campaña 2023/2024. Visto el 25 de marzo del 2025. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sisa_soja_23_24_final_web.pdf

Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA) y Organización de las Naciones Unidas. 2019. Nueva York y Ginebra, Octava edición. ISBN, 978-92-1-117201-0

Snape JR, Maund SJ, Pickford DB, Hutchinson TH. 2004. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.* 67(2), 143-154. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.011

Solomon K, Anadón A, Carrasquilla G, Cerdeira A, Marshall J, Sanin LH. 2007. Coca and poppy eradication in Colombia, Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. *Rev. Environ. Cont. Toxicol.* 190:43-125.

Speake BK, and Thompson MB. 1999. Comparative aspects of yolk lipid utilisation in birds and reptiles. *Poult. Avian Biol. Rev*. 10(4), 181-211.

Speake BK, Thompson MB, Thacker FE, Bedford GS. 2003. Distribution of lipids from the yolk to the tissues during development of the water python (*Liasis fuscus). J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 173(7), 541-547. https://doi.org/10.1007/s00360-003-0362-8

Starck JM, Cruz-Neto AP, Abe AS. 2007. Physiological and morphological responses to feeding in broad-nosed caiman (*Caiman latirostris*). *J. Exp. Biol.* 210 (12), 2033-2045. https://doi.org/10.1242/jeb.000976

Staton MA, Edwards JrHM, Brisbin JrIL, McNease L, Joanen T. 1990. Dietary energy sources for the American alligator, *Alligator mississippiensis* (Daudin). *Aquaculture*, 89(3-4), 245-261. https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90130-F

Stoker C, Rey F, Rodriguez H, Ramos JG, Sirosky P, Larriera A, Munoz-de-Toro M. 2003. Sex reversal effects on *Caiman latirostris* exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133(3), 287-296. https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00199-0

Stoker C, Beldoménico PM, Bosquiazzo VL, Zayas MA, Rey F, Rodríguez H, Muñoz de Toro M, Luque EH. 2008. Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in *Caiman latirostris*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156(3), 603-612. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.02.011

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 broadsnouted caimans (*Caiman latirostris*) and correlation with measures of reproductive performance. Chemosphere, 84(3), 311-317. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.04.013

Storey KB. 2016. Comparative enzymology—new insights from studies of an "old" enzyme, lactate dehydrogenase. *Comp: Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Bio.* 199:13-20. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.12.004

Sun Q. 2023. Imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, impairs lipid and glucose metabolism (Dissertation). University of Massachusetts Amherst. https://doi.org/10.7275/10563276.0 https://hdl.handle.net/20.500.14394/17316

Sutton ML, Cetica PD, Beconi MT, Kind KL, Gilchrist RB, Thompson JG. 2003. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction-Cambridge*, 126(1), 27-34. https://doi.org/10.1530/rep.0.1260027

Tang J, Wang W, Jiang Y, Chu W. 2021. Diazinon exposure produces histological damage, oxidative stress, immune disorders and gut microbiota dysbiosis in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Environ. Pol.* 269:116129. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116129v

Tavalieri YE, Galoppo GH, Canesini G, Luque EH, Muñoz-de-Toro, M. 2020. Effects of agricultural pesticides on the reproductive system of aquatic wildlife species, with crocodilians as sentinel species. *Mol. Cell. Endocrinol*. 518:110918. https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110918

Tavalieri YE, Alarcón R, Tschopp M, Luque E, Muñoz-de-Toro M, Galoppo G. 2024. Exposure to atrazine and endosulfan alters oviductal adenogenesis in the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Environ. Sci. Pol. Res.* 31(24), 35927-35937. https://doi.org/10.1007/s11356-024-33662-7

Teng M, Zhao F, Zhou Y, Yan S, Tian S, Yan J, Meng Z, Bi S, Wang C. 2019. Effect of propiconazole on the lipid metabolism of zebrafish embryos (*Danio rerio*). *J. Agric. Food Chem.* 67(16), 4623-4631. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00449

Thompson MB, and Speake BK, 2004. Egg morphology and composition. In: Deeming, D.C. (Ed.), Reptilian Incubation: Environment, Evolution and Behaviour. Nottingham University Press, United Kingdom, 45–73. ISBN : 1897676115

Thompson MB, and Speake BK. 2002. Energy and nutrient utilisation by embryonic reptiles. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 133(3), 529-538. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00188-5

Tian S, Yan H, Meng Z, Jia M, Sun W, Huang S, Wang Y, Zho Z, Diao J, Zhu W. 2022. Prothioconazole and prothioconazole-desthio induced different hepatotoxicities via interfering with glycolipid metabolism in mice. *Pestic. Biochem. Phys.* 180:104983. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104983

Tide International USA, Inc. (2018). *Safety Data Sheet: Tide Imidacloprid 2F T&O*. SDS# TIC-INS8422914. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://assets.greenbook.net/16-34-31-02-01-2018-Tide-Imidacloprid-2F-TO-SDS1.pdf

Uribe MCA, and Guillette JrLJ. 2000. Oogenesis and ovarian histology of the American alligator *Alligator mississippiensis*. *J. Morphol.* 245(3), 225-240. https://doi.org/10.1002/1097-4687(200009)245:3<225::AID-JMOR4>3.0.CO;2-Mopen_in_new ISSN: 0362-2525

Vajda K. 1997. Cholesterol esterification in Alligator mississippiensis, in relation to development, incubation temperature and hatchability (Tesis doctoral). The University of Manchester (United Kingdom). ProQuest Dissertations & Theses Global. (No. 11004218)

Valente LC, Manoel B. de M, Reis ACC, Stein J, Jorge BC, Barbisan LF, Romualdo GR, Arena, AC. 2023. A mixture of glyphosate and 2,4-D herbicides enhances the deleterious

reproductive outcomes induced by Western diet in obese male mice. *Environ: Toxicol.* 38(12), 2127–2139. https://doi.org/10.1002/tox.23937

Van Wilpe E. 2012. Liver and gallbladder morphology of the juvenile Nile crocodile, *Crocodylus niloticus* (Laurenti, 1768). Tesis Doctoral. University of Pretoria, Faculty of Veterinary Science. Disponible en: https://repository.up.ac.za/server/api/core/bitstreams/053255af-4d3d-45cb-b3b1-952366d343d2/content

Verdade LM. 1997. Morphometric analysis of the broad-snouted caiman *(Caiman latirostris):* An assessment of individuals' clutch, body size, sex, age, and area of origin. University of Florida.

Verderame M, Chianese T, Rosati L, Scudiero R. 2022. Molecular and histological effects of glyphosate on testicular tissue of the lizard *Podarcis siculus*. *I. J. Mol. Sci*. 23(9), 4850. https://doi.org/10.3390/ijms23094850

Verderame M, Chianese T, Scudiero R. 2023. Morphological and molecular evidence of active principle glyphosate toxicity on the liver of the field lizard *Podarcis siculus.* En G. E. L. Liwszyc & M. L. Larramendy (Eds.), *Bird and reptile species in environmental risk assessment strategies* (pp. 151–168). *Royal Society of Chemistry.* Print ISBN: 978-1-83916-710-2. Electronic ISSN: 1757-7187.

Vliet K, Shirley M, Ross P. Roberto I. 2024. Living crocodylians of the world (2024). Crocodile Specialist Group Newsletter 43(2): 15-22.

Vonier P, Crain DA, McLachlan JA, Guillette LJJr, Arnold SF. 1996. Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. *Environ. Health Perspect.* 104(12), 1318–1322. https://doi.org/10.1289/ehp.961041318

Wang J, Chitsaz F, Derbyshire MK., Gonzales NR, Gwadz M, Lu S, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita A, Yang M, Zhang D, Zheng C, Lanczycki CJ, Marchler-Bauer A. 2023. The conserved domain database in 2023. *Nucl. Acid Res.* 51, D384–D388. https://doi.org/10.1093/nar/gkac1096

Wang L, Li X, Zhang G, Zhao H. 2021. Transcriptomic analysis of lead-induced hepatoxicology in female Japanese quails (*Coturnix japonica*): Implications of

triglyceride synthesis, degradation and transport disruption. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*. 244:109024. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109024

Wang T, Han Y, Li H, Wang Y, Xue T, Chen X, Zhu T. 2021. Changes in bioactive lipid mediators in response to short-term exposure to ambient air particulate matter: A targeted lipidomic analysis of oxylipin signaling pathways. *Environ. Int.* 147:106314. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106314

Wrobel M, and Kotwica J. 2005. Influence of polychlorinated biphenyls (PCBs): and phytoestrogens on prostaglandin F2α and E2 secretion from bovine endometrial cells at a postovulatory stage of the estrous cycle. *Vet. Med.* 50:487-495.

Wrobel MH. 2018. Glyphosate affects the secretion of regulators of uterine contractions in cows while it does not directly impair the motoric function of myometrium in vitro. *Toxicol. App. Pharmacol.* 349:55-61. https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.04.031

Wu S, Zhou X, Qin W, An X, Wang F, Lv L, He Y. 2023. Prostaglandin Metabolome Profiles in Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to Acetochlor and Butachlor. *Int. J. Mol. Sci.*, 24(4), 3488. https://doi.org/10.3390/ijms24043488

Xiao N, Zhao Y, Yao Y, Wu N, Xu M, Du H, Tu Y. 2020. Biological activities of egg yolk lipids: a review. *J. A. food Chem.* 68(7), 1948-1957. https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06616

Yamada J, Campos VJ, Kitamura N, Pacheco AC, Yamashita T, Yanaihara N. 1987. An immunohistochemical study of the endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the *Caiman latirostris*. *Archiv. histology. Jap.* 50(2), 229-241.

Yang F, Zhang Y, Ren H, Wang J, Shang L, Liu Y, Shi X. 2019. Ischemia reperfusion injury promotes recurrence of hepatocellular carcinoma in fatty liver via ALOX12-12HETE-GPR31 signaling axis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38, 1-14.

Yang L, Shen Q, Zeng T, Li J, Li W, Wang Y. 2020. Enrichment of imidacloprid and its metabolites in lizards and its toxic effects on gonads. *Environ. Pol.* 258:113748. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113748

Yang XF, Shang DJ. 2023. The role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in lipid metabolism and inflammation in atherosclerosis. *Cell Biol. Int*. 47(9), 1469-1487. https://doi.org/10.1002/cbin.12065

Yanosky AA. 1990. Histoire naturelle du Caïman á museau large (*Caiman latirostris*), un Alligatoriné mal connu. Rev Fr Aquariol Herpetol 17: 19-31.

Yasukawa K, Okuno T, Yokomizo T. 2020. Eicosanoids in skin wound healing. *Int. J. Mol. Sci.* 21(22), 8435.

Yin K, Wang D, Zhang Y, Lu H, Wang Y, Xing M. 2022. Dose-effect of polystyrene microplastics on digestive toxicity in chickens (*Gallus gallus*): Multi-omics reveals critical role of gut-liver axis. *J. Adv. Res*. https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.10.015

Yu HF, Duan CC, Yang ZQ, Wang YS, Yue ZP, Guo B. 2020. Malic enzyme 1 is important for uterine decidualization in response to progesterone/cAMP/PKA/HB-EGF pathway. *The FASEB J.* 34(3), 3820-3837. https://doi.org/10.1096/fj.201902289R

Yu S, Wang Z, Zhang L, Nie Y, Deng Y, Liu R, Diao J, Zhou Z. 2022. Possible changes in trade-off strategy in female lizards (*Eremias argus*) during hibernation following exposure to chlorantraniliprole: Impact on the HPG axis and the energy mobilization. *Pestic. Biochem. Phys.* 105059. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105059

Yuan L, Lin J, Peng Y, Gao R, Sun, Q. 2020. Chlorantraniliprole induces adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes via the AMPKα pathway but not the ER stress pathway. *Food Chem.* 311:125953. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125953

Zhang F, Zhang Q, Liu X, Gao M, Li X, Wang Y, Chang Y, Zhang X, Huo Z, Shan J, Zhu B, Yao W. 2023. Human serum lipidomics analysis revealed glyphosate may lead to lipid metabolism disorders and health risks. *Environ. Int*. 171:107682. https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107682

Zhang L, Meng Z, Chen L, Zhang G, Zhang W, Tian Z, Wang Z, Yu S, Zhou Z, Diao J. 2020. Perfluorooctanoic acid exposure impact a trade-off between self-maintenance and reproduction in lizards (*Eremias argus*) in a gender-dependent manner. *Environ. Pollut.* 262:114341. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114341

Zhao Y, Jiao F, Tang T, Wu S, Wang F, Zhao X. 2023. Adverse effects and potential mechanisms of fluxapyroxad in *Xenopus laevis* on carbohydrate and lipid metabolism. *Environ. Pollut*. 121710. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121710

Zheng JL, Luo Z, Zhu QL, Tan XY, Chen QL, Sun LD, Hu W. 2013. Molecular cloning and expression pattern of 11 genes involved in lipid metabolism in yellow catfish

Pelteobagrus fulvidraco. *Gene*, 531(1), 53-63. https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.08.028

ANEXO I

PUBLICACIONES VINCULADAS A LA TESIS DOCTORAL

Chacón CF, Martinez T, Tonini E, Moleón SM, Siroski PA, Poletta GL, López González EC. 2026. Physiological disruption, genotoxicity, and body condition impairment in *Caiman latirostris* yearlings exposed to environmentally relevant pesticide concentrations. *Science of The Total Environment*, 1025, 181668. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2026.181668

Chacón CF, Marcó Parachú MV, Siroski, PA., Poletta, GL. 2025. Identification and tissue-specific expression of genes involved in lipid metabolism in broad-snouted caiman. *Journal of Zoology*. http://doi.org/10.1111/jzo.70071

Chacón CF, Marcó Parachú MV, Poletta GL, Siroski PA. 2024. Lipid metabolism in crocodilians: a field with promising applications in the field of ecotoxicology. *Environmental Research*, 119017. https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119017

Odetti LM, **Chacón CF,** Siroski PA, Simoniello MF, Poletta GL. 2023. Effects of glyphosate, 2, 4-D, chlorantraniliprole, and imidacloprid formulations, separately and in mixtures in *Caiman latirostris* hatchlings. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 469, 116544. https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116544

ANEXO II

PRESENTACIONES A CONGRESOS VINCULADOS A LA TESIS DOCTORAL

Chacón CF, Parachú Marcó MA, Poletta GL, Siroski PA. 2026. Agrochemical-induced disruption of hepatic lipid metabolism and liver histology in *Caiman latirostris* hatchlings. 28th Working Meeting of the IUSN-SSC Crocodile Specialist Group. 13 - 16 Mayo 2026. Agadir. Marruecos. Poster.

Martinez T, Tonini E, **Chacón CF,** Siroski PA, López González EC, Poletta GL. 2024. Immunotoxicity, genetic damage and metabolic stress in *Caiman latirostris* yearlings exposed *in vivo* to commercial pesticides. Congress of Society of Environmental Toxicology and Chemistry. SETAC Argentina. 21- 23 Octubre, 2024. Santa Fe, Argentina. Poster.

Chacón CF, Siroski PA, Poletta GL. 2024. Targeted lipidomics for eicosanoids in environmental toxicology studies applied to a crocodilian species. IX Congreso Argentino De La Sociedad De Toxicología Y Química Ambiental. SETAC. Santa Fe, Argentina. 2024. Presentación oral.

Martinez T, Tonini E, **Chacón CF,** Siroski PA, López González EC, Poletta GL. 2024. Immunotoxicity and genetic damage in *Caiman latirostris* yearlings exposed *in vivo* to commercial pesticides. 27th Working Meeting of the IUSN-SSC Crocodile Specialist Group. 14 - 20 Abril 2024. Darwin, Australia. Poster.

Chacón CF, Parachú Marcó MA, Poletta GL, Siroski PA. 2023. Pesticide exposure alters lipid contents in *Caiman latirostris* egg yolk. Congress of Society of Environmental Toxicology and Chemistry. SETAC Latin America 15th Biennial Meeting. 17- 20 Septiembre 2023. Montevideo, Uruguay. Poster.

Odetti LM, **Chacón CF,** Siroski PA, Simoniello MF, Poletta GL. 2023. How the Interactions in Pesticide Mixtures Affect Genotoxicity and Oxidative stress in *Caiman latirostris* Hatchlings. Congress of Society of Environmental Toxicology and Chemistry. SETAC Latin America 15th Biennial Meeting. 17- 20 Septiembre 2023. Montevideo, Uruguay. Presentación oral.

Chacón CF, Parachú Marcó MA, Poletta GL, Siroski PA. 2023. Lipid metabolism genes as potential biomarkers of environmental stress in caimans. Congress XXIII Argentine Herpetological Association. 4- 8 Septiembre, 2023. Buenos Aires, Argentina. Presentación oral.

Chacón CF, Parachú Marcó MA, Bassó A, Poletta GL. Siroski PA. 2022. Respuesta integrada de biomarcadores en neonatos de *Caiman latirostris* expuestos a plaguicidas. XXII Congreso Argentino De Herpetología. 18-21 de Octubre de 2022. Santa Fe. Argentina. Presentación oral.

Chacón CF, Siroski PA, Poletta GL. 2022. Evaluación de la exposición a agroquímicos formulados sobre parámetros bioquímicos y enzimáticos en el yacaré overo (*Caiman latirostris*). VIII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC. 7-11 de Marzo 2022. Presentación oral.