



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ciencias Veterinarias

*Laboratorio de Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados, (FHUC - UNL /MMA)
Santa Fe, Argentina*

*Laboratorio de Genética, Departamento de Ciencias Naturales (FHUC - UNL),
CONICET, Santa Fe, Argentina*

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

**EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOTÓXICO DE PLAGUICIDAS
DE USO AGRÍCOLA EN SALVATOR MERIANAE (IGUANA
OVERA) COMO BIOMONITOR DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL**

Autor: Lic. Ana Paula Mestre

Director: Dr. Pablo Ariel Siroski

Codirectora: Dra. Patricia Susana Amavet

“Al Norte y al Sur, al Este y al Oeste, el hombre serrucha, con delirante entusiasmo, la rama donde está sentado”

Eduardo Galeano

Agradecimientos

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

-Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca de posgrado con la cual se hizo posible la realización de este trabajo de Tesis Doctoral.

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

-A todos los integrantes del Laboratorio de Genética de la FHUC-UNL.

-A mi Director el Dr. Pablo A. Siroski y mi Co-directora la Dra. Patricia Amavet por permitirme desarrollar esta línea de investigación, compartirme sus conocimientos y experiencia.

-A la Dra. Gisela L. Poletta, por su colaboración y predisposición en el desarrollo de este trabajo de Tesis.

-A mis compañeras y amigas Lic. Carolina Imhoff y Lic. Gisela Loretán por acompañarme, sostenerme y brindarme tanto amor y contención en este camino.

-A mi querida amiga Pamela Burella, que tanto me enseñó, escuchó y acompañó en esta etapa mientras estuvo entre nosotros.

-A mi familia, por su apoyo y aliento permanente. En especial a mi mamá que tanto me acompañó y ayudó siempre.

-A Liliana y Gabriel, mis suegros, que gracias a su ayuda incondicional muchas de las tareas fueron posibles.

-A Gabi, mi esposo, que sin dudarlo me incentivó, apoyó y sostuvo siempre para que este objetivo sea alcanzado.

-A mi hijo Valentino, que con su amor incondicional, ternura e inocencia me dio las fuerzas y la valentía para mirar siempre hacia adelante.

RESUMEN

La expansión de la frontera agrícola en los últimos años ha afectado de manera desmedida a las poblaciones silvestres animales en Argentina. Particularmente la distribución natural de la iguana overa (*Salvator merianae*) ha quedado inmersa en áreas expuestas a diferentes formulaciones de plaguicidas. El sistema inmune (SI) es un excelente indicador de la salud de los organismos, por lo que este trabajo de Tesis doctoral tuvo como objetivo evaluar el efecto de los agroquímicos más utilizados en el país (cipermetrina, glifosato y clorpirifos) y de sus combinaciones, sobre el SI de *S. merianae*. Los parámetros inmunológicos evaluados para tal fin fueron: recuento total y diferencial de glóbulos blancos, índices de lobularidad y de heterófilos/linfocitos, cuantificación de anticuerpos naturales y determinación de la actividad del sistema de complemento. Complementariamente, se evaluaron otros parámetros como los niveles de corticosterona en sangre y el crecimiento corporal de los individuos. Los ensayos consistieron en exposiciones tópicas de huevos para evaluar los efectos de los plaguicidas sobre el desarrollo embrionario, así como la exposición de juveniles en condiciones semicontroladas.

Los resultados mostraron que las formulaciones de plaguicidas testeadas aplicadas en similares, e incluso menores concentraciones que las utilizadas en la agricultura actual, inducen alteraciones en el SI de embriones y juveniles de *S. merianae* expuestos. Las diferentes respuestas inmunológicas, endócrinas y/o de crecimiento de los organismos a las exposiciones a plaguicidas dependieron de las características del compuesto aplicado en forma individual o de la combinación de plaguicidas aplicada, donde se observaron diferentes tipos de interacciones entre los compuestos. Por último, en animales expuestos durante el desarrollo embrionario, los efectos tóxicos de los plaguicidas evaluados también dependieron de las diferentes concentraciones de plaguicidas testeadas y de la etapa embrionaria en la que se encontraban los individuos al momento de la aplicación tópica.

En base a los resultados de este trabajo de Tesis, se sugiere continuar con la evaluación de los efectos de estos plaguicidas, con especial interés en sus diferentes marcas comerciales así como en las distintas combinaciones de los mismos utilizadas en la agricultura moderna, empleando biomarcadores que permitan identificar las condiciones reales de exposición en las que se encuentra esta especie en su ambiente natural.

ABSTRACT

The expansion of the agricultural frontier in recent years has excessively affected wild animal populations in Argentina. Particularly, the natural distribution of the Tegu Lizard (*Salvator merianae*) has been immersed in areas exposed to different pesticide formulations. The immune system (SI) is an excellent indicator of the health of organisms, so in this Doctoral Thesis, we begin to evaluate the possible effect of the most widely used agrochemicals in the country (cypermethrin, glyphosate, and chlorpyrifos) and their mixtures, on the SI of *S. merianae*. The immunological parameters evaluated for this purpose were: total and differential white blood cell count, lobularity index, heterophils / lymphocytes index, natural antibodies titres, and complement system activity. Besides, other indicators about the health of animals were evaluated, such as corticosterone levels and body growth of individuals analyzed. The tests consisted of: egg's topical exposures to evaluate the embryonic development effects, as well as experiments under semi-controlled conditions in juvenile individuals. The results of this thesis showed that the formulations tested at similar or lower concentrations to those recommended for crops application, induce IS alterations of embryos and juveniles *S. merianae* exposed. Effects on corticosterone levels and body growth of exposed animals were demonstrated in juvenile animals. Different immune, endocrine, and / or body growth organism's responses to pesticide exposures, changed according to the compound applied, the glyphosate trademark tested, and the exposure method: individual or combined, recognizing different interactions among components in the mixtures. Finally, in animals exposed during embryonic development, toxic effects also changed according to different tested pesticide concentrations and embryonic stage at the time of topical application. Based on these findings on the results, it is suggested to continue with the evaluation of pesticides effects, also considering commercial brands as well as the different combinations of them used in modern agriculture, through the use of biomarkers to identify the real exposure conditions of this species in its natural environment.

ÍNDICE GENERAL

	Agradecimientos	I
	RESUMEN	II
	ABSTRACT	III
	ÍNDICE GENERAL	IV
	ÍNDICE DE TABLAS	VII
	ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
	ABREVIATURAS UTILIZADAS	XIII
CAPÍTULO	1 Introducción general.....	1
	1.1 Plaguicidas	2
	1.1.1 Problemática ambiental.....	2
	1.1.2 Definición y clasificación de plaguicidas.....	3
	1.1.2.1 Herbicidas.....	6
	1.1.2.1.1 Glifosato.....	7
	1.1.2.2 Insecticidas.....	8
	1.1.2.2.1 Cipermetrina.....	9
	1.1.2.2.2 Clorpirifos.....	11
	1.1.3 Antecedentes de efectos tóxicos provocados por plaguicidas sobre las especies silvestres y el estudio de éstas como especies centinelas.....	12
	1.2 Descripción de la Iguana o lagarto overo (<i>Salvator merianae</i>)	15
	1.2.1 Caracterización biológica.....	15
	1.2.2 Situación poblacional de la iguana overa y programa de conservación de uso sustentable de la especie.....	17
	1.2.3 Distribución geográfica de la iguana overa.....	21
	1.2.4 Amenazas a la especie debidas a la expansión de la frontera agrícola.....	22
	1.3 Sistema inmune. Generalidades	24
	1.3.1 Sistema Inmune Innato y Adaptativo.....	25
	1.3.2 Poblaciones leucocitarias.....	28
	1.3.3 Anticuerpos naturales.....	30
	1.3.4 Sistema del complemento.....	31
	1.3.5 Efectos de plaguicidas sobre el sistema inmune.....	33
	1.4 Sistema endócrino. Generalidades	34
	1.4.1 Niveles de corticosterona como medida de estrés.....	34
	1.4.2 Interacción entre la respuesta al estrés y la respuesta inmune.....	35
	1.5 Hipótesis y objetivos	35
	1.5.1 Hipótesis.....	36
	1.5.2 Objetivo General.....	36
	1.5.3 Objetivos Específicos.....	36
CAPÍTULO	2 Determinación de valores basales de parámetros inmunológicos de <i>S. merianae</i> en diferentes clases etarias.....	37
	2.1 Introducción	38

2.2	Materiales y métodos	39
2.2.1	Descripción de técnicas inmunológicas.....	39
2.2.1.1	Recuento total de glóbulos blancos.....	39
2.2.1.2	Recuento diferencial de glóbulos blancos.....	40
2.2.1.3	Índices Leucocitarios.....	41
2.2.1.4	Detección de anticuerpos naturales.....	43
2.2.1.5	Actividad del sistema del complemento.....	44
2.2.2	Determinación de valores de referencia.....	46
2.2.2.1	Ejemplares utilizados.....	46
2.2.2.2	Toma de muestras.....	48
2.2.2.3	Medición de los índices inmunológicos.....	48
2.2.2.4	Análisis estadísticos.....	49
2.3	Resultados	50
2.4	Discusión	55
CAPÍTULO 3	Evaluación del efecto individual de los plaguicidas Clorpirifos, Cipermetrina y Glifosato, y de su mezcla, sobre el desarrollo embrionario de ejemplares de <i>S. merianae</i>	59
3.1	Introducción	60
3.2	Materiales y métodos	62
3.2.1	Colecta de huevos de <i>Salvator merianae</i>	62
3.2.2	Determinación de las etapas embrionarias en <i>S. merianae</i>	62
3.2.3	Diseño experimental.....	64
3.2.4	Incubación artificial.....	68
3.2.5	Toma de muestras.....	71
3.2.6	Medición de los parámetros inmunológicos.....	71
3.2.7	Medición de tamaños corporales.....	72
3.2.8	Análisis estadísticos.....	72
3.3	Resultados	72
3.3.1	Efectos tóxicos evaluados en embriones provenientes de huevos topicados con plaguicidas aplicados individualmente.....	72
3.3.2	Efectos de los plaguicidas aplicados en mezcla sobre los parámetros inmunológicos.....	76
3.3.3	Efectos de los plaguicidas sobre la duración del desarrollo embrionario y el éxito de eclosión.....	76
3.3.4	Efectos de los plaguicidas sobre el crecimiento.....	78
3.4	Discusión	79
CAPÍTULO 4	Evaluación del efecto de los plaguicidas Clorpirifos, Cipermetrina y Glifosato, aplicados individualmente y en mezcla, sobre parámetros del sistema inmune y endocrino de juveniles de <i>S. merianae</i>	85
4.1	Introducción	86
4.2	Materiales y métodos	87
4.2.1	Ejemplares utilizados.....	87
4.2.2	Compuestos químicos empleados.....	87

4.2.3	Diseño experimental.....	88
4.2.4	Toma de muestras.....	92
4.2.5	Medición de parámetros inmunológicos.....	93
4.2.6	Medición de niveles de corticosterona.....	93
4.2.7	Medición de peso y longitud de los animales.....	94
4.2.8	Análisis estadísticos.....	95
4.3	Resultados	96
4.3.1	Efectos sobre los índices inmunológicos.....	96
4.3.2	Efectos sobre el crecimiento.....	103
4.3.3	Efectos sobre los niveles de corticosterona.....	107
4.3.4	Interacciones entre formulados.....	109
4.4	Discusión	112
CAPÍTULO	Discusión general y conclusiones finales.....	121
5		
5.1	Discusión general.....	122
5.2	Conclusiones finales.....	128
	BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	131
	ANEXO I: PUBLICACIONES VINCULADAS A LA TESIS	
	DOCTORAL.....	155

ÍNDICE DE TABLAS

1.1	Clasificación de plaguicidas en relación a su grado de toxicidad según la OMS (2009).....	5
2.1	Resultados (Media \pm EE) de todas las clases de leucocitos expresados en céls /mm ³ para los distintos grupos de edad de <i>S. merianae</i> . RN: Recién Nacidos; JUV: Juveniles; AD: Adultos.....	53
3.1	Grupos experimentales de <i>S. merianae</i> expuestos a formulaciones de plaguicidas basadas en clorpirifos, cipermetrina y glifosato durante su desarrollo embrionario.....	68
3.2	Grupos experimentales de <i>S. merianae</i> expuestos a formulaciones de plaguicidas basadas en clorpirifos, cipermetrina y glifosato y su mezclas terciaria durante su desarrollo embrionario.....	69
3.3	Número de muertes embrionarias (N° ME); porcentaje de muertes embrionarias por tratamiento (% ME x T) y promedio de días de incubación hasta los nacimientos o decesos registrados por Nido y por grupo experimental de embriones de <i>S. merianae</i> expuestos a diferentes concentraciones de clorpirifos (CPF), cipermetrina (CIP) y glifosato (GLI) respecto a los controles negativo (CN) y de vehículo (CV).....	77
4.1	Cronograma de aplicación de agua / plaguicidas en los recintos control y mezcla, respectivamente.....	93
4.2	Cronograma de aplicación de agua / plaguicidas en los recintos control (CN), expuestos a Glifosato Roundup (GLI-RU) y a Clorpirifos (CPF), respectivamente.....	94
4.3	Cronograma de aplicación de agua / plaguicidas en los recintos control (CN), expuestos a Glifosato Panzer Gold (GLI-PZ) y a Cipermetrina (CIP), respectivamente.....	94
4.4	Comparación del crecimiento en peso y Longitud Hocico Cloaca (LHC) entre animales expuestos a la mezcla GLI-RU + CPF + CIP y controles. Los valores representan la media (\pm EE) de cada grupo.....	106
4.5	Comparación del crecimiento en peso y Longitud Hocico Cloaca (LHC) entre animales expuestos a GLI-RU Y CPF en relación al CN. Los valores representan la media (\pm EE) de cada grupo pre- y post-tratamiento.....	106
4.6	Comparación del crecimiento en peso y Longitud Hocico Cloaca (LHC) entre animales expuestos a GLI-PZ y CIP respecto del CN. Los valores representan la media (\pm EE) de cada grupo pre- y post-tratamiento.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	A) Proporción de la superficie sembrada de cada especie de cereal en relación al área total sembrada en Argentina durante la campaña de 2017/2018. B) Superficie total sembrada de soja en Argentina, medida en hectáreas (h.a.) durante la misma campaña. Extraído del Ministerio de Agricultura (2019).....	2
1.2	Estructura molecular del Glifosato.....	8
1.3	Estructura molecular de Cipermetrina.....	10
1.4	Estructura molecular de Clorpirifos.....	12
1.5	Ejemplares de iguana overa. A) adulto. B) crías.....	15
1.6	Imágenes de nidos y huevos de iguana overa. A) Nido en el interior de un árbol de paraíso (<i>Melia azedarach</i>) seco. B) Detalle de nido de iguana. C) Detalle de huevo de iguana. Barra A)=10 cm; C)= 1 cm.....	17
1.7	A) Recolección de huevos de <i>S. merianae</i> . B) Detalle de huevos marcados dentro de bidón plástico para su traslado a las instalaciones del PI.....	19
1.8	Incubación artificial. A) Bateas plásticas que alojan los huevos en la incubadora, con humedad y temperatura controladas B) Detalle de huevos en bandejas plásticas con base de vermiculita.....	19
1.9	A) y B) Ejemplares neonatos de <i>S. merianae</i>	20
1.10	A) Crianza de ejemplares en bateas plásticas B) Detalle de un ejemplar de iguana overa de aproximadamente 6 meses de edad dentro de las bateas de cría. Barra B)= 10 cm.....	20
1.11	A) y B) Devolución de ejemplares al medio silvestre.....	21
1.12	Distribución de <i>Salvator merianae</i> en América del Sur. Extraído de la Lista Roja de la UICN de especies amenazadas. Versión 2020-1.....	22
1.13	A) Área de distribución de la iguana overa en Argentina. La marca romboidal representa la ubicación del PI (extraído de Schaumburg y col., 2014) B) Área destinada a cultivo de soja en Argentina (Extraído de Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. 200-2010). Nótese la superposición de las áreas en A y B.....	23
1.14	A) Cultivo de soja lindante a la zona de nidificación de la iguana overa. B) Nido en el interior del árbol de paraíso (<i>Melia azedarach</i>) en A.....	24
1.15	Inmunidad innata y adaptativa. La cinética de las respuestas inmunes innatas y adaptativas son aproximaciones y pueden variar en diferentes infecciones. Extraído de Abbas y col. (2011).....	28
1.16	Vías de activación del complemento. La activación del SC puede iniciarse por tres vías distintas. Se muestran las funciones de las principales proteínas producidas en diferentes etapas. Extraído de Abbas y col. (2011).....	33
2.1	Cámara de Neubauer.....	41
2.2	A) Representación esquemática de las cuadrículas dentro de la cámara de Neubauer. Puede observarse los cuatro cuadrantes externos (flechas). B) detalle de GB refringentes en dos cuadrados pequeños de un cuadrante. Barra A)= 1mm; B)= 10µm.....	42
2.3	Extendido sanguíneo de <i>S. merianae</i> coloreado con May-Grunwald-	

	Giemsa, para determinación del Índice de Lobularidad (IL) mediante el conteo de lóbulos nucleares por heterófilo. Flechas: Heterófilos con dos y tres lóbulos respectivamente. Barra= 10 μ m.....	43
2.4	Porción de microplaca en la cual se puede observar en los diferentes pocillos, los procesos de lisis y aglutinación.....	45
2.5	Tubos Eppendorf con plasma de Iguana +solución de SBRC. A la izquierda, sedimentación de SBRC. A la derecha, presencia de CAM: Complejo de Ataque a Membrana.....	46
2.6	Microplaca cargada con diferentes diluciones de SBRC + plasma de iguana. En la última fila a la derecha se encuentra el control positivo (Triton X-100).....	47
2.7	A) Ubicación de la Laguna "El Fisco" considerada como Reserva natural controlada (provincia de Santa Fe, Argentina) donde se recolectaron huevos de <i>S. merianae</i> . B) detalle de ubicación de la laguna (puntero).....	48
2.8	Ilustración del patrón de manchas ventrales únicas e irrepetibles en cada ejemplar de <i>S. merianae</i> . A) Adulto). B) Recién Nacido. Barra A)= 10 cm; B= 1 cm.....	49
2.9	Extracción de sangre, a partir de la vena caudal, en un ejemplar adulto.....	50
2.10	Leucocitos de <i>S. merianae</i> . (A, B): Heterófilos; (C): Eosinófilo; (D): Basófilo; (E): Monocito y (F): Linfocito grande. Flechas continuas: núcleo; flechas discontinuas: citoplasma. Barra= 10 μ m (aplicable a todas las figuras).....	51
2.11	Eosinófilos/mm ³ en cada clase de edad. RN (recién nacidos), JUV (juveniles), AD (adultos). Los valores que se muestran son medias (\pm EE) de 12 iguanas / grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	52
2.12	Basófilos/mm ³ en cada clase de edad. RN (recién nacidos), JUV (juveniles), AD (adultos). Los valores que se muestran son medias (\pm EE) de 12 iguanas / grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	53
2.13	Títulos de AcN en cada clase de edad. RN (recién nacidos), JUV (juveniles), AD (adultos). Los valores se muestran como la media (\pm EE) de 12 iguanas / grupo. *Estadísticamente significativo.....	54
2.14	Porcentaje máximo de hemólisis (% MH) en cada clase de edad. RN (Recién Nacidos), JUV (juveniles), AD (adultos). Los valores mostrados son medias (\pm EE) de 12 iguanas / grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	55
3.1	Imágenes ilustrativas de embriones de <i>Salvator merianae</i> en vistas laterales. A) Día 4 y B) Día 5. La barra de escala representa 1 mm.Las fotos son cortesía de la Dra. Josefina L. lungman.....	64
3.2	Imágenes ilustrativas de embriones de <i>Salvator merianae</i> en el día 33. A) Cabeza lateral derecha. B) detalle de miembro posterior derecho. Barras: 1 mm. (C: garras; TC, cornificación). Extraídas de lungman y col. (2019)....	65
3.3	A) Aplicación tópica de plaguicidas en la superficie superior vascularizada de los huevos. B) detalle de la aplicación.....	66
3.4	A) huevos sobre base de vermiculita en bandejas plásticas, envueltos en tules de distintos colores para identificar los diferentes nidos. B) Ejemplar	

	de <i>S. merianae</i> nacido dentro de una bolsa de tul.....	71
3.5	Extracción de sangre desde la vena caudal de individuo recién nacido de <i>S. merianae</i>	72
3.6	Heterófilos/mm ³ por tratamiento en organismos expuestos a los 33 días de desarrollo. Control de vehículo (CV); Control negativo (CN); Clorpirifos (CPF) 10,100, 1000 µg / huevo; Cipermetrina (CIP) 10, 100, 1000 µg / huevo; Glifosato Roundup (GLI-RU) 200, 400, 800 µg / huevo. Los valores corresponden a la media (± EE) de cada uno de los grupos. *Estadísticamente significativo respecto del control correspondiente ($p < 0,05$).....	74
3.7	Linfocitos/mm ³ por tratamiento en organismos expuestos a los 33 días de desarrollo. Control de vehículo (CV); Control negativo (CN); Clorpirifos (CPF) 10, 100, 1000µg / huevo; Cipermetrina (CIP) 10, 100, 1000 µg / huevo; Glifosato Roundup (GLI-RU) 200, 400, 800µg / huevo. Los valores corresponden a la media (± EE) de cada uno de los grupos. *Estadísticamente significativo respecto del CN ($p < 0,05$).....	75
3.8	Índice de Heterófilos/Linfocitos (H/L) por tratamiento en organismos expuestos a los 33 días de desarrollo. Control de vehículo (CV); Control negativo (CN); Clorpirifos (CPF) 10, 100, 1000µg / huevo; Cipermetrina (CIP) 10, 100, 1000 µg / huevo; Glifosato Roundup (GLI-RU) 200, 400, 800µg / huevo. Los valores corresponden a la media (± EE) de cada uno de los grupos. *Estadísticamente significativo respecto del CN ($p < 0,05$)....	76
3.9	Títulos de anticuerpos naturales (AcN) por tratamiento en organismos expuestos a los 33 días de desarrollo. Los valores corresponden a la media (± EE) de cada uno de los grupos. Control de vehículo (CV); Control negativo (CN); Clorpirifos (CPF) 10, 100, 1000µg / huevo; Cipermetrina (CIP) 10, 100, 1000 µg / huevo; Glifosato Roundup (GLI-RU) 200, 400, 800µg / huevo. *Estadísticamente significativo respecto del CV ($p < 0,05$)...	77
3.10	Títulos de anticuerpos naturales (AcN) en organismos expuestos a los 3-5 días de desarrollo. Los valores corresponden a la media (± EE) de cada uno de los grupos. Control de vehículo (CV); Control negativo (CN); Clorpirifos (CPF) 10, 100 µg / huevo; Cipermetrina (CIP) 10, 100 µg / huevo; Glifosato Panzer Gold (GLI-PZ) 200, 400, 800µg / huevo; Glifosato Roundup (GLI-RU) 200, 400, 800 µg / huevo; MEZCLA (CPF/CIP/GLI-RU). *Estadísticamente significativo respecto del CN ($p < 0,05$).....	78
4.1	A) Recintos cubiertos con trama pequeña para evitar el escape de los animales. B) Detalle de juveniles de Iguana overa en el interior de un recinto.....	91
4.2	Modelo de traje, máscara de fumigación, protectores oculares, guantes y botas de protección utilizados para la fumigación de los recintos.....	92
4.3	Pesado de juvenil de iguana overa en balanza electrónica.....	96
4.4	Medición de longitud hocico-cloaca de un juvenil de iguana overa.....	97
4.5	Comparación de los Índices de Lobularidad (IL) entre los animales del grupo control (CN) y tratados con MEZCLA de plaguicidas (GLI-RU + CPF + CIP). Los valores corresponden a la media (± EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	99

4.6	Comparación de los títulos de anticuerpos naturales (AcN) entre los grupos animales del grupo control (CN) y tratados con MEZCLA de plaguicidas (GLI-RU + CPF + CIP). Los valores corresponden a la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	100
4.7	Índice de Heterófilos/Linfocitos (H/L) por tratamiento en organismos expuestos a Glifosato Roundup (GLI-RU) y a Clorpirifos (CPF) en relación al control negativo (CN). Los valores responden a la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	101
4.8	Leucocitos/mm ³ por tratamiento en organismos expuestos a Glifosato Panzer Gold (GLI-PZ) y a Cipermetrina (CIP) en relación al control negativo (CN). Los valores responden a la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	102
4.9	Linfocitos/mm ³ por tratamiento en organismos expuestos a Glifosato Panzer Gold (GLI-PZ) y a Cipermetrina (CIP) en relación al control negativo (CN). Los valores responden a la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	103
4.10	Índice de Heterófilos/Linfocitos (H/L) por tratamiento en organismos expuestos a Glifosato Panzer Gold (GLI-PZ) y a Cipermetrina (CIP) en relación al control negativo (CN). Los valores responden a la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	103
4.11	Índice de Lobularidad por tratamiento en organismos expuestos a Glifosato Panzer Gold (GLI-PZ) y a Cipermetrina (CIP) en relación al control negativo (CN). Los valores responden a la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	104
4.12	Títulos de anticuerpos naturales (AcN) por tratamiento en organismos expuestos a Glifosato Panzer Gold (GLI-PZ) y a Cipermetrina (CIP) en relación al control negativo (CN). Los valores responden a la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	104
4.13	Actividad del Sistema de Complemento (SC) por tratamiento en organismos expuestos a Glifosato Panzer Gold (GLI-PZ) y a Cipermetrina (CIP) en relación al control negativo (CN). Los valores responden a la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	105
4.14	Comparación de los incrementos en Longitud Hocico Cloaca (LHC) entre animales expuestos a Glifosato Roundup (GLI-RU) y a Clorpirifos (CPF) en relación al control negativo (CN). Los valores representan la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	107
4.15	Comparación de los incrementos en peso entre animales expuestos a Glifosato Panzer Gold (GLI-PZ) y a Cipermetrina (CIP) en relación al control negativo (CN). Los valores representan la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	108
4.16	Comparación de los incrementos en Longitud Hocico Cloaca (LHC) entre animales expuestos a Glifosato Panzer Gold (GLI-PZ) y a Cipermetrina (CIP) en relación al control negativo (CN). Los valores representan la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	109
4.17	Comparación de los niveles de corticosterona de los animales expuestos a la mezcla de plaguicidas (GLI-RU + CPF + CIP) en relación al control negativo (CN). Los valores representan la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	110

4.18	Comparación de los niveles de corticosterona de los animales expuestos a las formulaciones individuales de Glifosato Roundup (GLI-RU) y Clorpirifos (CPF) en relación al Control Negativo (CN). Los valores representan la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).....	111
-------------	---	------------

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AcN: Anticuerpos naturales

AChE: acetilcolinesterasa

ACTH: hormona adrenocorticotrópica

AD: adultos

ANOVA: análisis de la varianza

Ac: anticuerpo

Ag: antígeno

AT: aumentos totales

BCR: por su sigla en inglés: *B-cell receptor*; receptores de células B (linfocitos del bazo).

°C: grados celsius

CAES: Comité de Ética y Seguridad

CAM: Complejo de Ataque de Membrana

CAS: por su sigla en inglés: *Chemical Abstracts Service*; servicio de resúmenes de químicos

CASAFE: Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes

cél: células

CIP: Cipermetrina

CL: concentración letal media

CN: control negativo

cm: centímetros

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

CPA: células presentadoras de antígeno

CPF: Clorpirifos

CRH: corticotropina

CV: control vehículo

E.E.: Error Estándar

EPSP: por su sigla en inglés: *enzyme 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthetase*: enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa

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

g: gramos

GB: glóbulos blancos

GC: glucocorticoides

GLI: Glifosato

GLI-PZ: Glifosato Panzer Gold®

GLI-RU: Glifosato Roundup Full II®

h.a.: hectárea

H/L: índice de Heterófilos / Linfocitos

HPI: eje hipotalámico-pituitario-inter-renal

IARC: por su sigla en inglés: *International Agency for Research on Cancer*. Agencia Internacional de Investigación de Cáncer

IC: índice de Correlación

Ig: Inmunoglobulinas

IgA, IgG, IgM: Inmunoglobulinas de los isotipos A, G y M respectivamente.

IL: Índice de Lobularidad

JUV: Juveniles

kg: kilogramos

km: kilómetros

l: litros

L: Linfocitos

LB: Linfocitos provenientes del Bazo

LT: Linfocitos provenientes del Timo

LBZM: Linfocitos de la Zona Marginal del Bazo

LHC: Longitud Hocico-Cloaca

MH: Máxima Hemólisis

ml: mililitros

mm: milímetros

mm³: milímetros cúbicos

NaCl: cloruro de sodio

NK: por su sigla en inglés: *Natural Killer*: células naturales asesinas

OMS: Organización Mundial de la Salud

OP: organofosforados

p.a: principio activo

PBS: por su sigla en inglés: *Phosphate Buffered Saline*

PI: Proyecto Iguana

RDGB: Recuento Diferencial Glóbulos Blancos

RN: Recién Nacidos

RIA: por su sigla en inglés *Immunoassay Technique*: Técnica de Inmunoensayo

RRBC: por su sigla en inglés *Rabbit Red Blood Cells*: Glóbulos Rojos de Conejo

RTGB: Recuento Total Glóbulos Blancos

SC: Sistema del Complemento

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SGRC: Solución Glóbulos Rojos de Conejo

SI: Sistema Inmune

SIA: Sistema Inmune Adaptativo o Específico

SII: Sistema Inmune Innato o Inespecífico

SIC: el eje de la simpaticocromafina

SE: Sistema Endócrino

SRBC: por su sigla en inglés: *sheep red blood cells*, glóbulos rojos de oveja

TCR: por su sigla en inglés *T-cell receptor*: receptor de células T (linfocitos del timo).

TRH: hormona tiroides

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

μl: microlitros

μm: micrometros

UNL: Universidad Nacional de Litoral

USEPA: por su sigla en inglés *United States Environmental Protection Agency*:
Agencia de Protección Ambiental.

CAPÍTULO 1

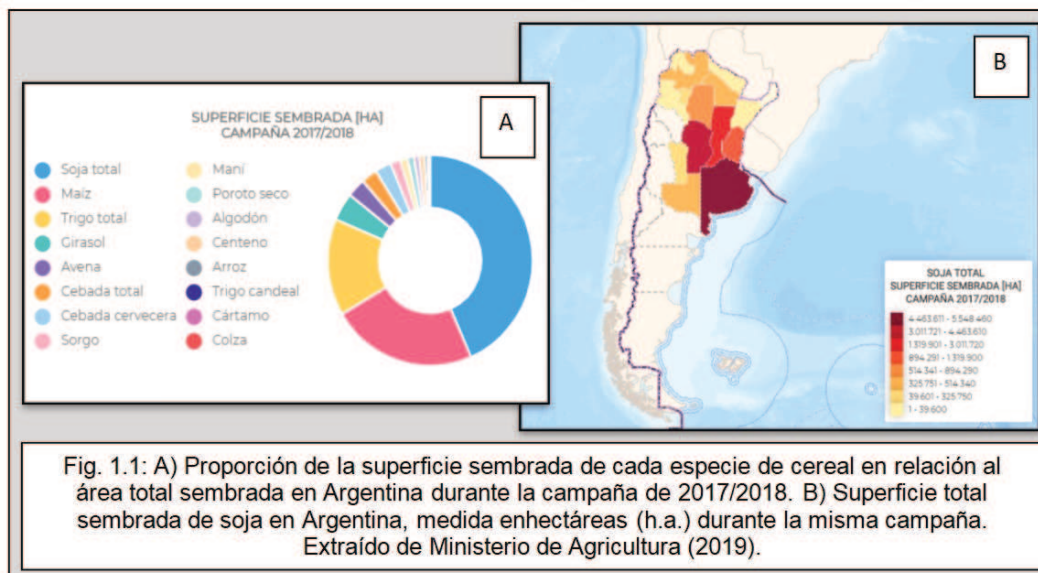
Introducción general



1.1 Plaguicidas

1.1.1 Problemática ambiental

En Argentina, y en la provincia de Santa Fe, se desarrolla una importante actividad agrícola y la cantidad de hectáreas cultivadas en los últimos años se ha incrementado debido a la implementación de un sistema en el que prevalecen intereses productivos por sobre la preservación ambiental. Esta expansión de la frontera agrícola produce una constante fragmentación del hábitat debido a la deforestación y la degradación de parches ecológicos, con severas consecuencias para la biodiversidad (Poletta y col., 2011a). En la actualidad, la producción agraria desarrolla una serie de procesos que han sido modificados significativamente; por lo cual, las maneras de producir, elaborar, distribuir, comercializar, almacenar y procesar los alimentos, son muy diferentes respecto de algunas décadas atrás. Cada vez más, la agricultura se hace dependiente de otras actividades económicas como, por ejemplo, de las actividades industriales que le proporcionan insumos –plaguicidas y fertilizantes– y el posterior procesamiento de la producción (Souza Casadinho, 2019). El uso de plaguicidas se ha incrementado en las últimas décadas en la misma medida en que la agricultura se transformó gradualmente en un sistema de alta tecnología, para satisfacer las crecientes demandas de la población (Heinemann y col., 2013). En la última temporada, el cultivo de soja en el país aumentó a más de 20 millones de hectáreas representando cerca de la mitad de la cosecha total y del área cultivada (Fig. 1.1 A y B) liberándose al medio ambiente 200 millones de litros de plaguicidas (Bolsa de Cereales de Buenos Aires, 2019).



Esta expansión agrícola provocó cambios en el uso de la tierra en varias regiones del país, lo cual implicó una importante pérdida de hábitat para la flora y fauna nativas.

Por otro lado, aún se desconocen los potenciales daños que los millones de litros de plaguicidas liberados al ambiente natural pueden haber producido sobre los organismos no blanco. Además, estos productos son generalmente utilizados en soluciones preparadas junto a otras sustancias donde muchas veces los coadyuvantes son más nocivos que los principios activos declarados. Estos formulados generalmente, no son aplicados individualmente sino combinados, constituyendo mezclas químicas complejas y variables, aumentando muchas veces su toxicidad y dificultando los estudios pertinentes para implementar su debido control. En este sentido, se ha sugerido que las combinaciones de plaguicidas deben considerarse como un grupo importante de nuevos factores estresantes para el ambiente (Lydy y col., 2004).

Particularmente, Santa Fe es una de las provincias productoras agrícola-ganaderas más importantes del país (Di Fiori y col., 2012). Además, al igual que en el resto del país, si bien los mayores cultivos en esta provincia son de soja, también existen grandes áreas con cultivos de maíz, trigo, girasol y sorgo (Ministerio de Agricultura, 2019). En las últimas décadas, el desarrollo de la agricultura fue ocupando superficies cada vez más extensas destinadas a monocultivos. Cuando estos sitios comenzaron a no ser suficientes por las demandas comerciales, la superficie disponible de suelos fértiles se fue volviendo escasa en la provincia, promoviendo la intensificación (aumento del rendimiento productivo) de la superficie en uso. Este aprovechamiento intensivo fue y es posible a través de paquetes tecnológicos que incluyen el consumo de grandes cantidades de agroquímicos, lo que ha traído como consecuencia la aparición de malezas resistentes, especialmente al glifosato. Esto conlleva a la realización de un número mayor de aplicaciones de agroquímicos con aumento de las dosis empleadas (Vila-Aiub y col., 2008), la rotación de herbicidas, el incremento de poblaciones de insectos perjudiciales, y el descenso en número de los benéficos (Souza Casandinho y col., 2008).

1.1.2 Definición y clasificación de plaguicidas

Definición:

El artículo 2° del Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas (FAO, 1990) los define como: cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o

animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas o de madera, así como de alimentos para animales, que pueden ser administrados para combatir insectos, arácnidos u otras plagas. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte (del Puerto Rodríguez y col., 2014).

Los plaguicidas se comercializan generalmente en formulaciones líquidas o sólidas (que incluyen el principio activo + coadyuvantes + solventes) dependiendo de la solubilidad en agua del ingrediente activo que contengan y de su forma de aplicación. Los envases de estos productos poseen etiquetas que contienen tres nombres: el nombre químico, el común y el comercial. Además, en la etiqueta también se indica la cantidad de ingrediente activo en porcentaje y en gramos por litro o kilogramo del producto comercial. Según Villaamil Lepori y col. (2013) ya la cantidad de principios activos existentes hasta esa fecha, demostraban la existencia de aproximadamente 1500 que, en distintas mezclas y concentraciones, integraban más de 50.000 productos registrados en el mundo como plaguicidas. Sin embargo, no se brinda información acerca de los coadyuvantes y solventes que conforman las formulaciones, los cuales, muchas veces resultan más riesgosos que el propio principio activo para la salud humana y del ecosistema.

Un aspecto relacionado con la problemática ambiental que representa el uso de plaguicidas es su persistencia en el suelo, que puede afectar a los propios cultivos; o bien, ser arrastrados por las corrientes de agua, donde la cantidad y la distancia del desplazamiento de los plaguicidas dependen de sus características químicas, de la intensidad, duración y frecuencia de riego, y de la precipitación pluvial, entre otros factores (Chiaia-Hernandez y col., 2017). En este sentido, es importante señalar que muchas sustancias resultantes de la descomposición de un plaguicida pueden ser también tóxicas y tener una persistencia significativa en el ambiente.

Los resultados de investigaciones realizadas recientemente no dejan dudas sobre el riesgo de contaminación ambiental que representan algunos plaguicidas, ya sea por deriva durante su aplicación o por los flujos de lixiviación, lo que genera riesgos para la biota acuática y los seres humanos. Esto fue especialmente descrito en nuestro país para los plaguicidas clorpirifos, cipermetrina y glifosato (Davico y col., 2020; Agost y Velázquez, 2020; Odetti y col., 2020). Estos formulados requieren de un seguimiento estricto tanto por su categoría toxicológica como por su alto impacto en el medio

ambiente, por lo que su uso debe estar correctamente monitoreado en base a un diagnóstico preciso de impacto ambiental.

Clasificación:

Desde un punto de vista ambiental, la clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su grado de toxicidad resulta particularmente importante. Según esta codificación, los plaguicidas pueden agruparse en las siguientes clases según la última actualización de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2009; tabla 1.1):

Tabla 1.1: clasificación de plaguicidas en relación a su grado de toxicidad según la OMS (2009)					
Clase		LD50 para ratas (mg / kg de peso corporal)			
		Vía Oral		Vía Dérmica	
		Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia	Extremadamente peligroso	5 o menos	20 o menos	10 o menos	40 o menos
Ib	Altamente peligroso	5 - 50	20 - 200	10-100	40 - 400
II	Moderadamente peligroso	50 - 500	200 - 2000	100-1000	400 - 4000
III	Ligeramente peligroso	Más de 500	Más de 2000	Más de 1000	Más de 4000

Esta clasificación se basa principalmente en la toxicidad por vía oral y vía dérmica, de los compuestos, en ratas y ratones. Usualmente la dosis se registra como el valor de la Dosis Letal Media (DL50), que es la requerida para matar al 50 % de la población de animales de prueba y se expresa en términos de mg/kg del peso del animal. También es frecuente el uso de la Concentración Letal Media (CL50) para el mismo fin (del Puerto Rodríguez y col., 2014).

Otra de las codificaciones encontradas con frecuencia en la literatura internacional está basada en la composición de los diferentes ingredientes activos usados como plaguicidas (herbicidas, insecticidas, entre otros), que resulta en una clasificación según su familia química. Así, por ejemplo, los que están dentro de una familia química tienen propiedades químicas similares y generalmente tienen el mismo modo de acción. Este último, es definido como la secuencia de eventos que ocurren desde la

absorción del plaguicida hasta su efecto en el organismo blanco, constituyendo otra forma de clasificación dentro de los plaguicidas. Según esta clasificación, los herbicidas podrían actuar: rompiendo membranas celulares, inhibiendo el crecimiento de las plántulas, la fotosíntesis o la síntesis de aminoácidos, lípidos o pigmentos, entre otros. En el caso de insecticidas, el modo de acción se relaciona con su función como agentes neuroactivos a través de la inhibición de la acetilcolinesterasa por ejemplo, como inhibidores metabólicos mediante el bloqueo de la actividad de la oxidasa de función mixta o de fosforilaciones oxidativas desacopladoras, entre otros.

No obstante, la forma más común de clasificar a los plaguicidas es según la plaga a la que atacan (Espinosa Machuca y col., 2018). De esta manera, y como ya se ha podido notar en los párrafos anteriores, la codificación que refiere a su función específica para un organismo blanco determinado, divide a los plaguicidas en herbicidas, insecticidas, fungicidas, entre otros. Debajo se describen los grupos de plaguicidas analizados en esta tesis según esta clasificación (herbicidas e insecticidas) así como los compuestos empleados incluidos en cada uno de ellos (glifosato y clorpirifos/cipermetrina respectivamente).

1.1.2.1 Herbicidas

La “maleza”, entendida como vegetación no deseada en un cultivo, puede ser controlada de diferentes formas. El control químico de la maleza se realiza por medio de la aplicación de herbicidas, que son productos que inhiben o interrumpen el crecimiento y desarrollo de una planta, y es una de las principales herramientas que se utilizan en la agricultura moderna.

Los herbicidas, además de por su grado de toxicidad (clase toxicológica), familia química y modo de acción, pueden ser clasificados de acuerdo a la época de aplicación, selectividad, y tipo de acción.

Época de aplicación.

-Presiembra: se dividen entre los que impactarán sobre la superficie foliar o el suelo. Son aplicados antes de la siembra.

-Preemergentes: se aplican después de la siembra, pero antes de que emerjan la maleza y el cultivo. Este tipo de herbicidas elimina a las malas hierbas durante la germinación o recién emergidas, lo que evita la competencia temprana con el cultivo.

-Post-emergentes: se aplican después de la emergencia del cultivo y la maleza. En la mayoría de los casos, su aplicación debe realizarse sobre la maleza en sus primeros estados de desarrollo cuando ésta es más susceptible y su competencia con el cultivo

es mínima. Su actividad depende de factores como su grupo químico, su selectividad, especies de maleza presentes, y condiciones climáticas.

Selectividad.

-Selectivos: son aquellos que en ciertas dosis, formas y épocas de aplicación eliminan a algunas plantas sin dañar significativamente a otras.

-No selectivos: son los que ejercen su toxicidad sobre toda clase de vegetación y deben utilizarse en terrenos sin cultivo o bien evitar el contacto con las plantas cultivadas.

Tipo de acción:

-De contacto: eliminan sólo las partes de la planta con las que entran en contacto por lo que requieren de un buen cubrimiento de la maleza para controlarla y tienen un transporte limitado dentro de la planta (control de maleza anual).

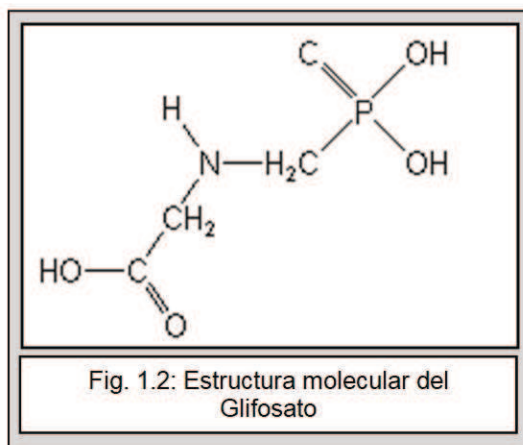
-Sistémicos: herbicidas que se aplican al suelo o al follaje y son absorbidos y transportados a toda la planta incluyendo sus raíces y otros órganos subterráneos (control de maleza perenne).

1.1.2.1.1 Glifosato

Entre los organofosforados, el glifosato (GLI) es el más utilizado en la agricultura a nivel mundial, razón por la cual fue el herbicida seleccionado para su análisis en esta tesis.

En el 2015 la OMS, así como la Agencia Internacional de Investigación de Cáncer (IARC, del inglés: *International Agency for Research on Cancer*), clasificaron al glifosato como probable carcinógeno, pero en el 2017 la Agencia Europea de sustancias y mezclas químicas decidieron prolongar 5 años más la licencia de su uso (Andert y col., 2019). Actualmente este producto aún se encuentra dentro de la clasificación III, como ligeramente tóxico (Ver tabla 1.1; apartado 1.1.2).

Es un herbicida de amplio espectro, de aplicación post-emergente y no selectivo, que no contiene acción residual ya que es absorbido rápidamente por el suelo. Es un derivado del aminoácido glicina, con ácido fosfórico unido al radical amino (Fig. 1.2), comúnmente usado en forma de sal isopropilamina.



Es utilizado ampliamente para control de malezas perennes con reproducción vegetativa, transportándose a toda la planta por ser altamente sistémico. El mecanismo de acción del GLI (N-fosfonometil glicina; CAS (*Chemical Abstracts Service*): 1071-83-6) es la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa EPSP por su sigla en inglés) que cataliza la formación de un precursor de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en vegetales (Nissen y col., 2004). Las plantas tratadas con este herbicida presentan clorosis, que se transforma en necrosis general en unas dos semanas posteriores a la aplicación.

Hace ya varios años, se han desarrollado cultivos transgénicos que contienen una enzima alternativa de esta EPSP, que resultan resistentes al glifosato (Peterson y col., 2001). Esta resistencia inducida al glifosato se debe a la inserción de genes de resistencia en el genoma de la planta, los cuales provienen de una cepa bacteriana del suelo, que codifican para la enzima CP4-EPSPS. Esta posee una secuencia de aminoácidos ligeramente diferente a la EPSPS natural de las plantas, que evita que el glifosato pueda unirse al complejo EPSPS-S3P formado durante la ruta metabólica del shikimato, aunque permite que la enzima catalice normalmente las reacciones de síntesis de aminoácidos aromáticos (Hernández-Ríos y col., 2018).

1.1.2.2 Insecticidas

Como su nombre lo indica, los insecticidas son plaguicidas de origen químico, sintéticos o naturales, destinados a destruir, controlar o neutralizar la acción de insectos considerados perjudiciales para los cultivos, salud humana o animal. El mayor volumen de insecticidas utilizados en Argentina se aplica en cultivos de soja. Luego, en barbechos químicos, en maíz, trigo, girasol, arroz y pasturas, en orden decreciente.

Finalmente, el 15% restante se aplica en hortalizas, frutales de pepita, papa, poroto y tabaco.

Es conocido el uso innecesario de insecticidas que se realiza ante la mínima presencia o incluso ausencia de la plaga en los barbechos químicos (Espinosa Machuca 2018). Esto no sólo atenta contra la fauna benéfica, sino que puede generar el resurgimiento de plagas o inducir la aparición de razas resistentes (Aragón y Flores, 2006; Leiva, 2013) lo que provoca que al cabo de algunos años el producto sea ineficiente, aún a dosis más elevadas o aplicaciones más frecuentes (Claus y Spanoghe, 2020).

En analogía con las clasificaciones de los herbicidas, existen insecticidas específicos que son utilizados según la época en que se requiera su aplicación. El momento de aplicación de los insecticidas depende de la plaga que se quiera controlar y de las preferencias alimenticias de estos insectos. De esta manera, aquellos insecticidas utilizados para controlar insectos que se alimentan de semillas, de raíces y/o tallos son aplicados antes de la foliación, mientras que aquellos usados para los que se alimentan de hojas (orugas por ejemplo) se aplican comúnmente post-foliación. Otros insecticidas, por otra parte, son utilizados para controlar las plagas dominantes que causan perjuicio durante la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos o materiales, y son aplicados después de la cosecha.

En relación con la selectividad, podemos encontrar insecticidas no selectivos que pueden actuar sobre diferentes insectos que son comúnmente llamados de “amplio espectro”, así como insecticidas selectivos, que son específicos para determinados tipos de plagas y se usan, por ejemplo, en cultivos donde se necesitan preservar los polinizadores.

Finalmente, si consideramos la clasificación relacionada al tipo de acción en esta clase de plaguicidas, consistiría en la evaluación de las diferentes vías de ingreso del insecticida en el insecto. Éstas pueden ser:

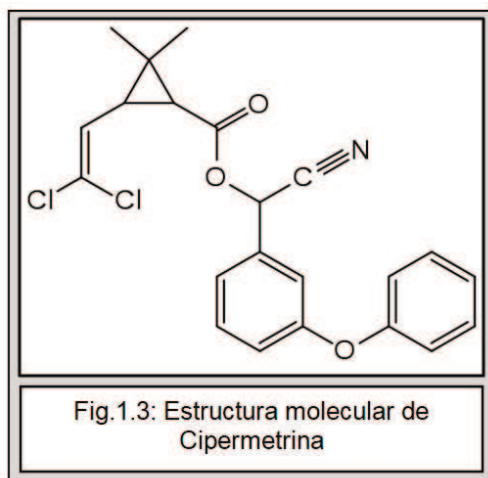
-Contacto o dérmica: el insecticida entra en contacto directamente con el insecto. Esto puede darse de dos maneras: las gotas del producto aplicado caen sobre el insecto, cuando está suficientemente expuesto, o bien el insecto toma contacto con el producto en su desplazamiento sobre las hojas mojadas. (Ej. cipermetrina, lambdacialotrina).

-Ingestión: una vez que el insecticida tomó contacto con la planta y se incorporó en los tejidos de la misma, el insecto muere al ingerir o consumir estas hojas (Ej. metoxifenocida, clorantpriliprole, flubendiamide, imidaclopid).

-Inhalación o respiratoria: los productos con alta presión de vapor pueden penetrar por las vías respiratorias del insecto (Ej. clorpirifos).

1.1.2.2.1 Cipermetrina

La cipermetrina ((R, S)-alfa-ciano-3-fenoxibenzil(1RS)-cis, trans-3-(2,2-diclorovinil) 2,2-Dimetilciclopropano - carboxilato) es un plaguicida sintético de la familia de los piretroides, por tener como base estructural el piretro extraído de flores de crisantemo. Presenta ocho isómeros, tiene un peso molecular de 416,31 g y su fórmula molecular es C₂₂H₁₉Cl₂NO₃ (Fig. 1.3).



La cipermetrina es uno de los insecticidas más usados para controlar una gama amplia de insectos como lepidópteros, coleópteros y hemípteros. Es un compuesto neurotóxico que actúa bloqueando el axón nervioso. En esencia, los piretroides modulan los canales de sodio, provocando repetitivas descargas nerviosas, ocasionando parálisis y muerte (Ware 2000).

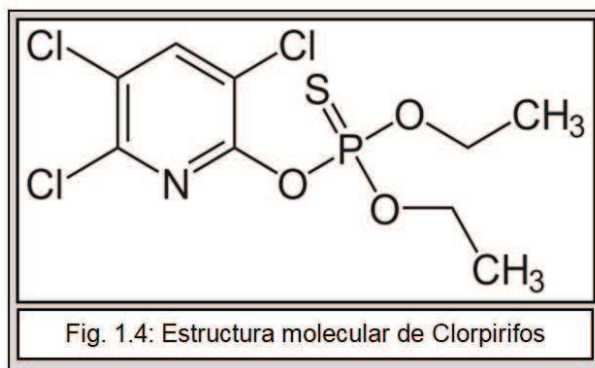
Según la OMS y la USEPA (Agencia de Protección Ambiental, del inglés: *United States Environmental Protection Agency*) este insecticida está clasificado como “moderadamente peligroso” (clase II; ver tabla 1.1); sin embargo, estudios recientes muestran que los efectos de la cipermetrina, y de los piretroides en general, en la salud pueden ser más severos de lo que indican las evaluaciones toxicológicas previas (Abdou y Sayed 2019). Se han reportado aumentos en las dosis y las aplicaciones en frecuencias innecesarias, así como la utilización incorrecta de las formulaciones, lo que convierte a estas sustancias en un riesgo potencial para la salud humana (Cardona y col., 2011). Una vía de ingreso para el hombre, peligrosa y poco considerada, podría ser a través de la cadena alimenticia, por consumo de animales de pastura, los cuales ingieren diariamente más del 10% de pasturas en relación con su propio peso (Loaiza y col., 2005).

A nivel ambiental, el uso desmedido de este piretroide genérico en aplicaciones junto a la segunda aplicación de herbicidas, con nula o baja presencia poblacional de orugas (su principal organismo blanco), ha provocado no solo mayores niveles de infestación por parte de las orugas (Flores, 2011) sino una disminución de sus enemigos naturales (Massaro y col., 2005). Esta problemática se agrava aún más si consideramos que la cipermetrina es el principal insecticida aplicado actualmente en cultivos (principalmente de soja) en Argentina, y ya en 2011 se habían cuantificado 150 g de ingrediente activo por hectárea, representando ya en ese momento, alrededor de 2300 toneladas anuales liberadas, de este insecticida, al ambiente (Mugni y col., 2011).

Tiene amplitud de usos en tratamientos durante y después de la cosecha. También es utilizada en el almacenamiento de comida y de manera extensiva para plagas domésticas. La cipermetrina tiene persistencia moderada en suelos y se degrada más rápidamente en aquellos suelos con bajo contenido de materia orgánica. Al contar con una muy baja solubilidad y baja presión de vapor, es adsorbida y asociada más fácilmente al material particulado de ambientes acuosos. Así, ha sido detectada en cantidades muy superiores a las “tolerables” o permitidas en diferentes cuerpos de agua en Argentina (Jergentz y col. 2004a, 2004b, 2005; Marino y Ronco, 2005). También ha sido identificada como el plaguicida prevalente en zonas urbanas (Bonansea y col., 2013), lo cual es esperable debido a su uso indiscriminado para plagas domésticas, como se mencionaba anteriormente.

1.1.2.2.2 Clorpirifos

El clorpirifos (O, O-dietil O-(3, 5, 6-tricloro-2-piridil) fosforotioato / CAS 2921-88-2) pertenece a la clase de plaguicidas del tipo de los organofosforados (OP), de amplio uso en la agricultura como insecticida y acaricida. Su clasificación toxicológica es de moderadamente tóxico (clase II; ver tabla 1.1) y su fórmula molecular es $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ (Fig.1.4).



Las vías de ingreso de este insecticida son: por contacto, ingestión y/o inhalación y su principal órgano objetivo es el sistema nervioso central y periférico. La capacidad del metabolito clorpirifos-oxon para inhibir la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (AChE), da como resultado una disminución del neurotransmisor por degradación (en acetilcolina) y, en consecuencia, una sobreestimulación del sistema nervioso (Eaton y col., 2008; Krieger, 2010).

El comportamiento ambiental del clorpirifos está relacionado a sus características físicas que incluyen su tendencia a volatilizarse, una presión de vapor moderada, baja solubilidad en agua y buena asociación con el sedimento. Estos factores conllevan a una persistencia moderada en suelos y bajos valores de vida media en agua.

1.1.3 Antecedentes de efectos tóxicos provocados por plaguicidas sobre las especies silvestres y el estudio de éstas como especies centinelas.

Independientemente de sus beneficios para la producción, es evidente que los plaguicidas son sustancias químicas deliberadamente tóxicas, creadas para interferir en algún sistema biológico en particular, pero muchas veces con efectos colaterales indeseados (Schaaf, 2016). Diversos estudios han demostrado una variada gama de efectos tóxicos sobre diferentes organismos vivos, incluyendo animales invertebrados y vertebrados (incluido el hombre), así como plantas terrestres y acuáticas, organismos unicelulares, etc. Estos estudios, realizados por investigadores de diferentes disciplinas de las ciencias biológicas, han demostrado los efectos tóxicos de los plaguicidas analizando diferentes parámetros bioquímicos, orgánicos, inmunológicos, genéticos, entre otros. Por citar sólo algunos de los más actuales, se han encontrado efectos tóxicos de algunos organofosforados en mamíferos (Mitra y col., 2019); de los compuestos mancozeb y fipronil en ratones (Banoy Mohant, 2020); del endosulfan sobre diferentes especies (Téllez-Bañuelos y col., 2016); de los

compuestos metil mancozeb, clorotalonil y tiofanato sobre células de macrófagos murinos (Weis y col., 2019) y de glifosato sobre ejemplares del pez *Cnesterodon decemmaculatus* (Carvalho y col., 2020) y sobre el cangrejo *Eriocheir sinensis* (Yang y col., 2019).

El entorno natural de los animales silvestres ha sido sustancialmente modificado por la acción humana, especialmente vinculada a la expansión de la frontera agrícola, con la implementación de paquetes tecnológicos dominados fuertemente por el uso de plaguicidas. De esta manera, los animales salvajes habitantes de estos ambientes se encuentran expuestos directa e indirectamente a través de diferentes vías, a una amplia gama de plaguicidas. La exposición directa depende no sólo de las características biológicas y ecológicas de cada especie, sino del compuesto químico que sea diseminado en sus ambientes. Para muchos individuos, el envenenamiento agudo se presenta después de la exposición directa (por ejemplo, a través de la ingestión, inhalación, contacto dérmico, entre otras) al compuesto formulado durante la pulverización, o mediante la ingestión de los cultivos tratados, constituyendo un envenenamiento directo o primario. Esto es especialmente cierto para compuestos altamente tóxicos como insecticidas, avicidas y rodenticidas. Una vía indirecta de exposición se presenta a través de las cadenas tróficas. En este caso, la intoxicación se define como secundaria y se produce en un depredador a través de la ingestión de presas contaminadas o envenenadas. Esta vía indirecta está generalmente asociada a compuestos con propiedades bioacumulables como los insecticidas organofosforados (OP) y carbamatos. Por estos motivos el estudio de los animales silvestres sujetos a estas condiciones de vida en ambientes altamente modificados, resulta de gran interés por su relevancia ecológica.

Debido a que el abordaje de estudios de comunidades a nivel ecológico es poco viable logísticamente, la selección de individuos representativos de estos ambientes es crucial para la evaluación de los posibles efectos de diferentes compuestos sobre la vida silvestre. De este modo, el empleo de especies silvestres como “centinelas” constituye una herramienta útil para el seguimiento de los efectos biológicos e interacciones que ocurren entre los organismos y los contaminantes, permitiendo por ejemplo, analizar el impacto de la aplicación masiva de los diferentes plaguicidas sobre las poblaciones silvestres y sus ecosistemas. Las especies consideradas centinelas, deben tener ciertas propiedades como poseer un área importante de distribución, ser abundantes, fáciles de manipular, etc.; que les otorguen la capacidad de actuar como señales de alarma temprana de los diferentes efectos de los contaminantes en la vida silvestre (Rossi y col., 2016).

En la actualidad, existe una variedad de indicadores de toxicidad que ha sido probada en diferentes especies salvajes consideradas centinelas, revelando toda clase de efectos tóxicos causados por distintos plaguicidas utilizados en la agricultura moderna. En este sentido, algunos autores, han reportado efectos tóxicos sobre parámetros inmunológicos y de supervivencia en abejas silvestres expuestas a nicotinoides (Woodcock y col., 2017). Recientemente ha sido publicado un trabajo de revisión sobre efectos teratogénicos en diferentes especies animales (mamíferos, reptiles, aves y anfibios), muchas de ellas silvestres, producidos por diferentes plaguicidas (Garces y col., 2020). Otro estudio similar ha informado envenenamiento de diferentes especies animales producto de insecticidas que actúan como inhibidores de la acetilcolinesterasa (Bertero y col., 2020).

Si consideramos particularmente a los plaguicidas más utilizados en nuestro país y cuyo estudio es abordado en esta Tesis, se ha descubierto que el GLI provoca diferentes efectos adversos en humanos (Mensah y col., 2015); así como en distintas especies silvestres como las bogas de la especie *Leporinus obtusidens* (Salbego y col., 2010), el quirquincho grande (*Chaetophractus villosus*; Luaces y col., 2017), el cangrejo de Shanghai (*Eriocheir sinensis*; Yang y col., 2019) y el yacaré overo (*Caiman latirostris*; Poletta y col., 2009, 2011b; Latorre y col., 2013; López González y col., 2013; Siroski y col., 2016; Burella y col., 2017, 2018; Odetti y col., 2020). De manera similar, distintos efectos de la CIP se han descrito en el camaleón (*Calotes versicolor*; Khan y Fatima, 2002), en la rana ladradora (*Physalaemus cuvieri*; Wrubleswski y col., 2018) y en conejos de laboratorio (El-Sheshtawy y col., 2019); y del CPF en *C. latirostris* (López González y col., 2017; Poletta y col., 2017; Odetti y col., 2020). Por último, también se han encontrado efectos adversos de mezclas complejas de pesticidas en *Rana pipiens* (Christin y col., 2003) y en *C. latirostris* (Poletta y col., 2011a).

En la especie modelo de estudio en esta Tesis (*Salvator merianae*) sólo han sido reportados, por nuestro grupo de trabajo, efectos genotóxicos del herbicida GLI (Schaumburg y col., 2016) y del insecticida CIP (Siroski y col., 2017).

Finalmente, habiendo resaltado la importancia de las especies silvestres como representativas de los ambientes naturales y como buenos indicadores de la salud ambiental, así como las implicancias ecológicas de los efectos de diferentes agroquímicos, se desprende la relevancia de profundizar el conocimiento de estos efectos sobre estas especies centinelas.

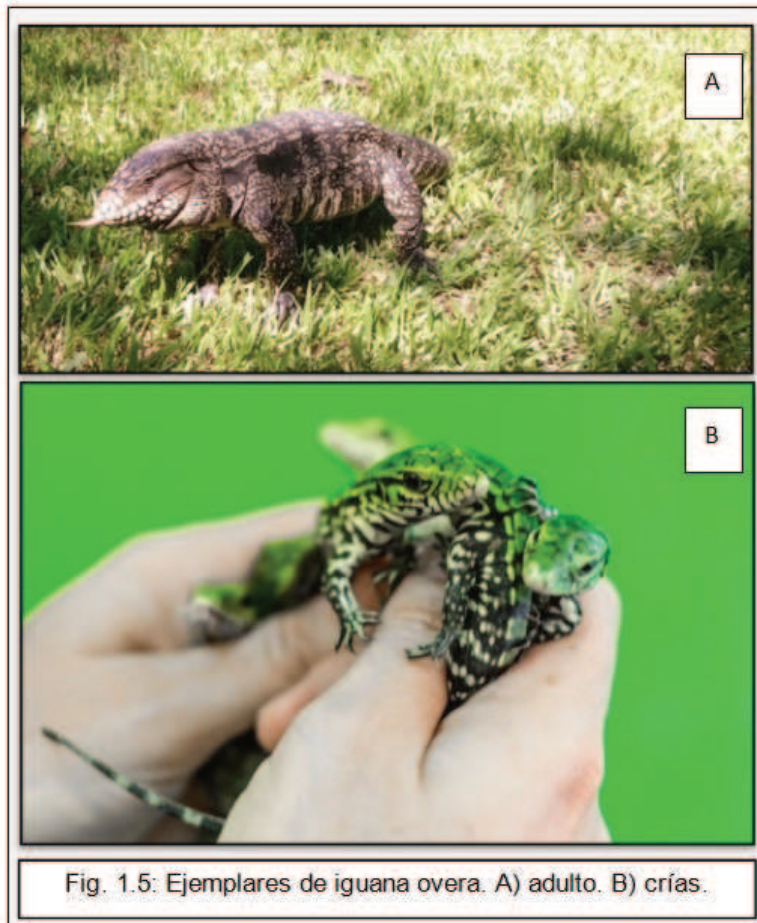
Particularmente, la iguana overa (*S. merianae*) se ha considerado como un organismo centinela debido a las características particulares que la convierten en una especie

apropiada para ser considerada como modelo biológico en el monitoreo de efectos de plaguicidas (Schaumburg y col., 2014).

1.2 Descripción de la iguana o lagarto overo (*Salvator merianae*)

1.2.1 Caracterización biológica

Salvator merianae es una especie del orden Squamata, perteneciente a la familia Teiidae. Tanto su nombre común en español (iguana overa) como en inglés (*black and white tegu lizard*) remite a la coloración y a su patrón de manchas que poseen sus ejemplares cuando son juveniles y adultos (Fig. 1.5 A). En cambio, desde su nacimiento hasta unos cinco meses después, su coloración es verde intensa (Fig. 1.5 B). Nacen con un largo total promedio de 16 cm, llegando a medir hasta 160 centímetros cuando son adultos (Abrahão y col., 2019).



Los ejemplares de esta especie tienen un dimorfismo sexual muy marcado en la edad adulta: los machos presentan mayor tamaño corporal que las hembras, pigmentación de la piel más intensa y botones nupciales presentes a ambos lados de la cloaca (Siroski y col., 2017). Viven en una variedad de ambientes, presentando una gran plasticidad y adaptación. Habitan espacios abiertos de bosques primarios y secundarios, sabanas con arbustos espinosos y espacios cerrados como bosques tropicales, riberas y zonas costeras arenosas, así como también hábitats perturbados, incluyendo bordes de caminos y áreas agrícolas (de Castro y Galetti, 2004). Poseen una dieta generalista cuya composición depende de su edad y tamaño, incluyendo pequeños insectos, arañas, caracoles, frutas carnosas y semillas cuando son pequeños, ampliando su dieta a vertebrados pequeños, huevos, plantas, raíces, e incluso hongos y hasta carroña cuando son adultos (Toledo y col., 2004; Mourthé, 2010). Son cazadores activos pero poseen una gran preferencia hacia el consumo de huevos, que pueden ser de aves y/o reptiles, incluyendo los de su misma especie (Mazzotti y col., 2015). Poseen ciclos de actividad diarios y estacionales que están fuertemente relacionados con la temperatura (Winck y col., 2011) debido a su condición ectotérmica. Las iguanas juveniles de pequeño tamaño pueden ser depredadas por serpientes, pájaros y mamíferos, así como por individuos más grandes de su misma especie. Sin embargo, los lagartos de gran porte sólo pueden ser amenazados por aves rapaces o grandes mamíferos como felinos y zorros de gran tamaño (Rohe y Antunes, 2008).

Los ejemplares de *S. meriana* permanecen aletargados en madrigueras durante los meses más fríos (da Silva y col., 2013). De octubre a diciembre, cuando la temperatura ambiental aumenta, también se incrementa su metabolismo, y comienza su período reproductivo anual. Durante esa etapa, las iguanas construyen sus nidos en cuevas en el suelo o entre las raíces de árboles (Fig. 1.6 A), cuidadosamente acondicionados y aislados de los cambios climáticos importantes, para garantizar una temperatura de incubación y humedad adecuadas para el desarrollo de los embriones. El tamaño de postura es aproximadamente de 36 huevos blanquecinos, ovalados, de cáscara blanda y porosa (Fig. 1.6 B y C), cuya longitud no supera los 4,8 cm (Donadio y Gallardo, 1984; Yanosky y Mercolli, 1992). La cáscara de los huevos de esta especie constituye una cubierta protectora muy blanda debido a su baja calcificación y es la porosidad de la misma, lo que permite su permeabilidad para hacer posible el intercambio de gases y humedad entre el ambiente interno y externo del huevo. Esta alta permeabilidad también puede representar una importante susceptibilidad al permitir el ingreso, en diferentes concentraciones, de diversos plaguicidas (Marco y col., 2004; Sexton y col., 2005).



1.2.2 Situación poblacional de la iguana overa y programa de conservación de uso sustentable de la especie

Una de las alternativas que existen para valorizar a los ecosistemas naturales es la utilización sustentable de especies faunísticas de interés económico, en la medida en que el beneficio comercial producido actúe como estímulo para su conservación. Por otra parte, la identificación de especies “banderas” en determinados ecosistemas, permite desarrollar programas de conservación sobre las otras especies asociadas al mismo hábitat (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza; UICN 1991). Desde 1982 *S. merianae* está incluida en el Apéndice II de CITES (Convención Internacional para el Tráfico de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres) que incluye a todas las especies que, si bien en la actualidad no se encuentran necesariamente en peligro de extinción, podrían llegar a esa situación a menos que el

comercio de especímenes de dichas especies esté sujeto a una reglamentación estricta, a fin de evitar una utilización incompatible con su supervivencia. La decisión de la inclusión de dicha especie dentro de este apéndice, surgió como consecuencia de la necesidad de regular la creciente extracción, en número de individuos, desde el medio natural.

En Argentina se desarrollan diferentes tipos de programas de aprovechamiento de las poblaciones de iguana overa: reproducción en ciclos cerrados, extracción directa de adultos (caza comercial) y ranqueo. Particularmente en la Provincia de Santa Fe, se desarrollan tanto la caza comercial como el ranqueo.

La extracción de individuos de *S. merianae* se realiza para comercializar su cuero, que se curte en el país y se exporta para la posterior confección de una gran variedad de productos (Porini, 2006). Sin embargo, las poblaciones de esta especie han demostrado la capacidad de resistir importantes extracciones anuales que promedian entre 1 y 1,9 millones de individuos por año a lo largo de los últimos treinta años (Siroski y col., 2017). Esto fue posible gracias a la implementación de programas de uso sustentable que permitieron que, desde hace más de una década, esta especie sea considerada como de "Preocupación menor" por su estado de conservación según la UICN (Embert y col., 2009).

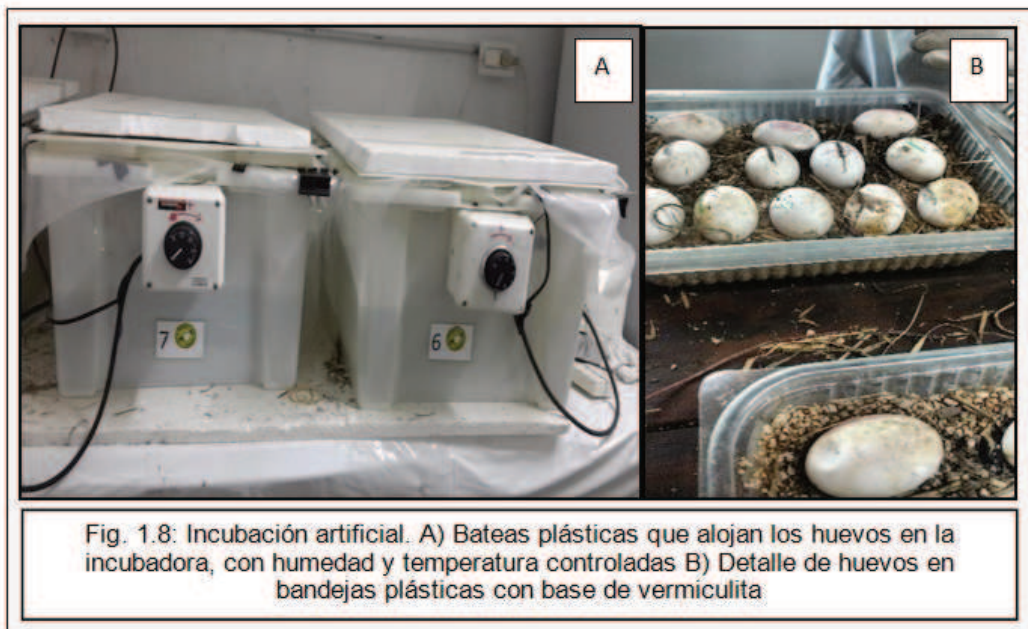
Desde 2007, las poblaciones de *S. merianae* han estado incluidas en un Programa de uso sustentable desarrollado en la provincia de Santa Fe (Argentina), llamado Proyecto Iguana (PI - Secretaría de Estado para el Medio Ambiente y el Desarrollo Sostenible de la Provincia de Santa Fe. Resolución Número 0031/07). Este programa de ranqueo, consiste en la cosecha de huevos silvestres para su desarrollo en granjas, con el compromiso de reintroducir en la naturaleza un porcentaje de los animales nacidos a partir de esa crianza. Este tipo de programas se basa en el aprovechamiento de la porción de animales que se pierde en condiciones naturales por la elevada mortalidad embrionaria y perinatal debido a condiciones ambientales extremas, depredación de huevos y neonatos, contaminación ambiental, entre otras causas (Siroski y col., 2017). La técnica de ranqueo incluye las siguientes etapas: recolección de huevos en el ambiente natural, su incubación artificial, el nacimiento y la cría de los animales en condiciones controladas, hasta que los ejemplares alcanzan un tamaño adecuado para ser liberados en el medio natural. Finalmente, una porción de los animales se destina a experimentación científica, mientras el resto se comercializa como animales de compañía que permite afrontar los gastos económicos del programa.

En el momento de la cosecha, los huevos son marcados (Fig. 1.7) a fin de no alterar la posición en la que fueron puestos por la hembra para no producir daños al embrión, ya

que el mismo se fija a la parte superior de la membrana dentro de las 24 hs después de la postura. Luego, los huevos son trasladados en recipientes plásticos con material de nido para evitar su movimiento hasta las instalaciones del PI, donde se realiza la incubación y cría.



La incubación se lleva a cabo en una sala acondicionada para tal fin, con temperatura y humedad estrictamente controladas. Los huevos son colocados en bandejas con base de vermiculita dentro de bateas plásticas de alta resistencia (Fig. 1.8). La temperatura de incubación se mantiene entre 29 y 31.5 °C y la humedad al 20% aproximadamente.



Los nacimientos de los animales de un mismo nido ocurren dentro de un periodo de 48 horas, normalmente. Debido a que éstos nacen completamente desarrollados y

totalmente independientes y son muy veloces desde el momento en que abandonan el huevo (Fig. 1.9), son dispuestos en bateas plásticas de paredes altas, hasta que el último individuo del nido termina de nacer para evitar la fuga de los animales.



Después de los nacimientos, los animales son trasladados a una habitación con temperatura y humedad controlada. Se colocan en bateas plásticas con base de tierra y pasto, que disponen de comederos y bebederos (Fig. 1.10).



Debido a su dieta omnívora, los animales son alimentados a base de huevos de gallina y frutas en sus primeras semanas de vida, incorporando después porciones de carne de cabezas de pollo molida. En todos los casos y desde las primeras ingestas de comida, el alimento es enriquecido con un complemento vitamínico para reptiles llamado *Reptocal tetra* que contiene sustancias minerales vitales como calcio, fósforo y vitamina D3. Para la absorción de esta última vitamina, todos los animales son

periódicamente expuestos al sol y/o a lámparas UV acondicionadas en las habitaciones de cría. Estas lámparas son de 60 cm de longitud, con una potencia de de 18W de luz visible/UV, con un 30% de UVA y 5% de UVB (Sylvania Reptistar®), recomendada para reptiles.

Finalmente, una porción de los animales es utilizada con fines experimentales, otra ingresa en circuito comercial y el resto es devuelto a la naturaleza. Para la liberación se respeta el origen de los nidos, es decir, los individuos son liberados en el mismo sitio donde fueron cosechados los huevos que les dieron origen (Fig. 1.11).



Fig.1.11: A) y B) Devolución de ejemplares al medio silvestre

Estos programas de uso sustentable, que involucran especies silvestres representativas de un ecosistema particular, poseen como uno de sus pilares esenciales la participación activa de las personas que conviven con estos recursos naturales. Estas personas están involucradas en diferentes tareas, tales como identificar nidos, la recolección de los huevos, la colaboración en la reintroducción de animales en sus ambientes naturales, entre otras. Todas estas tareas son compensadas y alentadas a través de incentivos económicos, por lo que el desarrollo de estos programas no sólo representa una contribución importante a la economía regional, sino también un impacto positivo en la conciencia ambiental y el compromiso de la población local con la preservación de los recursos y la protección del ecosistema que los contiene (Siroski y col., 2017).

1.2.3 Distribución geográfica de la iguana overa

El género *Salvator* (previamente *Tupinambis*, Harvey y col., 2012), es endémico de América del Sur y habita en una extensa área que abarca los países de Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay, Venezuela, Colombia y República Cooperativa de Guyana (Presch, 1973). Dentro del género existen dos especies distribuidas en Sudamérica, *Salvator rufescens* (iguana colorada) y *S. merianae* (iguana o lagarto overo). Particularmente, la iguana overa exhibe una amplia geografía y distribución que comprende algunos estados de Brasil; oriente de Bolivia, Paraguay, Uruguay y norte y centro de Argentina, incluyendo una variedad de climas tropicales y fríos (Figura 1.12).



En nuestro país, esta especie del género *Salvator* es la más abundante y de mayor distribución, pudiendo encontrarse desde el norte de Río Negro hasta el norte del país (Ávila-Pires, 1995; Harvey y col., 2012) (Fig. 1.13 A).

1.2.4 Amenazas a la especie debidas a la expansión de la frontera agrícola

Como se mencionó en el apartado 1.1.1., el desarrollo de la agricultura va de la mano de la implementación de un sistema que combina la utilización de nuevas tecnologías con la aplicación de compuestos químicos en forma masiva. Los efectos de dichos compuestos químicos, además de otros factores como la fragmentación y degradación

del hábitat, la deforestación, y el drenaje de los humedales para destinar más tierras para cultivos, produjeron a lo largo de los años un declive numérico en las poblaciones de diversas especies silvestres, muchas de ellas pertenecientes al grupo de los reptiles (Santos y Llorente, 2009; Weir y col., 2015), en los cuales se ha demostrado que la estructura del hábitat afecta a la composición de las poblaciones (Días y col., 2014). Particularmente, las poblaciones de iguana overa se encuentran inmersas en áreas donde la actividad agrícola avanzó en los últimos años en forma desmesurada. Si se comparan los mapas de distribución de la especie con el de las áreas destinadas al monocultivo de soja, se puede observar una superposición de las mismas (Fig. 1.13).

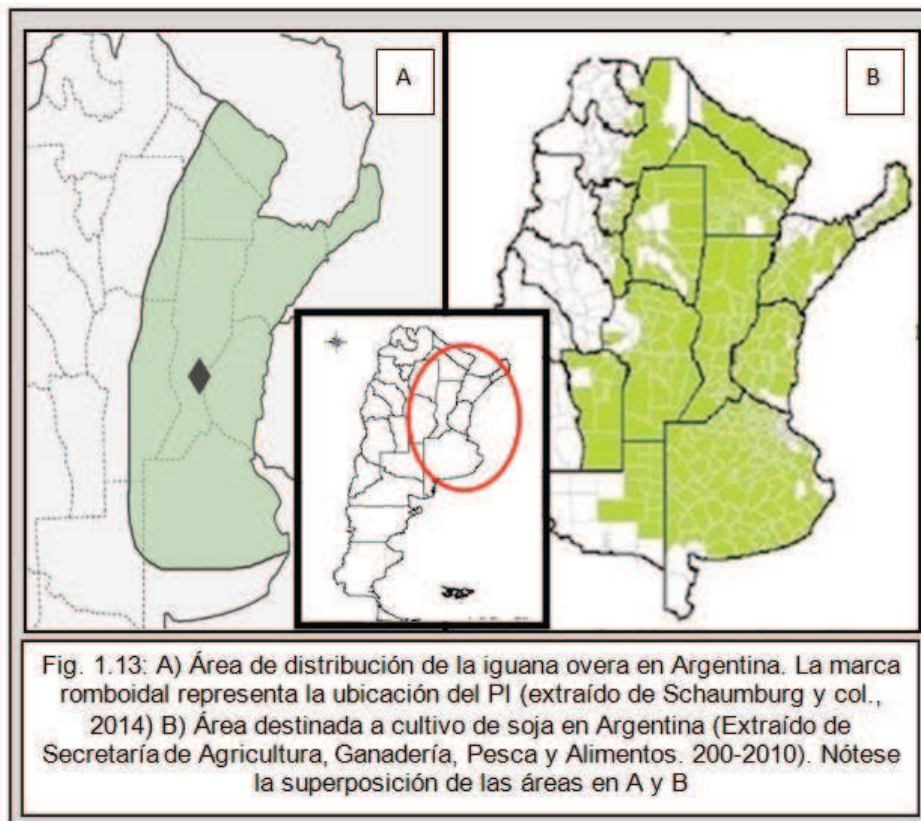




Fig. 1.14 A) Cultivo de soja lindante a la zona de nidificación de la iguana overa. B) Nido en el interior del árbol de paraíso (*Melia azedarach*) en A.

Todos estos factores generan condiciones muy adversas para la especie y son numerosos los riesgos a los que están expuestas las poblaciones de *S. merianae*. Uno de los más importantes es la cercanía de sus nidos a las zonas de máxima exposición a agroquímicos (Fig. 1.14), sumado a la coincidencia de la época reproductiva de la especie con el período de máxima aplicación de plaguicidas (primavera y verano).

Dentro de las posibles vías de exposición, la transferencia vía materna (Guirlet y col., 2008) y la contaminación directa desde el suelo, el agua, el aire, del material de anidamiento extraído del entorno natural donde viven, así como a través de la alimentación en juveniles y adultos, son potenciales vías de ingreso de plaguicidas en el organismo de los ejemplares de esta especie que pueden ponerla en peligro (Siroski y col., 2017).

Es importante destacar que en las especies ovíparas como la iguana overa, el período más crítico respecto a la influencia ambiental es la etapa embrionaria, donde las condiciones experimentadas por el huevo pueden tener consecuencias permanentes y decisivas en etapas posteriores del individuo (Russell y col., 1999).

Por lo antes expuesto, sumado a la plasticidad de *S. merianae* para vivir en hábitats naturales, modificados y antrópicos, su elevada representatividad en estos ambientes y su dieta omnívora es que, como se mencionaba anteriormente, se ha considerado su utilización como “especie centinela” para el monitoreo de efectos de diferentes plaguicidas.

1.3 Sistema inmune. Generalidades.

Todos los organismos, de distinto nivel de complejidad, tanto uni como pluricelulares, tienen mecanismos para defenderse de posibles ataques de agentes extraños. La inmunidad significa protección contra enfermedades y, más específicamente, contra enfermedades infecciosas. Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunitario, y su respuesta colectiva y coordinada a la introducción de sustancias extrañas es llamada “respuesta inmune” (Abbas y col., 2011). El Sistema Inmune (SI) está constituido por una porción celular (monocitos, macrófagos, neutrófilos de la línea mieloide; y linfocitos B, linfocitos T y células asesinas naturales o “*natural killers*” de la línea linfoide); por una porción humoral compuesta por sustancias solubles (inmunoglobulinas -Ig-, sistema de complemento, citoquinas, entre otras); por tejidos (tejido linfoide asociado a mucosas); y órganos (médula ósea, timo y bazo, hígado, etc.).

El principal objetivo del SI consiste en distinguir lo “propio” de lo “ajeno”, y eliminar, a través de diferentes mecanismos, una gran variedad de agentes agresores, para lograr retornar al organismo a su estado basal (homeostasis) con eficiencia. La diversidad de reacciones y mecanismos frente a distintos estímulos, da cuenta de la complejidad del estudio del SI. Sin embargo, avances recientes en biología celular y molecular, genética, imagen celular, y bioinformática, han permitido ampliar los conocimientos sobre esta compleja disciplina científica (Good y col., 2019; Nieman y Pence, 2019).

El primer mecanismo de defensa que actúa impidiendo la entrada de los patógenos es un conjunto de barreras físicas y/o químicas, tales como cambios de pH, temperatura, humedad, y gradientes eléctricos determinados por elementos químicos de la piel y epitelios de mucosas, moléculas antimicrobianas, entre otras. Este tipo de barreras se encuentra en todos los seres vivos, con características particulares dependiendo del organismo de que se trate.

Además de estas barreras, todos los animales presentan un segundo mecanismo de defensa de mayor complejidad denominado Sistema Inmune Innato o Inespecífico (SII) que reconoce y responde al ingreso de patógenos en forma inmediata, pero no confiere inmunidad a largo plazo. Sus componentes se conservan notablemente desde los insectos a los mamíferos, lo que indica un origen ancestral común para este mecanismo de inmunidad (Hoffmann y col., 1999). Únicamente los vertebrados poseen un mecanismo de tercer nivel de complejidad, el denominado Sistema Inmune Adaptativo (SIA) o específico, que entra en acción cuando la inmunidad innata no es suficiente, o ante ciertas reincidencias por la denominada “memoria inmunológica” (Collado y col., 2008).

1.3.1. Sistema Inmune Innato y Adaptativo

El SII consiste en mecanismos de defensa bioquímica y celular que están preparados, incluso antes de la infección, para responder rápidamente a las infecciones. Estos mecanismos reaccionan tanto contra los patógenos como a productos de células lesionadas propias, y responden esencialmente de la misma manera, aunque un mismo evento se repita. Los componentes principales de la inmunidad innata son (1) una *porción celular* que incluye células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas y células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés: *Natural Killer*) y (2) una *porción humoral* que incluye proteínas de la sangre (componentes del sistema de complemento y otros mediadores de inflamación) y citoquinas que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células de la inmunidad innata y adquirida (Abbas y col., 2011). Las citoquinas comprenden un grupo heterogéneo de moléculas de bajo peso molecular que son producidas y secretadas por leucocitos, células epiteliales, endoteliales y parenquimatosas, pertenecientes a diferentes órganos. Las diferentes vías de señalización que se producirán a partir de la secreción de estas moléculas dependen del tipo de citoquina de que se trate, así como de los diferentes tipos celulares estimulados por ellas. Los componentes de la inmunidad innata participan en la respuesta inmunitaria mediante dos grandes mecanismos: a) ejerciendo una acción directa y rápida ante el ingreso de las partículas exógenas; y b) produciendo mediadores (citoquinas) capaces de orientar el curso de la respuesta inmunitaria hacia la reacción innata o adaptativa. Respecto del primer mecanismo (a), frente al ingreso de una sustancia exógena, las células o proteínas que intervienen dependen del tipo de agente (ingreso de bacterias, virus, helmintos, otras partículas tóxicas). Por ejemplo, macrófagos y granulocitos pueden actuar ingiriendo patógenos, produciendo especies reactivas del oxígeno y/o citoquinas. Las células NK pueden actuar en cambio, reconociendo y destruyendo las células anormales del mismo huésped o aquellas dañadas tras el ingreso de partículas tóxicas. Asimismo, la cascada del sistema de complemento podría activarse para formar complejos proteicos, permitiendo la lisis de los patógenos. De la misma manera, la acción de otras proteínas de fase aguda u de otros mediadores de la inflamación podría ser crucial en una respuesta frente a una agresión mediada por bacterias (Owen y col., 2013).

La segunda función de las células de la inmunidad innata (b) está relacionada con su capacidad de orientar el curso de la inmunidad adaptativa.

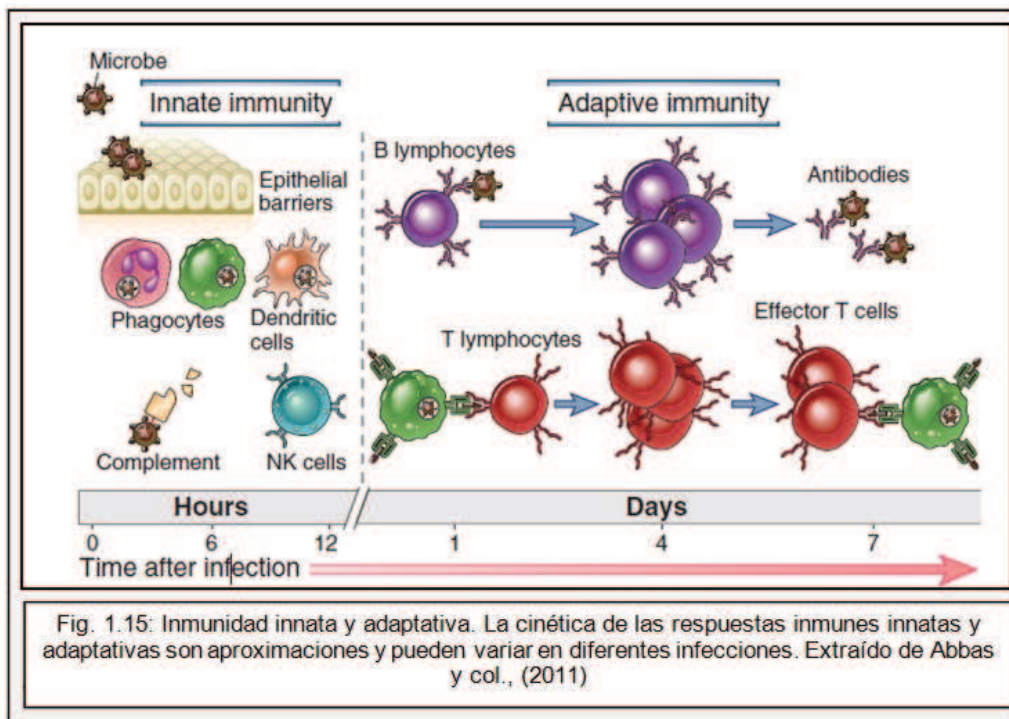
Los componentes principales del SIA son (1) Una *porción celular* que incluye a los linfocitos T y B (LT y LB, respectivamente) y (2) una *porción humoral* que incluye a los anticuerpos (Ac) secretados por los linfocitos B, que necesitan reconocer a los

antígenos (Ag) para desencadenar su acción (Tizard, 2009). Los Ac son moléculas, del tipo de las glicoproteínas, que el sistema inmune elabora en respuesta a distintos Ag, favoreciendo su eliminación mediante mecanismos efectores. La estructura de una molécula de Ac está formada por 4 cadenas polipeptídicas: 2 cadenas pesadas idénticas (H) y 2 cadenas livianas idénticas (L) (Abbas y col., 2012). Existen distintos isotipos de Ac que difieren en sus estructuras así como en sus propiedades. La inmunoglobulina M (IgM) posee una estructura polimérica que puede ser producida como consecuencia de una exposición a agentes microbianos, siendo la primera en aparecer durante ese proceso (Fainbom y Geffner 2011). Está presente en la mayoría de los vertebrados. La IgY de reptiles y aves, que es homóloga a la IgG de mamíferos, es monomérica, y posee una estructura de doble bisagra y, si bien los estudios de esta clase de Ig aún son incipientes, se sabe que es el Ac más abundante en el suero de todas las aves estudiadas hasta el momento, y se lo considera el principal anticuerpo de defensa contra las infecciones sistémicas (Montagna y col., 2013). La IgY está presente en la yema de huevo de algunas aves y reptiles, y constituye la fuente de anticuerpos que protege al recién nacido en los primeros días de vida (Davison y col., 2008). Debido a que las IgE e IgG no están presentes en los genomas de los reptiles, es probable que una subclase de IgY medie la respuesta alérgica, mientras que la IgA sea la principal responsable de la protección de las superficies mucosas en estos animales (Liguori y col., 2020). Además, se ha reportado la presencia de genes de IgD en determinados reptiles (Deza y col., 2009; Megadán-Mompó y col., 2013).

La estrategia utilizada por la inmunidad adaptativa para reconocer a los patógenos es el desarrollo de una inmensa variedad de linfocitos T y B, cada uno de los cuales, expresa en su superficie un receptor particular para el Ag, que reconoce detalles de éste (epítomos antigénicos). Particularmente, los LB reconocen directamente al Ag en su conformación nativa, ya sean proteínas, hidratos de carbono, lípidos o ácidos nucleicos, luego se diferencian como células secretoras de anticuerpos o plasmocitos. Existen 3 poblaciones de LB: B1; B2 y B de la zona marginal del bazo (LBZM). Una característica fundamental de los LB1 es que pueden expandirse clonalmente sin necesidad de contactar antígenos foráneos. Su función principal es la de generar anticuerpos naturales (AcN) que son polirreactivos y de baja afinidad contra antígenos no proteicos, y pertenecen principalmente a los isotipos de IgM (Matson y col., 2005). Esta clase de linfocitos es especialmente dependiente del sistema de complemento (SC) para diferenciarse en plasmocitos secretores de Ac. La función principal de los LB2 es reconocer antígenos proteicos y diferenciarse en células productoras de Ac específicos (Fainboim y Geffner 2011).

Finalmente, a diferencia de las células B, las células T no pueden reconocer un Ag en su estado natural por lo que requieren que el Ag sea procesado por una célula intermedia (Zimmerman y col., 2009). Pueden tener funciones citotóxicas o actuar como colaboradoras en procesos infecciosos, además de ser capaces de reclutar otros tipos celulares.

Por lo anteriormente explicado, se desprende que la respuesta inmune depende de la confluencia de dos estrategias diferentes, que difieren en el tiempo de reacción (Fig. 1.15), pero también en la especificidad y memoria que posee el SIA a diferencia del SII.



1.3.2 Poblaciones leucocitarias

Los glóbulos blancos (GB) están involucrados en una cantidad significativa de procesos inmunes. Los GB derivan de las células madre hematopoyéticas pluripotentes situadas dentro de la médula ósea, que se diferencian en progenitores mieloides y linfoides (Finger, 2014). En ciertas situaciones, los incrementos o disminuciones en los valores de ciertos componentes de la sangre se pueden usar como marcadores para diagnosticar enfermedades o cambios en el estado nutricional del huésped (González Fernández, 2003). De esta manera, tanto el Recuento Total

(RTGB) como el Diferencial (RDGB) de Glóbulos Blancos resultan de gran utilidad como herramienta diagnóstica.

El RTGB es de gran utilidad en los estudios clínicos en general y en los veterinarios en particular. Este parámetro otorga información sobre el estado fisiológico del organismo, y sus alteraciones pueden estar asociadas con una amplia variedad de enfermedades, que se pueden detectar cuando se registra una disminución (leucopenia) o un aumento (leucocitosis) en la cantidad de leucocitos (GB).

Bajo el nombre de leucocitos o GB se agrupan una serie de células que pueden dividirse en dos grandes grupos: los granulocitos y los agranulocitos, según la presencia o no de granulaciones específicas. Dentro de los primeros están incluidos los neutrófilos (conocidos como heterófilos en reptiles; Cabagna Zenklusen, 2012), eosinófilos y basófilos, nombrados de esta forma por la afinidad tintorial de sus granulaciones. Los miembros de este grupo de granulocitos carecen de la capacidad de recircular, es decir, una vez que se han extravasado no regresan a circulación. Los agranulocitos, en cambio, comprenden linfocitos, monocitos y azurófilos, que pueden llegar a tener, en ocasiones, granulaciones inespecíficas. Debido a que existen variaciones interespecíficas en los tipos de GB, la clasificación que se describe a continuación general, pero incluye específicamente células descritas en reptiles y anfibios.

Granulocitos:

Heterófilos: Células con núcleo escotado, o con varios lóbulos, normalmente son bi o trilobulados, siendo infrecuentes más de tres lóbulos. Poseen citoplasma incoloro y granulaciones con disparidad de color, forma, tamaño (de allí su nombre de heterófilos) y ultraestructura (Carvalho y col., 2006; Cabagna Zenklusen, 2012). Su tamaño varía entre 15 y 25 μm . Se reclutan rápidamente en el foco infeccioso y cumplen un papel crítico en la respuesta inmune innata, con funciones fagocíticas y líticas, aumentando su número también en inflamaciones (Davis y Maerz, 2009). Se ha descrito además su participación en fenómenos de reparación tisular y en diversos mecanismos inmunoreguladores, esta función está relacionada a su capacidad de producir una amplia gama de citoquinas (Fainboim y Geffner 2011).

Eosinófilos: Células con citoplasma basófilo, con granulaciones específicas redondeadas u ovals, de tamaño considerable. Tienen núcleo prominente normalmente único y escotado, aunque puede ser bilobulado, localizado excéntricamente (Troiano y col., 2008). Su tamaño es similar al de los heterófilos. Los eosinófilos son reclutados en el transcurso de procesos alérgicos e intoxicaciones, así

como en respuesta a ciertas infecciones parasitarias (de nematodos y trematodos) (Kiesecker, 2002).

Basófilos: Células con citoplasma incoloro, con granulaciones redondas de tamaño considerable, basófilas, en cantidad variable pero normalmente abundantes (Troiano y col., 2008) que, en ocasiones, pueden no dejar ver el núcleo. Su núcleo es irregular, excéntrico y sin lóbulos. Tienen tamaño normalmente pequeño, aunque pueden alcanzar un tamaño similar al de los heterófilos. Su función no está del todo esclarecida, pero se supone que intervienen en los procesos inflamatorios (Calver y Quaglia, 2009).

Agranulocitos:

Linfocitos: Células que pueden diferenciarse en tres clases: pequeñas, medianas y grandes. Las primeras tienen núcleo redondo, con cromatina condensada y escaso citoplasma basófilo/azulado (Cabagna Zenklusen, 2012). A medida que el tamaño celular aumenta, la cromatina tiende a expandirse y el borde del núcleo a escotarse, el citoplasma se hace más abundante y menos basófilo, donde pueden aparecer granulaciones inespecíficas y puede observarse la presencia de pseudópodos. Los integrantes de este grupo celular intervienen en diferentes y muy importantes funciones inmunológicas, tanto del SII como del SIA, que incluyen la generación de Ac y la modulación del SI.

Monocitos: Células de mayor tamaño, con citoplasma gris azulado, núcleo redondeado o lobulado con cromatina laxa. Su relación núcleo/citoplasma es baja. Son similares morfológicamente a linfocitos grandes, pero carecen de pseudópodos (Claver y Quaglia, 2009).

Azurófilos: Células con similares características de forma y tamaño a los monocitos. Con granulaciones azurófilas inespecíficas pequeñas que le dan motivo a su nombre. Por esta semejanza con los monocitos es que existe controversia acerca de su clasificación, donde para algunos autores (Montali, 1988; Huber y Zon, 1998; Claver y Quaglia, 2009) deben ser considerados como una variación de monocitos normales, mientras que, para otros, se trataría de un subtipo diferente (Kanchanapangka y col., 1999; Salakij y col., 2002; Troiano y col., 2011; Maceda-Veiga y col., 2015). Stacy y col. (2011) sostienen que los azurófilos no sólo son un subtipo diferente de leucocitos, sino que son exclusivos de los reptiles.

El recuento diferencial de glóbulos blancos (RDGB) permite cuantificar los tipos de leucocitos a partir de los cuales se pueden calcular sus porcentajes relativos. Los aumentos o las disminuciones de cada una de las poblaciones de GB (heterófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y azurófilos) en relación a los valores de referencia se han definido como: agranulocitosis, neutrofilia/neutropenia, eosinofilia/eosinopenia, basofilia/basopenia, monocitosis/monocitopenia, linfocitosis/linfopenia. Estos parámetros son de utilidad para establecer diferentes diagnósticos que pueden estar asociados a enfermedades benignas como procesos infecciosos o inflamatorios, o enfermedades malignas como leucemia y mieloptisis (Campuzano-Maya, 2007). Además, existen algunos índices que representan buenos indicadores para detectar por ejemplo, los efectos del estrés ambiental, infeccioso, parasitario o toxicológico (Zayas y col., 2011).

El índice de Heterófilos/Linfocitos (H/L) es utilizado como una medida de la respuesta inmunológica de los individuos al estrés (Davis y col., 2008). La proporción relativa de cada tipo celular (linfocitos y heterófilos), puede cambiar en relación a una situación de estrés determinada. Por ejemplo, en reptiles, un aumento en el valor de este índice, resultante de un aumento de heterófilos o disminución de linfocitos, producida de forma secundaria (Strik y col., 2007), podría estar asociado con una respuesta inflamatoria (especialmente infecciones microbianas y parasitarias, o lesión de tejido) o con respuestas no inflamatorias inducidas en respuesta secundaria a un exceso de glucocorticoides incrementados por un agente estresante (Campbell, 2006).

Por otra parte, el Índice de Lobularidad (IL) permite evaluar el grado de madurez leucocitaria que posee el individuo, lo cual puede diferenciar un estrés agudo de uno crónico (García y col., 1997). Esta clasificación fue realizada por primera vez por Arneith (Charipper, 1928) con el fin de poder evaluar el grado de madurez de este tipo de leucocitos (García y col., 1997). En este sentido, los heterófilos con un solo lóbulo representan células más jóvenes (inmaduras) en circulación, por lo que un aumento de estas células indicaría que los animales están en presencia de factores que causarían una inminente demanda en la producción de estas células. Cabagna Zenklusen (2012) sostiene que este efecto podría ser causado por una situación de estrés de tipo agudo. Mientras tanto, aquellos heterófilos que poseen más lóbulos representan células que llevan más tiempo en circulación sanguínea, lo que alertaría sobre un estrés crónico (Cabagna Zenklusen, 2012).

1.3.3 Anticuerpos naturales

Como se mencionó en el apartado 1.3.1, los AcN son producidos de manera constitutiva y sin previa exposición a un antígeno particular, por subconjuntos de linfocitos B (B1) (Ochsenbein y Zinkernagel, 2000, Abbas y col., 2011). Los AcN están codificados directamente por el genoma, a diferencia de los Ac adaptativos que requieren hipermutación y recombinación somática durante la ontogénesis (Avrameas, 1991). Tienen un patrón de amplia reactividad, la cual se requiere para un reconocimiento inmediato y protección contra patógenos invasores (Binder y col., 2005). Reaccionan con diversas afinidades a una amplia variedad de epítomos en antígenos macromoleculares y particulados incluidos los glóbulos rojos no propios, bacterias, virus y toxinas (Ochsenbein y Zinkernagel, 2000; Belperron y Bockenstedt, 2001).

Como se mencionaba en el apartado 1.5.1, los AcN pertenecen principalmente a la clase de IgM, siendo generalmente específicos para carbohidratos o moléculas lipídicas. Proporcionan una primera línea de defensa contra la infección, facilitando también la respuesta adaptativa inmune después de la infección (Kohler y col., 2003; Durbach y col., 2007). En este sentido, los AcN reconocen y se pueden unir ampliamente a los Ag, un proceso que podría activar la cascada del complemento o cualquier otro mecanismo que culmine con la lisis de las células extrañas (Carroll 1998; Ochsenbein y Zinkernagel, 2000).

El papel fisiológico evolutivo más importante para los AcN está relacionado a la mejora de la supervivencia del huésped a través de una temprana resistencia contra la infección y el mantenimiento de su homeostasis interna (Matson y col., 2005; Val y col., 2013). Es por esta razón que considerarlos como indicadores de la competencia inmune es de suma importancia (Racca y col., 2014).

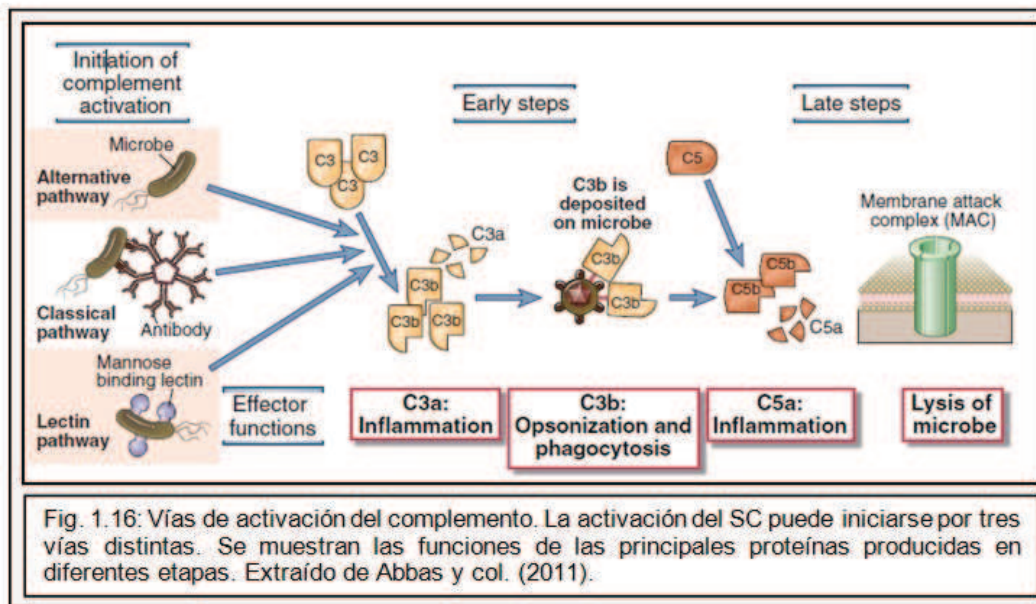
1.3.4 Sistema de complemento

Entre los componentes humorales de la inmunidad innata, el sistema de complemento es el de mayor impacto en la defensa frente a las infecciones bacterianas. Se encuentra en todos los animales vertebrados y presenta un alto grado de conservación entre los mamíferos. Los componentes del SC integran un mecanismo constitutivo de defensa tisular, pudiendo encontrarlos normalmente inactivos en sangre o líquidos extravasculares, independientemente de la presencia o ausencia de procesos inflamatorios o infecciosos. Estos componentes son un grupo de proteínas plasmáticas (25-30 proteínas) que juegan papeles críticos en la defensa del huésped al interactuar con componentes del SI tanto innato como adaptativo (Siroski y col., 2016). Estos componentes se pueden activar para inducir una respuesta inflamatoria, para potenciar

la respuesta de los LB (reclutando leucocitos al sitio de la infección), para mediar la marcación de microorganismos o materiales extraños para su posterior reconocimiento y eliminación (opsonización), y/o para mediar efectos citotóxicos directamente sobre la membrana externa de microorganismos, a través del ensamblaje de un complejo de ataque de membrana multiproteico.

La activación del SC implica cascadas proteolíticas, en que una enzima precursora inactiva, llamada zimógeno, se altera para convertirse en una proteasa activa que escinde, y de ese modo induce la actividad proteolítica de la siguiente proteína complementaria en la cascada. A medida que avanza la cascada, las actividades enzimáticas resultan en una inmensa amplificación de la cantidad de productos proteolíticos que son generados. Estos productos realizan las funciones efectoras del SC. La cascada del SC puede ser iniciada por tres mecanismos distintos: una vía clásica dependiente de Ac, una vía alternativa independiente de Ac y una vía que involucra a las lectinas, que se traduce en la modulación de la función inmune.

El reconocimiento de microbios por cualquiera de las tres vías resulta en rutas de reclutamiento y ensamblaje secuencial de proteínas complementarias adicionales en complejos de proteasas (Fig. 1.16).



Uno de estos complejos de proteasas, llamado convertasa C3, escinde la proteína central del SC: C3, produciendo dos fragmentos: C3a y C3b. El fragmento C3b, más grande, se une covalentemente a la superficie microbiana donde se activó la vía del complemento. C3b sirve como opsonina para promover la fagocitosis de los microbios. El fragmento más pequeño, C3a, se libera, y estimula la inflamación actuando como

quimioatrayente para neutrófilos. C3b se une a otras proteínas del complemento para formar una proteasa llamada convertasa C5 que escinde a C5, generando un péptido secretado (C5a) y un fragmento más grande (C5b) que permanece unido a las membranas celulares microbianas. C5a es un quimioatrayente y además, induce cambios en vasos sanguíneos que los hacen perder fluido y proteínas plasmáticas en sitios de infecciones. C5b inicia la formación de un complejo de las proteínas del complemento C6, C7, C8 y C9, que se ensamblan en un poro de membrana, llamado complejo de ataque de membrana (CAM), que causa la lisis de las células donde se activa el complemento. Así, las tres vías se activan de manera independiente pero secuencialmente, de manera que la activación de uno de los componentes conduce a la activación del siguiente. Finalmente, como parte de la inmunidad innata, el SC puede ser capaz por sí mismo de defender al hospedador contra la invasión de patógenos (Siroski, 2012); por lo que alteraciones en cualquiera de los pasos de esta cascada de reacción podrían afectar la funcionalidad esencial de este parámetro inmunológico.

1.3.5 Efectos de plaguicidas sobre el sistema inmune.

La regulación de todos los mecanismos involucrados en la respuesta inmune, hace que este sistema sea muy sensible a diversos factores presentes en el ambiente. Esto convierte al sistema inmune (SI) en un importante evaluador de riesgo ambiental ocasionado por agentes estresantes, especialmente el producido por contaminantes. En este sentido, numerosos herbicidas, fungicidas e insecticidas pueden impactar sobre el normal funcionamiento del SI, tanto en animales como en humanos (Gantress y col., 2003). La alteración de estos mecanismos inevitablemente resulta en una disminución de la actividad para desencadenar una estrategia de defensa contra agentes extraños y la eliminación de células dañadas (Banerjee y col., 1996). Por esta razón, diversos parámetros inmunológicos podrían ser usados como bioindicadores de toxicidad de sustancias contaminantes (Lafuente Giménez y col., 2001).

Entre las características que realzan la importancia de utilizar el SI como biomarcador de contaminación, se destacan las siguientes:

1. El SI da cuenta de la interacción de un individuo con otros organismos o sustancias tóxicas.
2. Los cambios que sufre el SI en los organismos influyen en las poblaciones ya que pueden afectar la susceptibilidad de los individuos a las enfermedades.

3. Muchos componentes del SI se conservan evolutivamente, por lo cual, la sensibilidad a un contaminante puede ser similar en diferentes especies (Han y col., 2014).

Por todo lo mencionado, el SI resulta ser un excelente indicador de la salud de un organismo (Burns y col., 1996), pudiendo ser afectada la inmunidad innata como en la adquirida en animales expuestos, aguda o crónicamente, a ciertos plaguicidas. Además, resulta interesante resaltar, que la inmunotoxicidad no es solo el resultado del contacto con grandes dosis de un agrotóxico, sino también de la exposición crónica a bajas dosis (García y col., 2016).

Se han reportado alteraciones en aves (Mendes y col., 2006; Whiteman y col., 2006; Arya y col., 2019), en anfibios (Baldwin, 2019; Zamora-Camacho, 2019), en mamíferos (Gilot-Fromont y col., 2012; Chi-Coyoc y col., 2016) y en reptiles (Sandmeier y col., 2012; Walsh y col., 2019). Particularmente en este último grupo, estudios en yacaré overo (*C. latirostris*), desarrollados por nuestro grupo de trabajo, demostraron alteraciones en el SI de crías y neonatos expuestos a glifosato, endosulfán y/o cipermetrina (Siroski, 2011; Poletta y col., 2011; Latorre y col., 2013; 2016; Siroski y col., 2016).

1.4 Sistema endócrino. Generalidades

Los agentes estresores son percibidos principalmente por sensores del sistema nervioso y la respuesta inicial del organismo se induce a través de una integración de los centros cerebrales, específicamente en el hipotálamo, donde se estimulan dos ejes reguladores principales: el eje de la simpádocromafina (SIC), a través de fibras nerviosas que inervan células de cromafina y el eje hipotalámico-pituitario-inter-renal (HPI), a través de una cascada endocrina.

La primera hormona liberada en esta cascada es la corticotropina (CRH), junto con otro péptido hipotalámico liberador de la hormona tiroidea (TRH), que también tiene propiedades de activación. La CRH y la TRH estimulan la liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) de la hipófisis, que a su vez induce la producción y liberación de glucocorticoides (GC) (Rotllant y col., 2000). Las respuestas al estrés tienen diferente duración, de manera que la producción de los primeros mediadores de SIC y las células HPI tiene lugar en segundos, la liberación de GC se produce en minutos y otras respuestas metabólicas llevan desde minutos hasta horas. Por lo tanto, una exposición crónica o repetida a estresores puede conducir a liberaciones de GC bajas pero constantes, que impliquen períodos prolongados de recuperación para el organismo, con elevados costos energéticos y de rendimiento (Tort y col., 2004).

1.4.1 Niveles de corticosterona plasmática como medida de estrés

Como se mencionó, las hormonas forman parte del sistema endócrino (SE) y representan una importante capacidad para modular el fenotipo del animal (Meylan y col., 2010). En vertebrados, los encargados de esta modulación son los GC, que activan una cascada de respuestas fisiológicas y de comportamiento (Moleón y col., 2017). Específicamente, la corticosterona (GC) es la hormona de respuesta al estrés en reptiles y se encarga de reasignar la energía de funciones no esenciales hacia aspectos fisiológicos, morfológicos y de comportamiento. Un aumento en los niveles de corticosterona resulta en la movilización de reservas de energía y el ajuste apropiado del comportamiento y la fisiología a las condiciones (McEwen y Wingfield, 2003), ayudando de esta manera a los organismos a amortiguar los efectos de los estresores agudos o crónicos (Meylan y col., 2010).

Se han reportado diferentes efectos generados por diversos plaguicidas sobre los niveles de corticosterona (McMahon y col., 2017; Adelizzi y col., 2019; Van Meter y col., 2019); sugiriendo que la concentración plasmática de esta hormona del SE podría ser un buen indicador para evaluar el estrés causado por esta clase de contaminantes en especies silvestres.

1.4.2 Interacción entre la respuesta endocrina al estrés y la respuesta inmune

Dentro de las principales funciones de los GC, se destaca su gran importancia como reguladores poderosos de la función inmune (Meylan y col., 2010). Existen registros de que la acción de inmunosupresión de los GC puede ocurrir a través de la inhibición de la actividad del factor de transcripción (Fast y col., 2008), que permiten prevenir episodios inflamatorios inapropiados o exacerbados (Graham y col., 2012). El efecto particular de la corticosterona sobre la función inmune surge de la necesidad de reorganizar los recursos del organismo y varía con la especie y el estado físico de cada individuo (Roberts y col., 2007).

Ante desafíos ambientales recurrentes, los organismos podrían prevenir las demandas de recursos elevados, pudiendo éstos no convertirse en factores estresantes para el organismo (Martin y col., 2008). En este caso, el SI actuaría conservando recursos energéticos que se puedan requerir para hacer frente a las demandas inmediatas cuando la homeostasis está amenazada por los factores estresantes (Spencer y col., 2005; Fast y col., 2008). No obstante, eventos ambientales impredecibles, de larga duración (que inducen estrés crónico), repetidos y persistentes, pueden desencadenar una adaptación con disminución gradual de la respuesta inmune, o un agotamiento y

eventualmente la muerte de los organismos (McCormick y col., 2015; Beldomenico y Begon, 2016). Algunos cambios severos e impredecibles pueden estar relacionados por ejemplo, con una exposición continua e intensiva a plaguicidas, entre otros factores.

En función de los estudios previos, se resalta la relevancia de determinar parámetros bioquímicos, endocrinos e inmunológicos y sus relaciones, para evaluar el impacto que estaría generando el uso intensivo de agroquímicos en las poblaciones silvestres de iguana overa en Santa Fe.

1.5 Hipótesis y objetivos

1.5.1 Hipótesis

Los plaguicidas Clorpirifos, Cipermetrina y Glifosato tienen un efecto inmunotóxico significativo sobre los componentes del sistema inmune innato y adquirido de *S. merianae*.

1.5.2 Objetivo General

En los ambientes naturales donde habita la iguana overa (*S. merianae*) se encuentran presentes diversos agentes químicos, en particular plaguicidas de uso agrícola. Las formulaciones comerciales de plaguicidas utilizadas en agricultura se caracterizan por ser mezclas químicas complejas y su toxicidad debe ser evaluada como tal. El presente proyecto propone evaluar el posible efecto inmunotóxico de tres agroquímicos de amplio uso en Argentina: los plaguicidas Clorpirifos, Cipermetrina y Glifosato, sobre componentes del sistema inmune innato y adquirido de *S. merianae*, una especie de reptil endémico de América del Sur, como modelo alternativo para el monitoreo de contaminación ambiental.

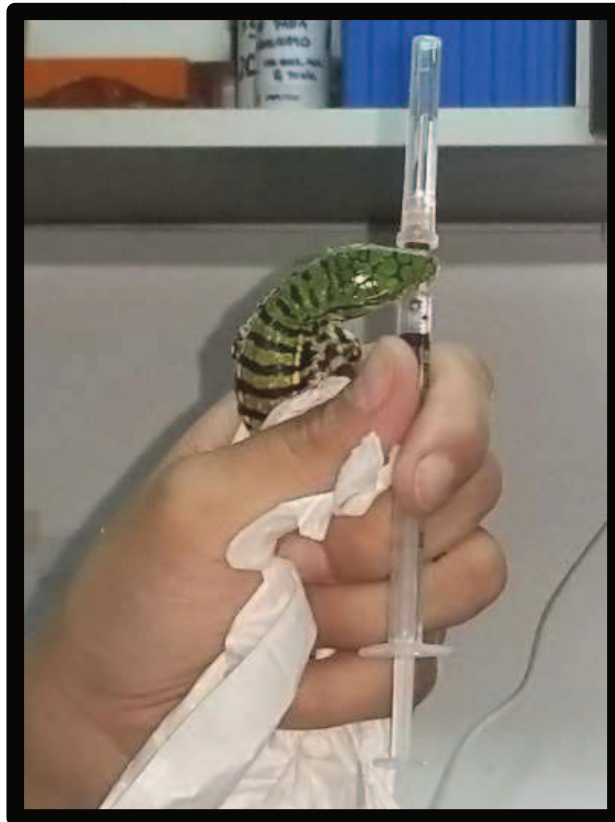
1.5.3 Objetivos Específicos

- 1) Realizar el ajuste metodológico de técnicas inmunológicas y la determinación de valores basales a fin de caracterizar el sistema inmune de *S. merianae*.
- 2) Evaluar el efecto de los plaguicidas Clorpirifos, Cipermetrina y Glifosato sobre parámetros del sistema inmune de *S. merianae* en distintas clases etarias.
- 3) Analizar los efectos de los mencionados agroquímicos sobre el desarrollo embrionario y el crecimiento corporal general de ejemplares de *S. merianae*.

4) Transferir la información generada por este estudio a los planes de manejo y conservación que incluyen a estas especies, con el objetivo de evaluar y optimizar las estrategias de uso sustentable.

CAPÍTULO 2

Determinación de valores basales de parámetros inmunológicos de
S. merianae



2.1 Introducción

La sangre periférica es, probablemente, el tejido más informativo que puede ser muestreado en vertebrados, ya que puede brindar información sobre el funcionamiento de todo el organismo (Douglas y col., 2010). Los estudios hematológicos son importantes para la conservación de la vida silvestre porque pueden indicar el estado de salud de las poblaciones (Gilbertson y col., 2003).

Al igual que para otros grupos de animales silvestres, la inmunología de reptiles involucra el análisis de componentes humorales y otros mediados por células. Se han reportado trabajos que establecen valores basales de algunos parámetros de este sistema en reptiles, como en las tortugas *Trachemys callirostris* (Carrascal Velásquez y col., 2014) y *Phrynops hilarii* (Latorre y col., 2015); así como en los yacarés *Caiman yacare* y *C. latirostris* (Mussart y col., 2006; Barboza y col., 2008). Los valores basales (o de referencia) representan los valores medios de determinados parámetros estudiados en una especie en particular, con características establecidas para edad, sexo, tamaño, etc. Es imprescindible que se establezcan con claridad y bajo el control de variables externas, porque los valores basales constituyen un punto de partida (o referencia) para la evaluación de esos mismos parámetros bajo otras condiciones.

Como se mencionó en el capítulo 1 (apartado 1.3), el SI puede ser evaluado a través de sus componentes celulares mediante algunos parámetros como el recuento total (RTGB) y diferencial de glóbulos blancos (RDGB); o de sus componentes humorales, como los niveles de anticuerpos naturales (AcN), la actividad del sistema de complemento (SC), entre otros. La importancia biológica de cada uno de estos parámetros y su utilidad como indicadores del estado de salud de un organismo han sido descritas en el capítulo anterior. En este capítulo se detallarán cómo se realizan metodológicamente sus determinaciones. Además, a partir de los RDGB, se pueden establecer otros índices como el de Heterófilos/Linfocitos (H/L) y el de Lobularidad (IL = número de lóbulos contados / número de heterófilos contados). La utilidad y conveniencia de la aplicación de estos parámetros han sido probadas por algunos autores en otros animales silvestres (Barboza y col., 2008; Latorre y col., 2016; Moleón y col., 2017; Racca y col., 2014; Silvestre, 2014; Siroski y col., 2016). Sin embargo, los valores basales de solo algunos parámetros fueron reportados para *S. merianae*. Por lo tanto, uno de los objetivos de este trabajo (ver apartado 1.5.3; Capítulo 1), fue evaluar diferentes biomarcadores inmunológicos para determinar sus valores de referencia para ejemplares de *S. merianae* en diferentes clases etarias.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Descripción de técnicas inmunológicas

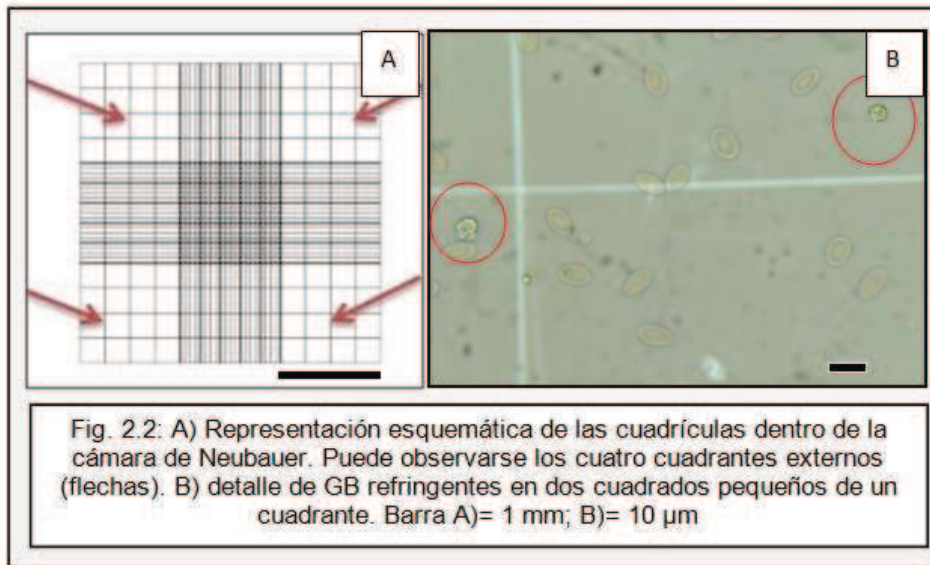
2.2.1.1 Recuento total de glóbulos blancos

El recuento total de glóbulos blancos (RTGB) consiste en determinar la cantidad de GB en sangre periférica por unidad de volumen: microlitro (μl), milímetro cúbico (mm^3) o litro (l). Los contadores hematológicos automatizados realizan una selección de tamaño y complejidad celular y no logran diferenciar los glóbulos blancos de los rojos, debido a que estos últimos, son nucleados dentro de este grupo taxonómico. Es por este motivo, que este recuento se efectuó manualmente mediante el uso de la cámara de Neubauer (Fig. 2.1).



Fig. 2.1: Cámara de Neubauer

Para realizar la determinación se tomó una alícuota de sangre ($5 \mu\text{l}$) y se la diluyó en una solución de NaCl al 0,6% (Lewis y col., 2008), en una proporción de 1:200. La solución de NaCl actúa como agente lisante de los hematíes sin intervenir en la integridad de los leucocitos, permitiendo observar a estos últimos con cierta refringencia (Fig. 2.2 B). La solución obtenida se homogeneizó antes de cargar la cámara de Neubauer, donde se dejó reposar durante 5 min para permitir la sedimentación de las células antes de su observación bajo microscopio óptico. Para realizar el RTGB se utilizaron los 4 cuadrantes externos de la cámara, los cuales están divididos en 16 cuadrados más pequeños (Fig. 2.2 A) y se observaron a 100 aumentos totales (AT).



Luego del recuento, los resultados se expresaron en número de GB por milímetro cúbico de sangre a partir de siguiente la fórmula:

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

Donde:

A= número de células contadas

V= volumen del cuadrado de la cámara (en mm^3)

f= factor de dilución

2.2.1.2 Recuento diferencial de glóbulos blancos

Para realizar los recuentos diferenciales de glóbulos blancos (RDGB), se prepararon dos extendidos por animal, los cuales se tiñeron con solución de May-Grunwald-Giemsa (ver Fig. 2.3). Los extendidos fueron codificados para lograr una máxima objetividad durante el análisis. Las cantidades de cada tipo de leucocitos se determinaron utilizando un microscopio óptico a 1000 AT en inmersión, realizando un conteo total de 100 GB por muestra. Cada tipo se expresó en relación con el RTGB registrado previamente, de la siguiente manera:

$$\text{N}^\circ \text{ de cada tipo GB/mm}^3 \text{ de sangre} = VA * RTGB / 100$$

Donde:

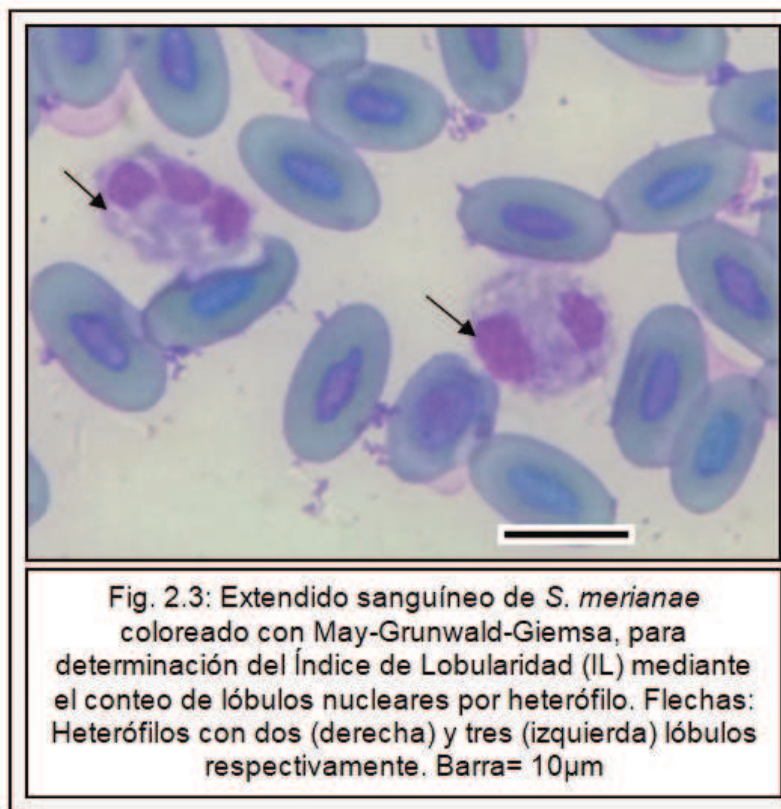
VA= valor absoluto de cada tipo de GB contado.

RTGB= valor (en mm^3) obtenido del RTGB de la misma muestra sanguínea (mismo individuo).

2.2.1.3 Índices leucocitarios

De acuerdo a lo expuesto en el apartado 1.3.2, existen índices leucocitarios que pueden determinarse a partir de los mismos extendidos sanguíneos preparados para el RDGB. El índice H/L consistió en realizar el cociente entre el número de heterófilos/ mm^3 sobre el número de linfocitos/ mm^3 calculados a partir del RDGB referenciado al RTGB.

Por otra parte, para determinar el índice de lobularidad (IL), se realizó sobre el mismo extendido, un conteo de 30 heterófilos registrando la cantidad de lóbulos nucleares de cada uno (Fig. 2.3).



Luego, el IL se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$IL = NL / NN$$

Donde:

IL= Índice de lobularidad.

NL=Número de lóbulos contados totales: (A: Número de heterófilos con 1 lobulación) + (B: Número de heterófilos con 2 lóbulos) + (C: Número de heterófilos con 3 lóbulos) + (D: Número de heterófilos con 4 lóbulos) = (A x 1) + (B x 2) + (C x 3) + (D x 4).

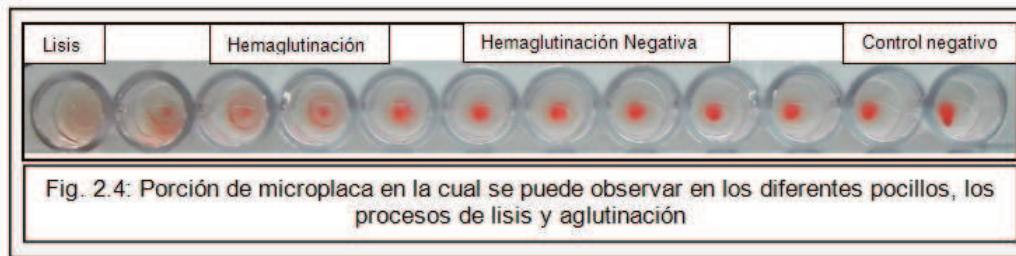
NN=Número de heterófilos observados (30).

El IL normalmente está comprendido en un rango determinado según la especie. Si el IL es menor a ese rango se dice que hay una desviación hacia la izquierda (mayor proporción de heterófilos con un solo lóbulo nuclear), y si es mayor se dice que hay una desviación hacia la derecha (mayor proporción de heterófilos con núcleos más segmentados). Por lo mencionado anteriormente, la desviación hacia la izquierda estaría más asociada a un estrés de tipo agudo, mientras una desviación hacia la derecha estaría indicando un estrés crónico. Debido a que este índice (al igual que H/L) no había sido calculado nunca para *S. merrianae*, en este trabajo se reportan por primera vez sus valores basales (ver apartado 2.2.2).

2.2.1.4 Detección de anticuerpos naturales

La determinación de los títulos de anticuerpos naturales (AcN) se llevó a cabo utilizando el ensayo de hemaglutinación ajustado por Latorre (2018) para *C. latirostris*, otro reptil autóctono, debido a que esta técnica hasta el momento no había sido aplicada para ninguna especie de lagartos. Dicho ensayo se basa en la interacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) que se presenta al mezclar una solución salina de glóbulos rojos de conejo (RRBC, del inglés “*rabbit red blood cells*”) con el plasma de interés. Los AcN son capaces de reaccionar con diversas afinidades a una amplia variedad de epítomos en antígenos macromoleculares y particulados incluyendo glóbulos rojos extraños, bacterias, virus y toxinas (Belperron y col., 2001). Los glóbulos rojos (GR) de conejo (*Oryctolagus cuniculus*), expresan altos niveles de α -N acetilgalactosamina (Cotter y col., 2005) que son reconocidos por los AcN de reptiles (Latorre 2018) y pueden provocar una aglutinación. De esta manera, durante el ensayo de hemaglutinación, los RRBC se comportan como Ag que se unen a los AcN (IgM pentaméricas) presentes en el plasma de iguana en este caso. Esta interacción Ag-Ac resulta en una hemaglutinación que se evidencia mediante la aparición de un

precipitado en el centro. En ausencia de AcN, la hemaglutinación es negativa y en este caso los Ag particulados sedimentan, formándose un botón bien definido en el fondo del pocillo de reacción. La lisis, por otro lado, refleja la interacción de los Ag con el Sistema de Complemento (Matson y col., 2005) (ver Fig. 2.4).



Para el desarrollo de estos ensayos se obtuvieron GR a partir de sangre entera heparinizada extraída de conejos pertenecientes al bioterio de la facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (UNL).

La sangre de conejo se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos para separar el plasma. Luego se preparó una solución de buffer fosfatosalino (PBS, pH 7,4) adicionando plasma de conejo (1%). El paquete globular sedimentado luego de la centrifugación de la sangre entera de conejo se lavó con PBS varias veces hasta que el sobrenadante quedara transparente, para preparar una solución de GR de conejo (SGRC) (v/v) al 1% en PBS. El ensayo se realizó en placas de fondo redondo (U) de 96 pocillos (Corning Costar, Corning, New York), se agregaron 25 µl de la solución de PBS con plasma de conejo en los pocillos de las columnas 1-12. Posteriormente, se agregaron 25 µl de plasma de iguana a los pocillos de la primera columna. Con el uso de un microdiluidor (volumen fijo) las muestras se diluyeron de manera seriada hasta obtener una dilución final de 1: 2048 (columna 11). Como control negativo, no se colocó plasma de iguana en la columna 12. Finalmente, se agregaron 25 µl de SGRC en los pocillos de todas las columnas (1-12). Después de la incubación a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 1 h, se determinaron los títulos de AcN. Los títulos asignados corresponden a la inversa de la dilución más alta en el que se detectó hemaglutinación.

2.2.1.5 Actividad del sistema del complemento

Independientemente de la vía del sistema de complemento (SC) que sea activada (Fig. 1.16, Capítulo 1), la cascada de reacción finaliza en la lisis del microbio, molécula o célula que haya funcionado como antígeno iniciador de la activación del SC. El ensayo de hemólisis de glóbulos rojos de oveja (SRBC, del inglés: "sheep red blood cells") se

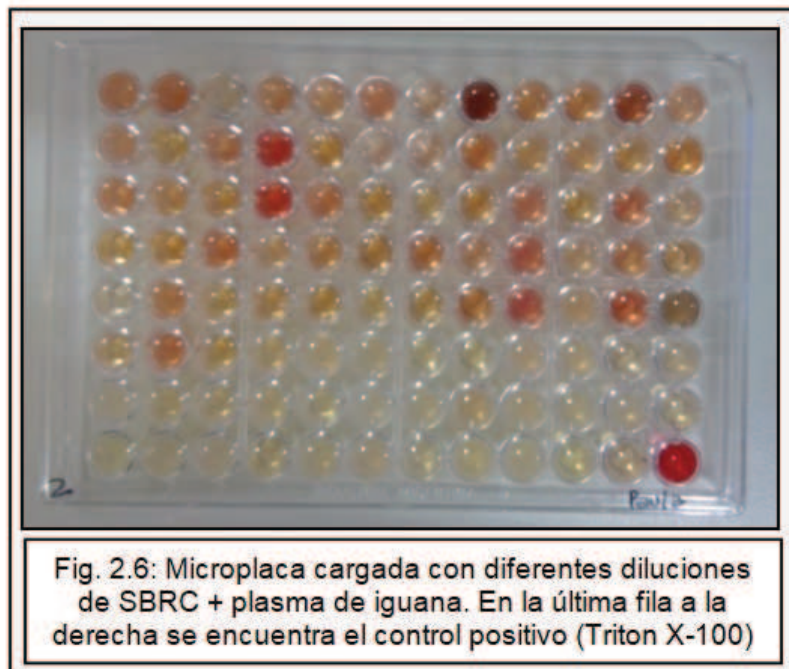
basa en la ruptura de los SRBC a través de las proteínas inmunológicas circulantes en el plasma del animal que se está evaluando. Estas proteínas reconocen a los SRBC como antígenos y provocan la activación de la cascada del SC, que culmina en la formación de un complejo proteico que genera un poro (CAM: Complejo de Ataque a Membrana) en la membrana de los SRBC y la posterior lisis de los mismos (Fig. 2.5).



La consecuente liberación de hemoglobina es registrada por espectrofotometría y se considera proporcional a la actividad del SC. Este ensayo es utilizado en forma rutinaria para evaluar el SC en los laboratorios clínicos (Kirschfink y Mollnes, 2003) y fue adaptado para el análisis del mismo en el suero de reptiles por Merchant y col. (2006). El protocolo aplicado para suero de iguanas se describe a continuación:

La sangre de oveja se centrifugó a 2500 rpm durante 20 min y el sobrenadante fue descartado, realizándose lavados repetidos con una solución *buffer* fosfato salino (PBS, 1% pH 7.4) hasta clarificar el sobrenadante. Después del último lavado, se preparó una solución al 2% (v/v) de SBRC con el mismo *buffer* a partir del paquete globular. En un tubo Eppendorf, se colocó 200 μ l de dicha solución + 200 μ l de plasma de *S. merianae*. Se homogeneizó y se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 2500 rpm por 5 min. Posteriormente, se tomaron 250 μ l del sobrenadante y se transfirieron a una microplaca de 96 pocillos (Fig. 2.6) (Cromoplate, policubetas fondo "U") para la medición de la densidad óptica en un lector de microplacas a 540 nm (Spectrostar Nano BMG Labtech).

Para obtener un control positivo se agregó 2 μ l de Triton X-100 a 1 ml de solución de SRBC al 1% y se homogeneizó varias veces. Este detergente no iónico actúa rompiendo las membranas celulares de los SRBC ocasionando una hemólisis completa, por lo que el resultado obtenido se consideró como la máxima hemólisis (MH). Todos los resultados de la hemólisis de SRBC se dividieron por la absorbancia medida en el control positivo para obtener el porcentaje máximo de hemólisis (%MH).



2.2.2 Determinación de valores de referencia

Debido a la importancia de establecer valores basales de los parámetros a utilizar en la especie estudiada y considerando que las características de *S. merianae* la convierten en un organismo centinela (ver apartado 1.1.3, Capítulo 1), se detalla a continuación la determinación de estos valores de referencia para la especie.

2.2.2.1 Ejemplares analizados

Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética y Seguridad (CAES) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (#258/16, Santa Fe, Argentina). Todos los animales fueron manipulados en base a los Principios éticos para la investigación con laboratorios, granjas y animales salvajes (CONICET, 2005).

En este estudio fueron utilizados 36 especímenes de iguana overa: 12 recién nacidos (RN; hasta 2 días de edad), 12 juveniles (JUV; 1 año de edad) y 12 adultos (AD; > 4 años; 6 machos y 6 hembras). Los animales RN y JUV provinieron de huevos

colectados en la Reserva Natural manejada “El Fisco” localizada en la Provincia de Santa Fe, Argentina; correspondiente a un Área Natural Protegida (30° 11'31,95" Sur; 61° 00'19,23" Oeste) situada a una distancia mayor a 20 km con respecto a áreas que reciban aplicación de plaguicidas o que posean otra actividad contaminante industrial (Siroski y col., 2016) (Fig. 2.7).



Los huevos recolectados fueron incubados artificialmente bajo condiciones controladas de temperatura (29- 32°C) y humedad (< 20%) en las instalaciones del Proyecto Iguana “PI” (ver apartado 1.2.2, Capítulo 1). Los lagartos adultos empleados en este estudio fueron extraídos del plantel existente en cautiverio en el “PI”.

Los ejemplares RN y JUV no se pudieron sexar debido a que poseían menos de 20 cm de longitud desde el hocico a la cloaca (LHC), tamaño mínimo imprescindible para poder realizar esta determinación (Yanosky y Mercolli, 1992). Por lo tanto, la determinación del sexo se realizó sólo en adultos, mediante la observación en los machos de botones nupciales presentes a ambos lados de la cloaca (Siroski y col., 2017) así como la hipertrofia de los músculos de la mandíbula (Hall, 1978; Yanosky y Mercolli, 1992), entre otras características físicas (ver apartado 1.2.1, Capítulo 1).

Los animales de las tres clases de edad (RN, JUV y AD) fueron mantenidos en condiciones de cautiverio dentro de las instalaciones del “PI” y fueron alimentados *ad libitum* tres veces por semana (ver apartado 1.2.2, Capítulo 1). Todos los animales fueron colocados en bateas plásticas de diferentes dimensiones según el tamaño de los animales, dentro de una habitación con temperatura controlada y sistema de luces

ultravioleta para reptiles (ver apartado 1.2.2, Capítulo 1). Cada batea (ver Fig. 1.10, Capítulo 1) fue acondicionada con material proveniente de la naturaleza (tierra, ramas y pasto seco) extraído de zonas sin exposición a plaguicidas.

Todos los ejemplares fueron identificados individualmente mediante fotografías de su parte ventral para su identificación individual, debido a que poseen un patrón de manchas único e irrepetible en cada individuo de esta especie (Fig. 2.8).



2.2.2.2 Toma de muestras

La sangre periférica fue obtenida a partir de la vena caudal (Olson y col., 1977, Fig. 2.9) de los ejemplares empleando jeringas heparinizadas con agujas de 25 G x 5/8" para iguanas RN y 21G x 1" para JUV y AD. Se utilizaron alícuotas de diferentes volúmenes de la sangre recogida para realizar las determinaciones de RTGB, RDGB, H/L e IL. La última alícuota se centrifugó a 2500 xg durante 15 min y se almacenó a -80 °C hasta ser utilizada para la determinación de los niveles de AcN y la actividad de SC (Siroski y col., 2016).



2.2.2.3 Medición de los índices inmunológicos

Fueron evaluados los siguientes parámetros inmunológicos, descritos en el apartado 2.2.1: recuento total y diferencial de glóbulos blancos, determinación de los índices H/L y de Lobularidad, detección de AcN y actividad del SC.

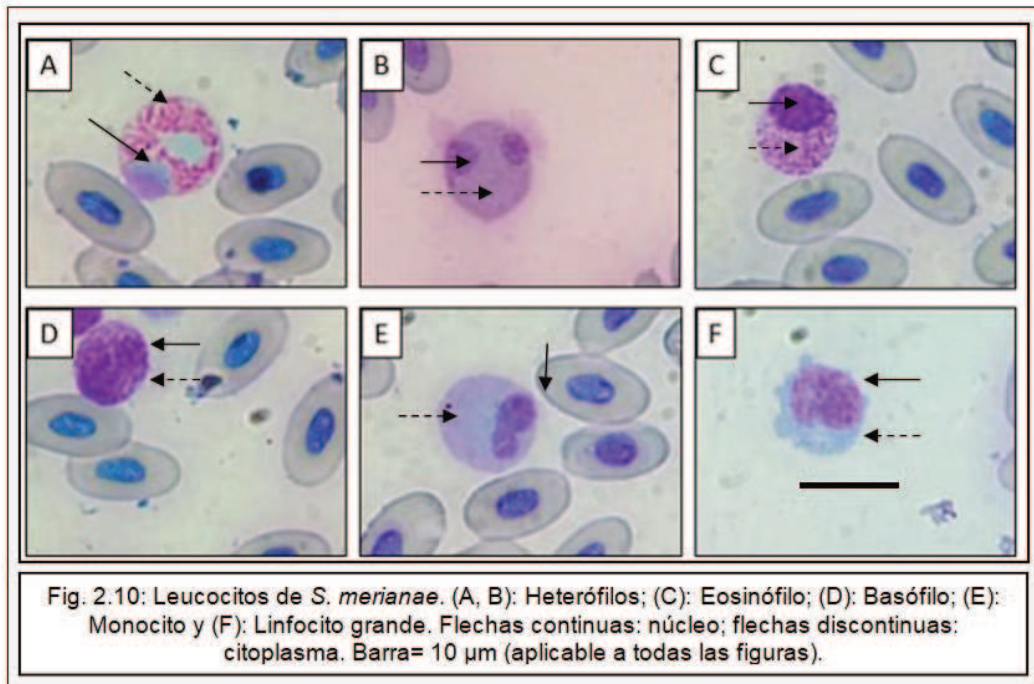
2.2.2.4 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos para los diferentes parámetros inmunológicos en las 3 clases de edad (RN, JUV y AD) y para los distintos sexos (en los adultos) fueron sometidos a pruebas de homogeneidad de varianzas utilizando la prueba de Levene y de normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para la determinación de diferencias entre grupos de edad, los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnet. Cuando los datos no cumplieran con los supuestos de normalidad y / o homogeneidad de varianzas, se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Mann-Whitney. Las comparaciones de las variables analizadas en función del sexo, se realizaron mediante una prueba t de Student, excepto para los datos de eosinófilos del RDGB, que por no cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, fueron analizadas a través de una prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Las diferencias entre los diferentes grupos de edad y entre ambos sexos, fueron consideradas significativas con $p < 0,05$. Todos los datos se reportaron como medias considerando el error estándar (\pm EE).

2.3 Resultados

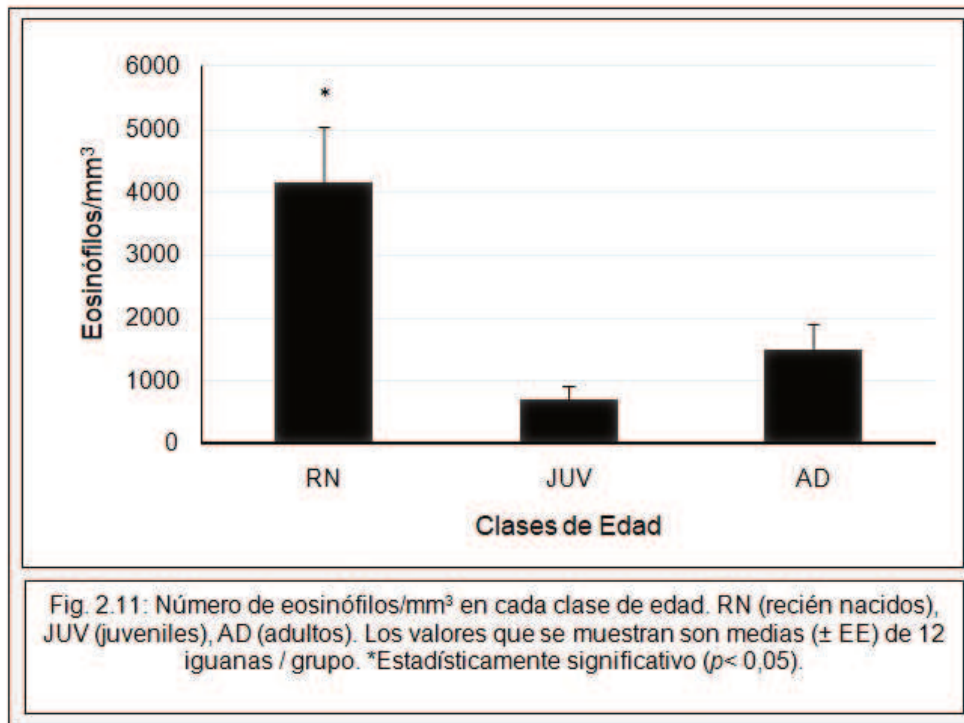
Se describen, a continuación, los tipos de leucocitos observados en los ejemplares analizados de *S. merianae* (Fig. 2.10).



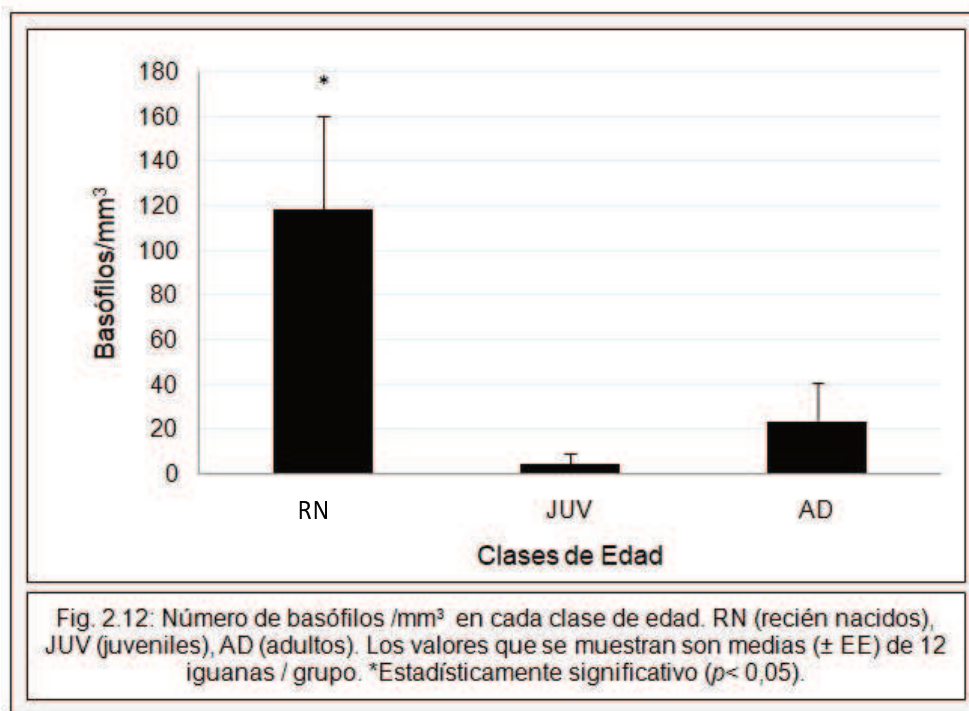
En la figura se pueden observar: heterófilos con distinto tipo de granulación citoplasmática: en forma de bastón (A) y de pequeños gránulos redondos (B); eosinófilo con granulación pequeña y redondeada (C); basófilo con granulación densa que hasta puede tapar el núcleo (D); monocito con núcleo arriñonado y gran citoplasma sin granulaciones con baja relación núcleo / citoplasma (E) y un linfocito grande con un núcleo único con baja concentración de heterocromatina y gran citoplasma con pseudópodos (F). Los linfocitos pequeños presentaron heterocromatina y un citoplasma escaso y basófilo (ver apartado 1.3.2, capítulo 1, por más detalles de clasificación).

Los resultados del RTGB no revelaron diferencias entre las clases de edad de *S. merianae*, siendo las medias (en céls/mm³) para cada grupo, las siguientes: RN: 20541,67 \pm 2741; JUV: 19583,33 \pm 4240,34; AD: 20333,33 \pm 2869,2. Sin embargo,

respecto del RDGB, los niveles de eosinófilos fueron mayores en RN en comparación con los grupos JUV y AD (Fig. 2.11).



Del mismo modo, el número de basófilos/mm³ fue diferente entre las clases de edad, no obstante, éstos representaron niveles aún más bajos que los niveles de eosinófilos respecto de los otros tipos de leucocitos en sangre periférica (Fig. 2.12).

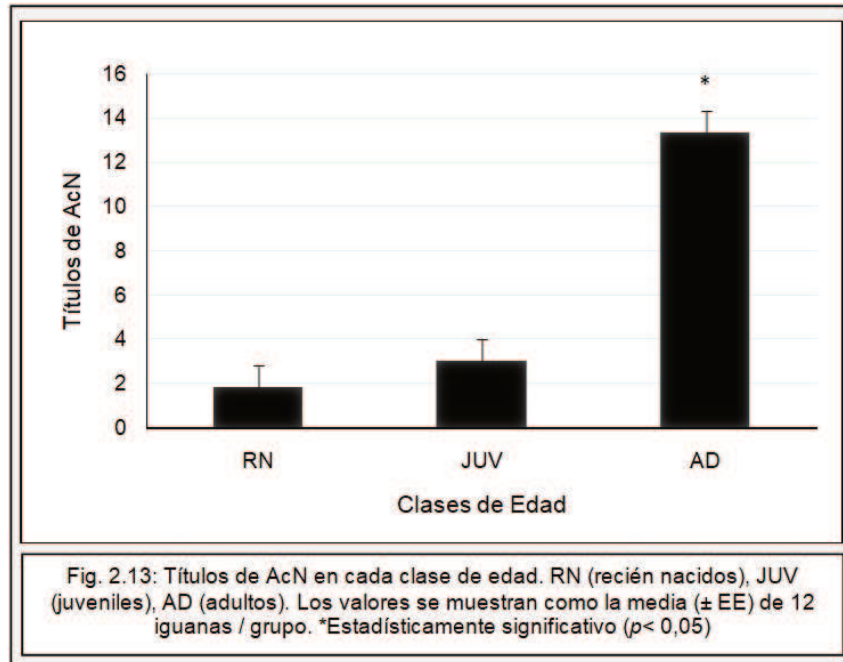


En relación a los otros tipos de leucocitos, no se observaron diferencias entre las clases de edad (Tabla 2.1).

	Heterófilos	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos	Azurófilos
RN	10537,08 ± 2183,68	6853,33 ± 1449,04	37,5 ± 19,7	4151,25 ± 897,08	118,33 ± 42,25	37,83 ± 6,42
JUV	10988,75 ± 3592,76	7869,17 ± 1462,23	14,58 ± 10,62	696,25 ± 215,69	4,58 ± 4,58	20,17 ± 4,87
AD	10284,58 ± 2315,22	8669,58 ± 235,06	7,92 ± 7,92	1487,08 ± 400,06	23,75 ± 17,05	20,17 ± 4,5

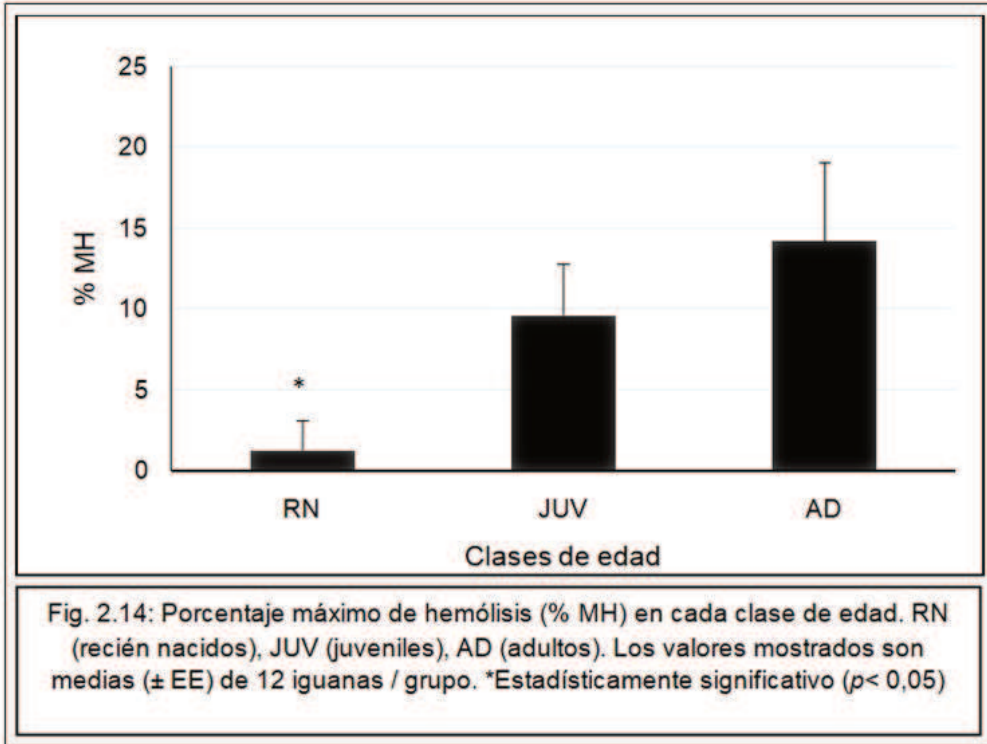
Cuando se comparó la media de todos los tipos de células en las tres clases de edad, se encontró que el grupo de heterófilos fue el tipo de leucocito más prevalente en la sangre periférica. En este tipo de leucocitos, el núcleo fue redondeado, con uno o dos lóbulos, siendo poco frecuente la presencia de tres o más lóbulos, determinando un IL de $1,76 \pm 0,10$ para RN, $1,65 \pm 0,58$ para JUV y $1,61 \pm 0,92$ para AD. La comparación de este índice entre las clases de edad no mostró diferencias.

Por otro lado, los títulos de anticuerpos naturales difirieron entre los grupos etarios siendo los niveles más altos en AD (Fig. 2.13).



Resulta importante aclarar que los valores de AcN en RN fueron bajos en todos los individuos, en muchos casos con títulos = 0.

Con respecto a la actividad del sistema de complemento, los datos también revelaron diferencias entre las clases etarias. La sangre de los RN mostró un valor muy bajo de máxima hemólisis en comparación con la sangre de JUV o AD (Fig. 2.13).



Por último, las comparaciones realizadas en relación con el sexo en los ejemplares adultos, no mostraron diferencias en ninguno de los parámetros examinados.

2.4 Discusión

El presente estudio permitió establecer algunos parámetros de referencia para su uso posterior en evaluaciones acerca del SI de *S. merianae*.

Mediante estos estudios se obtuvieron resultados similares a los hallados por otros autores, quienes no encontraron diferencias en los niveles de RTGB entre diferentes clases de edad de *S. merianae* (JUV vs. AD; Troiano y col., 2008). Otros estudios realizados en la tortuga terrestre argentina (*Chelonoidis chilensis chilensis*; Troiano y Silva, 1998), en el yacaré overo (*C. latirostris*) y el yacaré negro (*C. yacare*; Mussart y col., 2006), así como en la iguana verde (*Iguana iguana*; Novoa- Fajardo y col., 2008), han encontrado que la edad no influye sobre este parámetro hematológico. Casal y col. (2009) reportaron diferencias entre clases etarias en tortugas *Caretta caretta*, donde los RTGB de juveniles en condiciones de cautiverio fueron superiores a los de adultos en condiciones seminaturales. Probablemente, estas diferencias podrían adjudicarse a las diferentes condiciones de los animales estudiados. No obstante, Barboza y col. (2008) reportaron resultados opuestos, donde los valores fueron más bajos en ejemplares adultos de *C. latirostris* respecto de juveniles y subadultos estudiados en condiciones de cautiverio.

Respecto del RDGB, en esta Tesis se buscó esclarecer la clasificación leucocitaria debido a la falta de consistencia entre los trabajos reportados para la especie respecto de otras especies similares. En este trabajo fue posible obtener extendidos con tinciones que permitieron una determinación y clasificación leucocitaria precisa (ver fig. 2.10). Los resultados hallados en los valores de referencia coinciden, salvo algunas excepciones mencionadas posteriormente, con los encontrados para otras especies de reptiles. Pueden ocasionarse confusiones en las clasificaciones de algunos tipos de leucocitos, debido probablemente a las semejanzas de sus estructuras morfológicas (ver apartado 1.3.2; Capítulo 1), que se acentúan cuando la coloración no es eficiente. Por ejemplo, cuando se comparan los resultados obtenidos en esta Tesis, con los hallados para *S. merianae* por Troiano y col. (2008; 2010), aparece una diferencia respecto de los conteos relativos de las poblaciones de eosinófilos y de heterófilos; donde los autores, al contrario de lo aquí hallado, incluyen un número elevado de eosinófilos y por contraparte, un bajo número de heterófilos. Los resultados de los trabajos mencionados no concuerdan con lo reportado en otra bibliografía, donde las cantidades relativas de eosinófilos en circulación son bajas; y las cantidades de heterófilos y linfocitos son las que prevalecen en animales con estados de salud óptima. De acuerdo con estos conceptos, los resultados de la presente Tesis coinciden con lo reportado por Mayer y col. (2005) sobre este parámetro en otra especie del

Orden Squamata: *Physignathus cocincinus* (dragones de agua), donde las poblaciones de heterófilos (junto a las de linfocitos) son las más prevalentes en circulación sanguínea y las de eosinófilos son relativamente bajas.

Cuando se comparan los RDGB entre clases de edad encontramos resultados similares a los reportados por Rios y col. (2003) para *Lama guanicoe* (guanacos) donde las poblaciones de eosinófilos en los RN fueron elevadas en comparación con las de iguanas juveniles y adultas. Este resultado podría ser una consecuencia de la exposición a alérgenos presentes en el material del nido y que entran en contacto con los neonatos a partir de su nacimiento, debido a que el aumento de este tipo celular puede estar relacionado a causas alérgicas (ver apartado 1.3.2; Capítulo 1).

Respecto al número relativo de basófilos en las diferentes clases de edad, podría sugerirse que el mayor número hallado en RN esté relacionado también en respuesta a la exposición a los alérgenos presentes en el material de nido. En mamíferos, los basófilos poseen receptores de membrana específicos para la inmunoglobulina E (IgE) que es producida por células plasmáticas como respuesta a la exposición a alérgenos. El contacto con un alérgeno resulta en una rápida secreción de los gránulos de estas células, con lo que se libera histamina y otros mediadores vasoactivos y se produce una reacción de hipersensibilidad (Rigoni y col., 2018; Cuevo-Perez y col., 2014). Como se mencionaba en el Capítulo 1 (apartado 1.3.1), ante la ausencia de IgE en los genomas de los reptiles, es probable que una subclase de IgY esté mediando una respuesta alérgica de esta clase (Liguori y col., 2020). Además, ante esta exposición podrían tener la capacidad de secretar otros mediadores que pudieran atraer eosinófilos a los lugares de inflamación.

De acuerdo con lo observado en caimanes por Troiano y col. (1996) y en tortugas de tierra por Troiano y Silva (1998), el presente estudio no reveló diferencias entre las clases de edad en los valores de los otros tipos de leucocitos, mientras que Stacy y col. (2011) describieron cambios relacionados con la edad en los porcentajes de linfocitos y heterófilos en tortugas *C. caretta*. Además, Casal y col. (2009) reportaron diferencias en el RDGB entre tortugas juveniles y adultas de la especie *C. caretta*, mostrando en estas últimas un número elevado de eosinófilos.

Del mismo modo, los IL no mostraron diferencias entre los grupos de edad, determinando un valor promedio de referencia del IL para la especie de $1,67 \pm 0,53$. Como se mencionó en el apartado 2.2.1.3, el IL normalmente está definido para cada especie, de manera que variaciones o desviaciones de este valor basal pueden informar sobre efectos negativos en evaluaciones toxicológicas o de salud animal. Hasta el momento no se han reportado valores de referencia de este parámetro para ninguna otra especie de reptil; no obstante, se han informado valores de IL para el

sapito cavador o de jardín (*Rhinella fernandezae*; Cabagna Zenklusen y col., 2011) y para ejemplares de (*Rhinella arenarum*; Salinas y col. 2015).

Con respecto a los niveles de AcN, en este estudio, los títulos más altos fueron hallados en iguanas adultas en comparación con los juveniles y neonatos. Este aumento en títulos de AcN con la edad también ha sido informado en mamíferos, aves y otros reptiles (Parmentier y col., 2004; Benatuil y col., 2008; Sparkman y Palacios, 2009; Ujvari y Madsen, 2011; Zimmerman y col., 2013). Debido a que las respuestas humorales adaptativas son comparativamente más lentas y menos robustas en los reptiles respecto de los mamíferos, es posible que puedan depender en mayor medida de una respuesta alternativa facilitada por AcN (Zimmerman y col., 2010). Por esta razón, es que los reptiles parecen tener una menor dependencia de la respuesta específica de los anticuerpos compensada con un aumento en los niveles de AcN, lo que podría ser considerado como una consecuencia "positiva" de la edad en reptiles (Ujvari y Madsen, 2011; Zimmerman y col., 2018).

Se han desarrollado estudios sobre la actividad del SC en una variedad de reptiles. Se ha reportado un eficiente SC en *Alligator mississippiensis* (alligator; Merchant y col., 2005), *Crocodylus porosus* (cocodrilo marino) *C. johnstoni* (cocodrilo de agua dulce; Merchant and Britton, 2006) y *C. latirostris* (Siroski, 2011), lo que sugirió la gran importancia fisiológica que posee este sistema en términos de la protección que brinda contra varios patógenos (Siroski, 2011). En este sentido, Poletta y col. (2013) reportaron que el SC, como parte del mecanismo innato de los vertebrados ectotérmicos, es más diverso que la de los vertebrados endotermos, indicando un papel más importante de esta función inmune como mecanismo de defensa. En el presente estudio se detectó, un bajo porcentaje de máxima hemólisis en *S. merianae* en comparación con todas las especies de cocodrilianos mencionados anteriormente, pero mayores a los reportados para mamíferos y aves (Moleon y col., 2020). Sin embargo, no existe hasta el momento una caracterización detallada del SC de la iguana overa.

Por otro lado, observamos diferencias en la actividad del SC entre las clases etarias de *S. merianae*, indicando un aumento de la actividad con la edad. Este aumento podría estar relacionado con un incremento en la producción de citoquinas, en un intento de compensar una actividad disminuida en la inmunidad mediada por células y de la capacidad funcional de IgY asociadas al avance de la edad. Este argumento fue propuesto por Strasser y col. (2000), quienes reportaron resultados similares en relación a la edad en mamíferos, donde la actividad del SC fue mayor en animales adultos respecto de juveniles. En el caso de la iguana overa, esto puede tener más

relevancia si se considera que su respuesta tiene mayor dependencia del sistema inmune innato (SII).

Las diferencias encontradas entre las clases de edad (RN, JUV y AD) respecto de los niveles de eosinófilos, títulos de AcN y actividad del SC, indican la necesidad de incorporar siempre la variable “edad” o “clase etaria” en estudios donde *S. merianae* sea utilizada como especie modelo. Además, nuestros resultados apoyan la opinión de que la inmunosenescencia no debe considerarse como una reducción general de la inmunocompetencia, sino como un proceso dinámico que incluye tanto la pérdida como la ganancia en diferentes componentes del SI, por lo que deben considerarse varios componentes de este sistema cuando se analizan alteraciones dependientes de la edad (Zimmerman y col., 2018).

En relación con la variable “sexo” no se encontraron diferencias en los parámetros inmunológicos analizados. Del mismo modo, no encontraron diferencias relacionadas con el sexo en RTGB y el RDGB ni en otros parámetros bioquímicos / hematológicos en tortugas *Podocnemis expansa* (Oliveira-Júnior y col., 2009) y *Phrynops hilarii* (Latorre y col., 2015) ni en especies del género caiman (Troiano y col., 1996). En contraste, Barboza y col. (2008) informaron que los ejemplares machos de *C. latirostris* poseían niveles de leucocitos, eosinófilos, heterófilos y monocitos mayores que los de las hembras. De manera similar, Stacy y Whitaker (2000) reportaron que los recuentos totales de glóbulos blancos y de heterófilos promedio, fueron significativamente mayores en machos adultos que en hembras adultas de *Crocodylus palustris*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, el género no parece ser una variable clave para ser considerada en estudios sobre *S. merianae*.

En conclusión, en el presente trabajo se determinaron valores basales para iguana overa de seis parámetros hematológicos de importancia, donde tres de ellos mostraron diferencias entre las clases de edad, pero no entre sexos, resaltando la importancia de considerar la primera variable al momento de utilizarlos como biomarcadores inmunológicos para la especie.

CAPÍTULO 3

Evaluación del efecto individual de los plaguicidas Clorpirifos, Cipermetrina y Glifosato, y de su mezcla, sobre el desarrollo embrionario de ejemplares de *S. merianae*.



3.1 Introducción

En los últimos años la embriología de los reptiles se convirtió en un componente significativo dentro de los estudios de ecología y evolución de ese grupo de organismos (Andrews, 2004). Se ha reportado que las condiciones ambientales experimentadas por el individuo durante la embriogénesis pueden afectar las características post-natales debido a la extrema sensibilidad que poseen los embriones de reptiles a las condiciones del medio ambiente (Lungman y Piña, 2013; Furness y col., 2015). De esta manera, las características del ambiente que rodea a los embriones de reptiles pueden influir significativamente sobre la tasa de desarrollo y el éxito de eclosión de los mismos, así como sobre su fenotipo, rendimiento funcional y la aptitud de su descendencia (Deeming 2004). Estas características pueden ser determinadas por factores de origen natural o antrópico, siendo estos últimos, capaces de producir mayor impacto sobre los embriones de reptiles debido a su impredecibilidad, frecuencia y duración.

En capítulos anteriores se ha mencionado la alta exposición a plaguicidas que poseen los reptiles, ya sea por contacto, ingestión, inhalación, exposición dérmica, transferencia materna hacia los huevos y/o absorción por parte de éstos desde los ambientes circundantes (Rich y Talent, 2009; Siroski y col., 2017). Particularmente, el principal problema para la salud de las poblaciones silvestres de reptiles, es la coincidencia de su temporada de reproducción (primavera y verano), con el período de máxima aplicación de plaguicidas en las áreas cultivadas, lo que implica un riesgo alto de contaminación, especialmente importante en el desarrollo de embriones y neonatos (Burella y col., 2017). Los reptiles, con algunas excepciones, suelen depositar sus huevos en nidos subterráneos, excavados en la tierra o arena, revestidos con material orgánico o sustratos similares, por lo que el desarrollo embrionario se puede ver afectado, entre otros factores, por contaminantes ambientales presentes en el material de nido o en el sustrato (de Solla y Martin 2011; Wu y col., 2016). En este último caso, la exposición podría ocurrir a partir de los compuestos disueltos en fase acuosa en el sustrato, o de aquellos en fase gaseosa a través del intercambio con el aire (Marco y col., 2004).

Finalmente, independientemente de cuál sea la vía de ingreso al embrión, podría sostenerse que la potencial exposición a contaminantes desde su desarrollo dentro del huevo, y a lo largo de su vida, podría dar como resultado procesos de bioacumulación (Milnes y col., 2005; de Solla y Martin, 2011). Esta situación se agrava en Argentina si se tiene en cuenta que una importante proporción de las áreas donde habita S.

merianae, son compartidas con campos con una actividad agrícola intensa (ver apartado 1.2.3; Capítulo 1).

Por otra parte, las hembras de iguana overa producen huevos con una cáscara relativamente permeable que permite el intercambio de agua y gases para cubrir la demanda embrionaria (ver apartado 1.2.1; Capítulo 1); de ese modo, los contaminantes pueden ser transferidos hacia el interior de los huevos. Muchas evidencias demuestran que los organismos ovíparos a menudo exhiben una mayor sensibilidad toxicológica a los contaminantes químicos en sus etapas tempranas de vida (Russell y col., 1999; Burella y col., 2017). En este contexto, en una evaluación de riesgo toxicológico de un ambiente particular, se considera fundamental el conocimiento de la exposición a contaminantes durante el desarrollo embrionario de los individuos (Poletta y col., 2009).

Algunos estudios han demostrado efectos de una variedad de plaguicidas durante el desarrollo embrionario en ejemplares de diferentes especies. Se han reportado efectos tóxicos de diferentes plaguicidas organoclorados en embriones de aligátor americano (*Alligator mississippiensis*; Rauschenberger y col., 2004), de cipermetrina, endosulfan y glifosato en los de yacaré overo (*Caiman latirostris*; López González y col., 2017), así como del neonicotinoide tiametoxam sobre el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*; García y col., 2018). Además, se han hallado efectos dependientes del momento de exposición en diferentes especies: Bunn y col. (2001) reportaron efectos tóxicos sobre las diferentes etapas de desarrollo embrionario en ratas Sprague-Dawley expuestas a plomo; Howe y col. (2004) evaluaron la toxicidad de tres formulaciones de Glifosato en ejemplares de cuatro especies de anfibios: rana verde (*Rana clamitans*), leopardo del norte (*R. pipiens*), rana de madera (*R. sylvatica*), y el sapo americano (*Bufo americanus*); y Mensah y col. (2011) encontraron diferentes efectos del Glifosato Roundup® según la etapa de desarrollo en camarones de agua dulce (*Caridina nilotica*).

Los individuos en la etapa de vida embrionaria, también deben mantener un sistema inmune funcional para protegerse de cualquier sustancia ajena al organismo. Actualmente, se cuenta con escasa información acerca de la sensibilidad de la función inmune embrionaria a las condiciones ambientales (Brusch y de Nardo, 2019).

El objetivo de este capítulo fue evaluar los efectos inmunotóxicos individuales de los plaguicidas ampliamente usados en Argentina -Glifosato (GLI), Clorpirifos (CPF) y Cipermetrina (CIP)-, y de su mezcla terciaria en embriones de *S. merianae*, para evaluar el riesgo potencial asociado a la exposición *in ovo* en el entorno natural de la especie y sus posibles efectos estadio-dependientes.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Colecta de huevos de *S. merianae*

Este estudio se enmarca en el Proyecto de uso sustentable PI (ver apartado 1.2.2, Capítulo 1) que posee como uno de sus pilares esenciales la participación de los pobladores locales. Estas personas están involucradas en diferentes tareas como la identificación de nidos, la recolección de huevos, actividades logísticas para la reintroducción de animales en sus entornos naturales, entre otras (Siroski y col., 2017; apartado 1.2.2; Capítulo 1). Todos los años, los pobladores identifican los nidos de iguanas aproximadamente en el mismo período; sin embargo, los eventos reproductivos de estos animales están sujetos a numerosas variables, principalmente a las variables climáticas. Este estudio se realizó en dos temporadas reproductivas consecutivas. En el primer año, la temporada reproductiva fue más temprana que la siguiente. Por estos motivos se llevaron a cabo los ensayos empleando huevos de *S. merianae* en dos diferentes etapas del desarrollo embrionario: al comienzo (3-5 días) y a la mitad (33 días) del mismo. Los resultados de ambas exposiciones fueron comparados para evaluar posibles diferencias en los efectos tóxicos sobre embriones expuestos durante distintos momentos del desarrollo embrionario. Esta comparación nos permitió obtener resultados muy interesantes, que están en relación con lo que realmente sucede en la naturaleza.

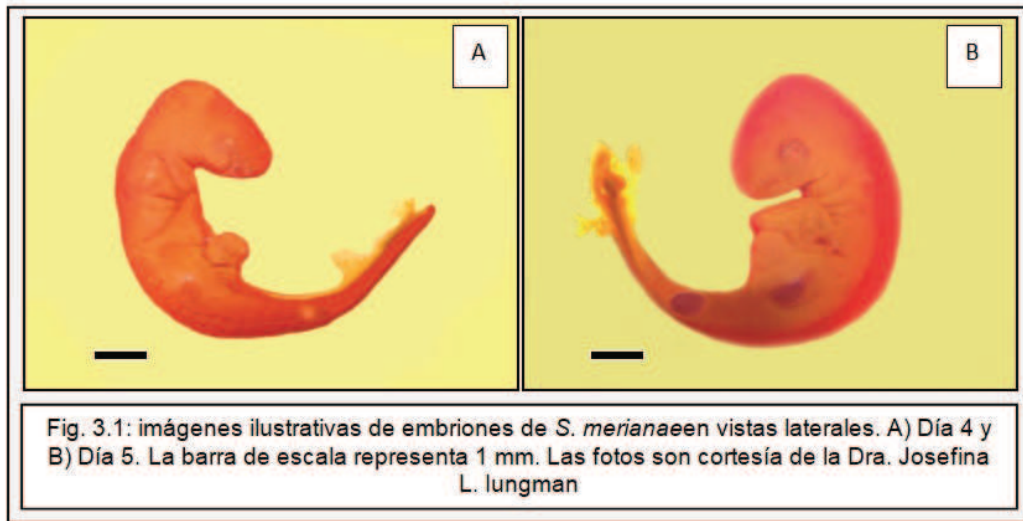
Cabe destacar que las condiciones de incubación y exposición en ambos experimentos fueron cuidadosamente controladas y se mantuvieron exactamente iguales.

Los huevos que se utilizaron en estos ensayos fueron recolectados en la Reserva Natural Gestionada "El Fisco" ubicada en la Provincia de Santa Fe, Argentina; correspondiente a un Área Natural Protegida (ver Fig. 2.3; Capítulo 2).

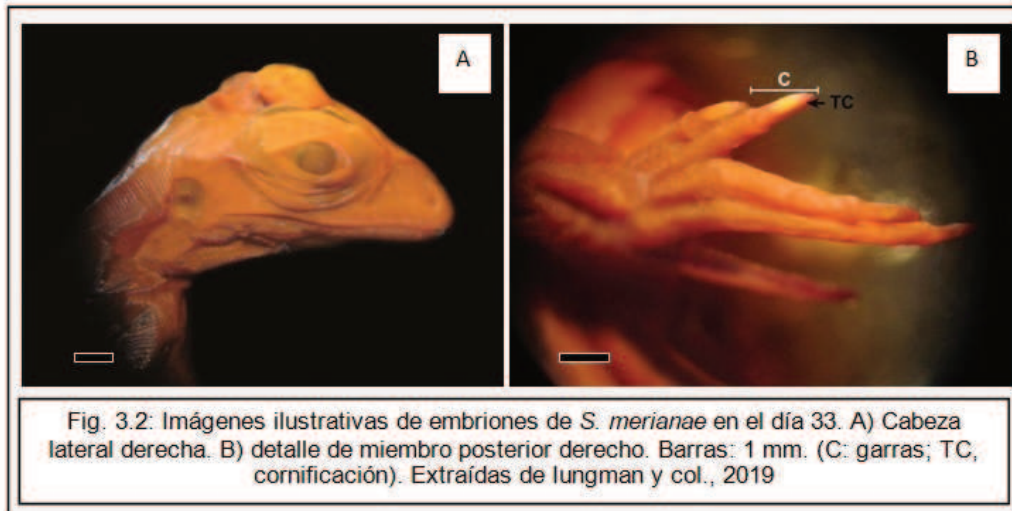
3.2.2 Determinación de las etapas embrionarias en *S. merianae*

Para llevar a cabo este estudio se consideró un sistema codificado de etapas embrionarias que permite la caracterización y comparación de diferentes fases de desarrollo bajo condiciones de incubación mencionadas anteriormente. La determinación de las etapas de desarrollo en la que se encontraban los embriones de *S. merianae* en los huevos recolectados, se realizó a partir de un huevo de cada nido siguiendo la metodología propuesta por lungman y col. (2019). Las etapas embrionarias fueron determinadas por las siguientes características morfológicas del embrión:

-Embrión de 3-5 días (Fig. 3.1): en esta etapa de desarrollo el embrión está completamente cubierto de amnios. A partir del cuarto día, comienzan a diferenciarse distintas partes faciales, entre ellas, las vesículas ópticas. Respecto de la flexión y rotación, a los 3 días de desarrollo la torsión corporal ya comenzó, pero la mitad caudal todavía se encuentra en la membrana de la cáscara de huevo. A los cuatro días del desarrollo el embrión toma una forma de "J" y al quinto día, una forma de "U". En cuanto a las extremidades, comienzan a aparecer en el día 3 como pequeñas condensaciones que constituyen primordios de miembros anteriores y posteriores.



-Embrión de 33 días de desarrollo (Fig. 3.2): se observa un desarrollo de los huesos faciales que hace que la cabeza se vea aplanada en vista dorsoventral. Ya resulta evidente la expansión del hocico y un incremento en la rigidez del mismo. Ambos párpados poseen ahora un ancho regular con un final afilado. La lengua es desarrollada y bífida. Una serie de denticulos aparece bordeando la mandíbula superior. Las garras de los dedos han comenzado su cornificación en las extremidades anteriores (Fig. 3.2 B).



3.2.3 Diseño experimental

En ambos experimentos se siguió el mismo procedimiento y se utilizaron los mismos materiales para la exposición de los embriones de *S. merianae* a los diferentes plaguicidas. La exposición *in ovo* se realizó por aplicación tópica en la superficie superior vascularizada de los huevos (Fig. 3.3). Una vez que la solución fue absorbida, los huevos se colocaron sobre una base de vemiculita y se cubrieron con material vegetal húmedo, obtenido de áreas alejadas de cualquier fuente de contaminantes, para simular las condiciones naturales de incubación dentro del nido.



Los huevos provenientes de cuatro diferentes nidos se repartieron equitativamente en diferentes bandejas, cada una de las cuales correspondía a un tratamiento distinto. Se incluyeron tres huevos de cada nido por tratamiento para poder evaluar estadísticamente el “efecto nido”. Este efecto es uno de los principales factores que introducen variabilidad y consiste en la influencia de factores genéticos, así como del entorno de incubación, en los rasgos fenotípicos de los animales.

Las formulaciones químicas empleadas en los dos ensayos de topicación fueron: Roundup Full II® (66.2% glifosato, GLI-RU), Clorpirifos Nufarm® (48% clorpirifos, CPF) y Cipermetrina Atanor® (25% cipermetrina, CIP). Además, el segundo año se incorporó la formulación de Panzer Gold® (60.8% glifosato, GLI-PZ) para comparar sus posibles efectos con respecto a la otra formulación a base de Glifosato. Roundup Full II (RU) es un herbicida líquido soluble en agua (12,000 mg/l), que contiene glifosato potásico [N-

(fosfonometil) glicina sal monopotásica, C₃H₇KNO₅P] como su principio activo (p.a.). Panzer Gold® (Dow Agrosiences) 60,8% (p/v) es una sal de dimetilamina - [N-(fosfonometil) glicina] perteneciente al grupo de herbicidas. CPF Nufarm es un insecticida líquido insoluble en agua (2 mg/l) (O, O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato). CIP Atanor es un líquido insoluble en agua (0,01 mg/l) y consiste en una mezcla de diferentes isómeros de cipermetrina (C₂₂H₁₉Cl₂NO₃).

Este es el primer estudio llevado a cabo en huevos de iguana overa topicados con los insecticidas CPF y CIP. Por esta razón se utilizaron concentraciones subletales probadas en una especie cercana (*C. latirostris*) (Poletta y col., 2009). En el segundo año, se usaron solo las concentraciones efectivas encontradas en el primer año para *S. merianae*; es decir, aquellas concentraciones a las cuales un efecto tóxico había empezado a ser evidente en esta especie. En cambio, para la aplicación de las formulaciones de GLI, se consideraron las concentraciones efectivas descritas por Schaumburg y col. (2016) que causaron efectos genotóxicos en los embriones de *S. merianae*.

Teniendo en cuenta que los huevos de *S. merianae* poseen la mitad del tamaño de los huevos de *C. latirostris*, el volumen final de plaguicidas aplicados en nuestros experimentos fue de 25 µl / huevo, (siguiendo los protocolos de Schaumburg y col. 2016), que es la mitad del volumen de tóxicos aplicados por Poletta y col. (2009) en huevos de *C. latirostris*. Estas cantidades son las máximas que pueden ser aplicadas por topicación sobre las cáscaras de los huevos de manera de lograr la absorción de los plaguicidas sin que se derrame fuera de la superficie de los mismos.

El primer año, cuando la aplicación tópica se realizó a los 33 días del desarrollo del embrión, un total de 132 huevos provenientes de 4 nidos, de los cuales se utilizaron 33 huevos de cada uno, se distribuyeron en 11 grupos experimentales (tabla 3.1): 1 control negativo (CN: agua destilada no clorada), 1 control de vehículo (CV: etanol) y 9 tratamientos: 3 grupos expuestos a la formulación de GLI-RU (200, 400 y 800 µg / huevo), 3 para la formulación de CIP (10, 100 y 1000 µg / huevo) y las otras 3 para la formulación de CPF (10, 100 y 1000 µg / huevo). Debido a la insolubilidad de los insecticidas CIP y CPF en el agua, se usó como diluyente etanol (C₂H₆O), razón por la cual este alcohol se incluyó como control de vehículo para descartar su posible efecto sobre los parámetros analizados.

Tabla 3.1: Grupos experimentales de <i>S. merianae</i> expuestos a formulaciones de plaguicidas basadas en clorpirifos, cipermetrina y glifosato durante su desarrollo embrionario.				
GRUPO EXPERIMENTAL	COMPUESTO	CONCENTRACION	N° DE HUEVOS / NIDO	N° DE HUEVOS / GRUPO EXPERIMENTAL
CONTROL NEGATIVO (CN)	Agua destilada	-	3	12
CONTROL DE VEHICULO (CV)	Etanol	96 %	3	12
TRATAMIENTO 1 (CPF 10)	Clorpirifos	10 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 2 (CPF 100)	Clorpirifos	100 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 3 (CPF 1000)	Clorpirifos	1000 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 4 (CIP 10)	Cipermetrina	10 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 5 (CIP 100)	Cipermetrina	100 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 6 (CIP 1000)	Cipermetrina	1000 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 7 (RU 200)	Roundup	200 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 8 (RU 400)	Roundup	400 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 9 (RU 800)	Roundup	800 µg/ huevo	3	12

En el segundo año, cuando se realizó la aplicación tópica sobre huevos con embriones de entre 3 y 5 días de desarrollo, un total de 156 huevos provenientes de 4 nidos, de los cuales se utilizaron 39 huevos de cada uno, se distribuyeron en 13 grupos experimentales (tabla 3.2): 1 control negativo (CN: agua destilada no declarada); 1 control de vehículo (CV: etanol) y 11 tratamientos con diferentes formulaciones. Seis grupos fueron expuestos a formulaciones de GLI: 3 se trataron con GLI-RU (200, 400 y 800 µg / huevo) y los otros 3 con GLI-PZ (200, 400 y 800 µg / huevo); 2 grupos fueron expuestos a CIP (100 y 1000 µg / huevo); y 2 grupos con CPF (100 y 1000 µg / huevo). Como se mencionó, las concentraciones de los insecticidas (CIP y CPF) empleadas fueron las efectivas del año precedente. Finalmente, 1 grupo experimental se expuso a una mezcla de las 3 formulaciones en su concentración más baja (GLI-RU 200, CIP 100 y CPF 100 µg / huevo). En este último caso, alícuotas iguales de cada una de estas concentraciones preparadas para su aplicación individual, fueron

mezcladas antes de la topicación, y la mezcla fue aplicada en un volumen final de 25 µl / huevo.

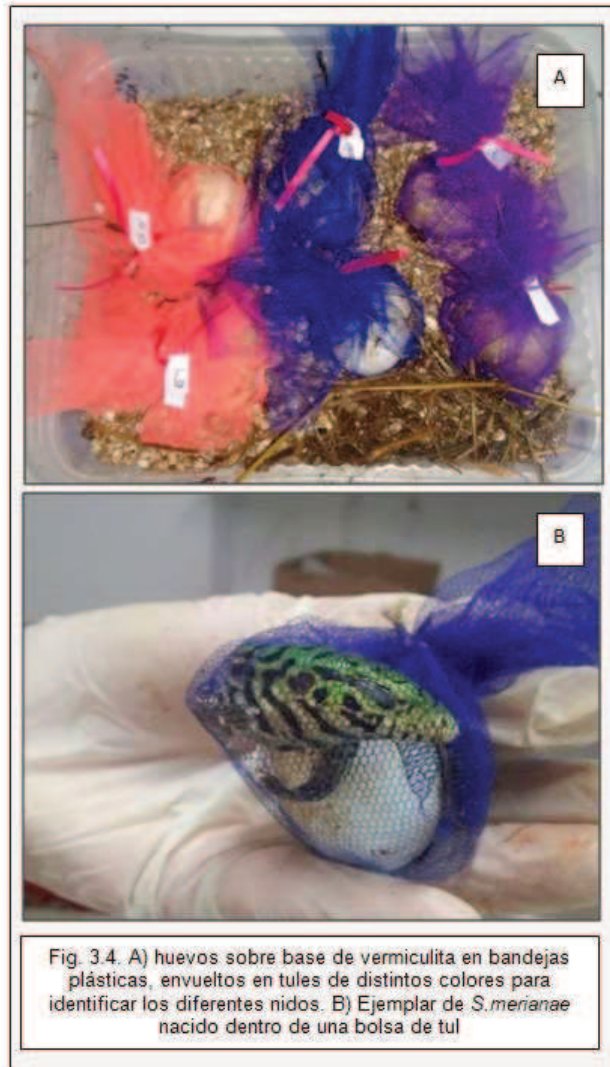
Tabla 3.2: Grupos experimentales de <i>S. merianae</i> expuestos a formulaciones de plaguicidas basadas en clorpirifos, cipermetrina y glifosato y su mezcla terciaria durante su desarrollo embrionario.				
GRUPO EXPERIMENTAL	COMPUESTO	CONCENTRACION	N° DE HUEVOS / NIDO	N° DE HUEVOS / GRUPO EXPERIMENTAL
CONTROL NEGATIVO (CN)	Agua destilada	-	3	12
CONTROL DE VEHÍCULO (CV)	Etanol	96%	3	12
TRATAMIENTO 1 (CPF 100)	Clorpirifos	100 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 2 (CPF 1000)	Clorpirifos	1000 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 3 (CIP 100)	Cipermetrina	100 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 4 (CIP 1000)	Cipermetrina	1000 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 5 (RU 200)	Roundup	200 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 6 (RU 400)	Roundup	400 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 7 (RU 800)	Roundup	800 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 8 (PZ 200)	Panzer Gold	200 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 9 (PZ 400)	Panzer Gold	400 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 10 (PZ 800)	Panzer Gold	800 µg/ huevo	3	12
TRATAMIENTO 11 (MEZCLA)	RU, CIP Y CPF	RU 200, CIP 100 Y CPF 100 µg/huevo	3	12

3.2.4 Incubación artificial

Para la construcción de la incubadora se siguió la metodología empleada por Lungman y col. (2008). Se utilizaron bateas plásticas de alta resistencia con capacidad de 150 litros (ver Fig. 1.11 A, Capítulo 1), con tapa y paredes recubiertas con planchas de poliuretano expandido (telgopor). Dicho recipiente contuvo hasta 20 cm de agua calefaccionada por un calentador electrónico de acuario, y la temperatura se mantuvo estable por medio de un termostato. Como se mencionó anteriormente, los huevos se

colocaron en bandejas plásticas sobre una base de vermiculita hidratada y se cubrieron con material de nido (pasto) hidratado. Estas bandejas quedaron separadas del agua por material plástico; y se posicionaron en una sola capa para evitar que existan diferencias de temperatura o humedad entre los huevos de cada bandeja (Ewert y Nelson, 2003). Para conservar la humedad se roció el material de nido periódicamente con agua y la estabilidad de la temperatura se verificó diariamente mediante un almacenador de datos Hobo Temp (Onset Computer Corporation, Pocasset, MA, U.S.A.).

Para cada ensayo experimental, el tiempo de incubación artificial de los huevos dependió de la etapa de desarrollo en la cual fueron colectados dichos huevos. El mismo día que fue determinado el desarrollo embrionario de cada nido, se realizó la exposición tópica con los respectivos plaguicidas y el inicio de la incubación artificial. Esta especie tiene un tiempo promedio de incubación total de 60 ± 5 días (lungman y col., 2019) en condiciones de temperatura controlada a $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) y humedad menor al 20%. Luego de la aplicación tópica de los plaguicidas, cada huevo fue envuelto en una porción de tela de tul de un color específico para su individualización según el nido de procedencia (Fig. 3.4 A). De esta forma, una vez nacidos, los animales quedaron retenidos en estos tules y fue posible identificarlos (Fig. 3.4 B). Después de la eclosión, los animales se identificaron individualmente a través de sus manchas ventrales (ver Fig. 2.8, Capítulo 2).



Finalmente, además de controlar las variables mencionadas durante la incubación, se fueron descartando y registrando los huevos no eclosionados, así como la fecha de los nacimientos y de las muertes embrionarias según el caso. De esta manera, se pudo determinar los días de incubación artificial de cada animal, considerando como día 1, el día que fueron incluidos en las incubadoras luego de ser topicados con los correspondientes plaguicidas.

El porcentaje de mortalidad embrionaria (% ME) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ME} = \text{NME} / \text{NHT} \times 100$$

Donde:

NME: número de muertes embrionarias por tratamiento

NHT: número de huevos totales por tratamiento

3.2.5 Toma de muestras

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron a partir de la vena caudal de los animales dentro de las 24 horas posteriores al nacimiento (Olson y col., 1977) empleando jeringas heparinizadas (25g × 5/8 'aguja). Considerando el tamaño promedio de los ejemplares recién nacidos, fue extraído un volumen de sangre por animal menor a 1 ml (Fig. 3.5).



3.2.6 Medición de los parámetros inmunológicos

Se utilizaron pequeñas alícuotas de la sangre recogida para realizar RTGB, RDGB y la determinación del índice de Lobularidad y H / L (35 µl en total). La muestra restante (75 µl) se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min y se almacenó a -80 °C hasta su utilización en la determinación de los títulos de AcN (Siroski y col., 2016). Los detalles de cada metodología fueron desarrollados en el apartado 2.2.1.1 (Capítulo 2).

3.2.7 Medición de tamaños corporales

Todos los animales fueron pesados empleando balanza electrónica de 0,1 gr de precisión (OHAUS® Compact scale CS200), y medidos en su longitud Hocico-Cloaca (LHC) con cinta métrica (0,1 cm de precisión) dentro de las 24 horas de nacidos, a los tres y seis meses de edad, con el objetivo de evaluar los posibles efectos de los plaguicidas en el crecimiento de los animales.

3.2.8 Análisis estadísticos

Los valores medios de los datos de cada tratamiento para cada parámetro inmunológico, fueron sometidos a pruebas de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene y de normalidad utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Debido a que estos datos no cumplieron con los mencionados supuestos, fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Mann-Whitney. Para analizar las diferencias en el retraso en los nacimientos entre tratamientos y nidos, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. Las diferencias fueron consideradas significativas con un $p < 0,05$. Todos los datos se informaron como media \pm el error estándar (EE). Los datos correspondientes a los diferentes tratamientos se compararon con los grupos control (CN y CV).

3.3 Resultados

3.3.1 Efectos tóxicos evaluados en embriones provenientes de huevos topicados con plaguicidas aplicados individualmente.

Exposición a los 33 días del desarrollo embrionario:

El RTGB (número de leucocitos / mm^3) no reveló diferencias significativas entre los animales expuestos a los diferentes compuestos (GLI-RU, CIP y CPF) en relación con los grupos control (CN y CV).

En el RDGB, se encontraron diferencias en las cantidades relativas de algunos tipos de células ($\text{cél}/\text{mm}^3$) en algunos tratamientos en relación con los controles. En este sentido, la población de heterófilos disminuyó en CIP100 con respecto a CV ($p = 0,016$) y en RU400 en relación con CN ($p = 0,010$) (Fig. 3.6); la población de linfocitos aumentó en RU400 con respecto a CN ($p = 0,05$) (Fig. 3.7); y el índice H / L disminuyó en RU400 con respecto a CN ($p = 0,03$) (Fig. 3.8).

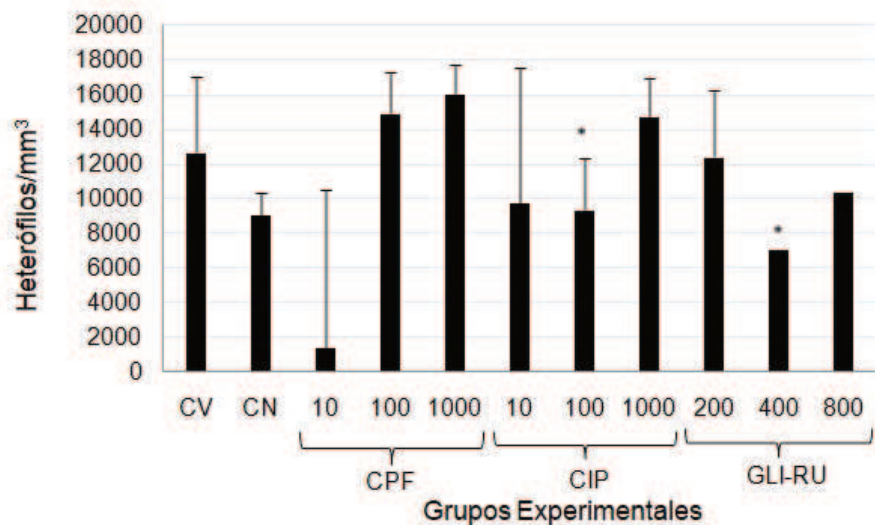
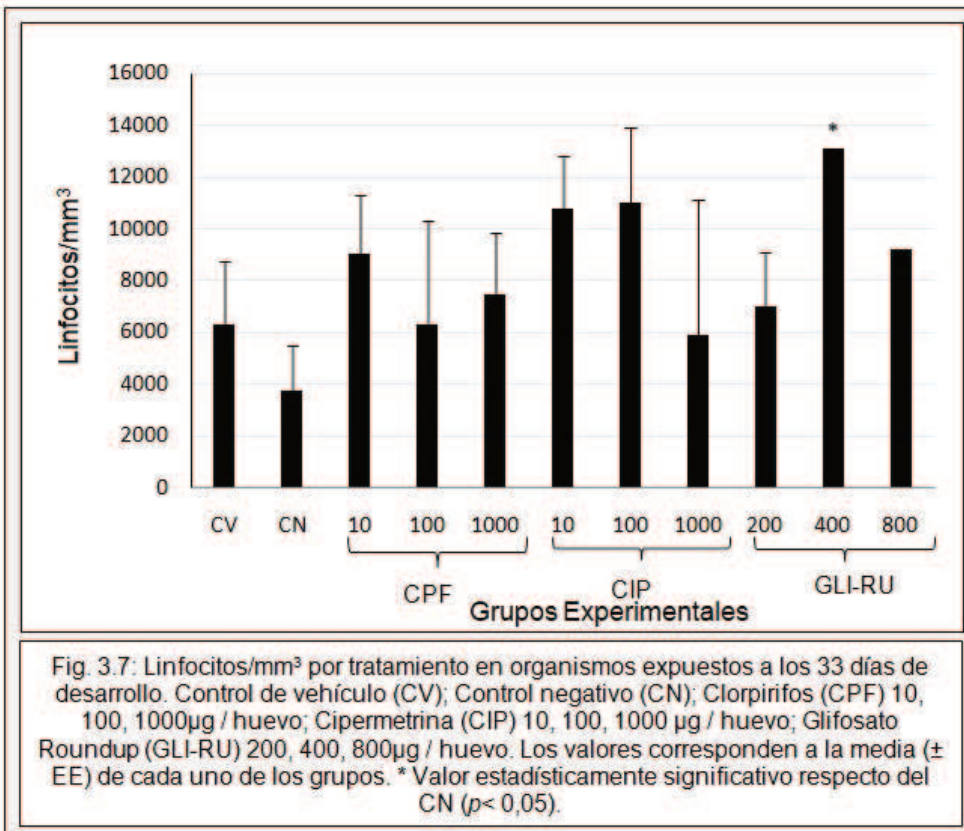
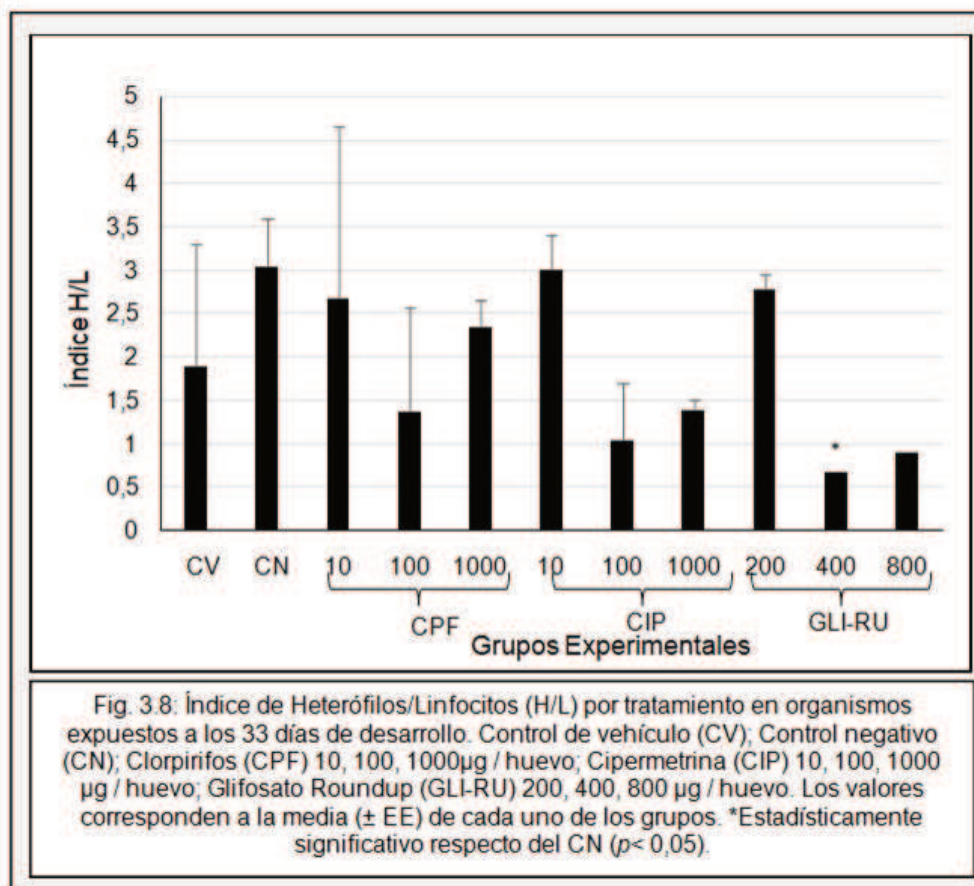
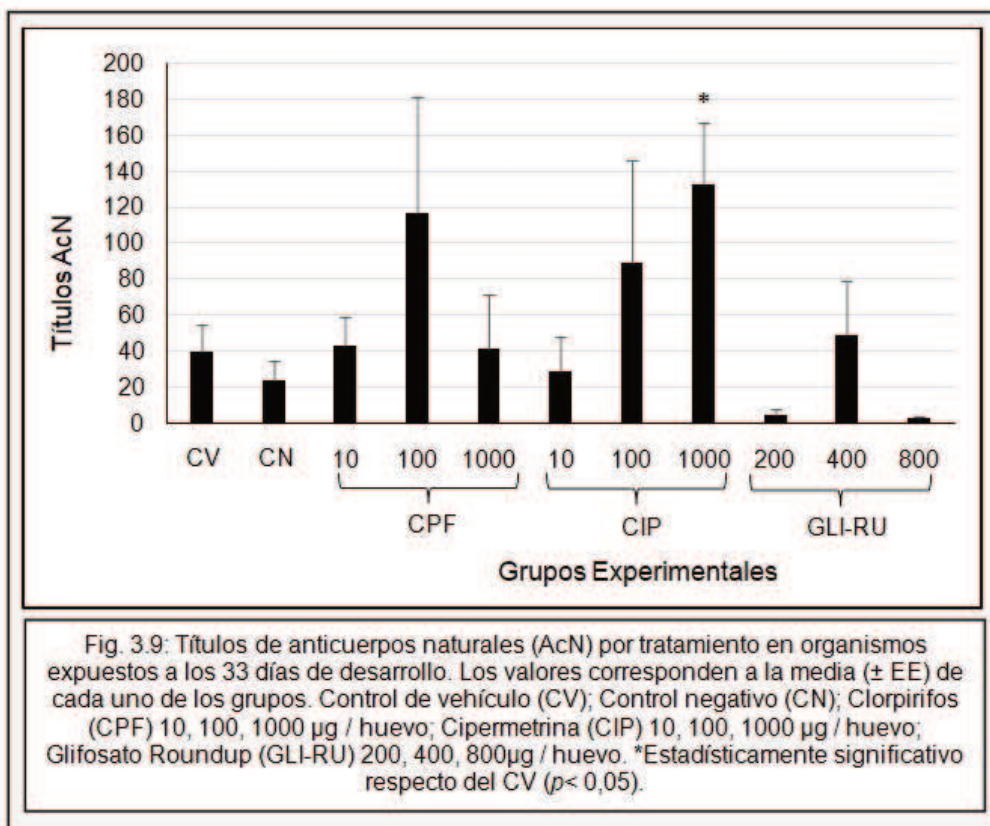


Fig. 3.6: Heterófilos/mm³ por tratamiento en organismos expuestos a los 33 días de desarrollo. Control de vehículo (CV); Control negativo (CN); Clorpirifos (CPF) 10, 100, 1000 µg / huevo; Cipermetrina (CIP) 10, 100, 1000 µg / huevo; Glifosato Roundup (GLI-RU) 200, 400, 800 µg / huevo. Los valores corresponden a la media (± EE) de cada uno de los grupos. *Valor estadísticamente significativo respecto del control correspondiente ($p < 0,05$).





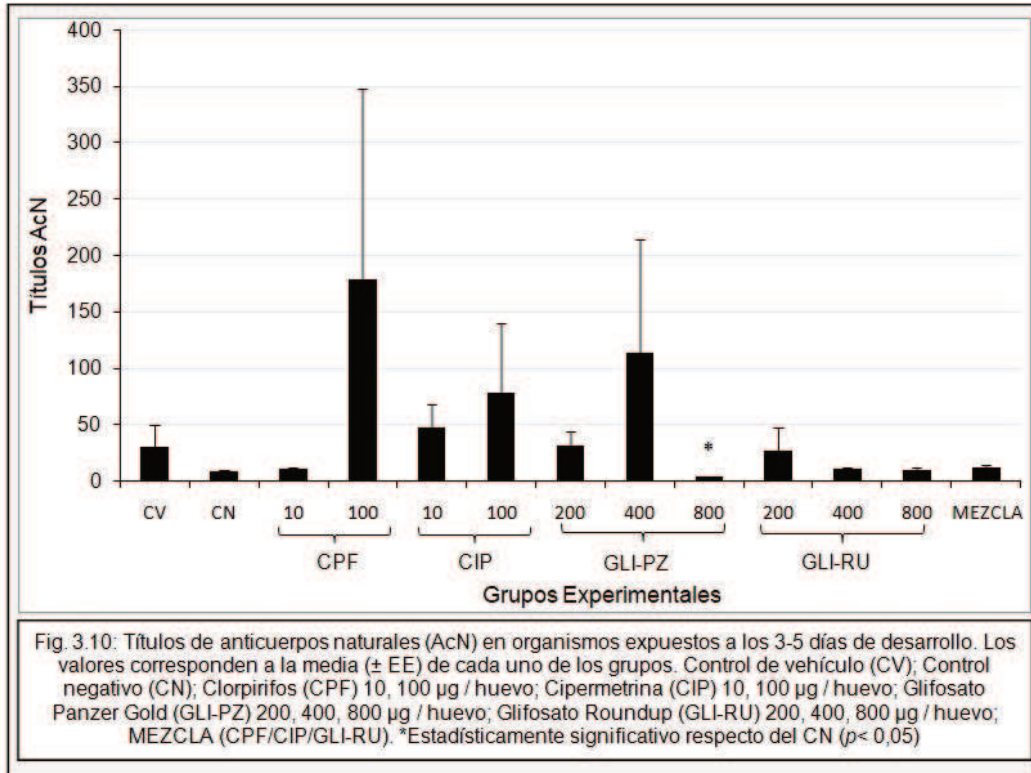
Por otra parte, ni el IL ni los valores correspondientes a los demás tipos de leucocitos analizados, mostraron diferencias en relación a los controles. Con respecto a los valores de los títulos de AcN, éstos fueron mayores en los animales expuestos a la concentración más alta de CIP (1000 µg / huevo) en relación con el CN ($p = 0,007$) (Fig. 3.9). No se encontraron diferencias en otros tratamientos (CPF y RU) con respecto a los controles en este parámetro.



Exposición a los 3-5 días del desarrollo embrionario:

No se encontraron diferencias en la mayoría de los parámetros inmunológicos analizados en animales expuestos al comienzo de su desarrollo embrionario, con respecto a los individuos del grupo control. Sin embargo, los títulos de AcN disminuyeron en los animales expuestos con el tratamiento con PZ800 respecto a CN ($p = 0,020$; Fig. 3.10).

En contraposición, los niveles de AcN no mostraron diferencias en los animales expuestos a RU800 con respecto al CN, revelando diferencias en la respuesta inmunitaria de los animales expuestos a dos formulaciones de GLI diferentes. Los animales expuestos a los otros tratamientos con PZ (200 y 400) no revelaron diferencias en los parámetros analizados con respecto a los controles.



3.3.2 Efectos de los plaguicidas aplicados en mezcla sobre los parámetros inmunológicos

Para el experimento realizado en el segundo año, se utilizaron las concentraciones efectivas determinadas el año precedente de cada compuesto, tanto para una nueva exposición individual en otra etapa del desarrollo embrionario, como para analizar los posibles efectos de los plaguicidas cuando son aplicados en forma combinada. Así, las menores concentraciones a las cuales se habían encontrado efectos inmunotóxicos de cada plaguicida, fueron mezcladas en este segundo ensayo experimental. Dicho tratamiento fue comparado con el grupo control y los resultados no revelaron diferencias en ninguno de los parámetros inmunológicos analizados. De este modo, exposiciones a los mismos plaguicidas (GLI, CPF y CIP) provocaron diferentes respuestas según fueron aplicados individual o conjuntamente.

3.3.3 Efectos de los plaguicidas sobre la duración del desarrollo embrionario y el éxito de eclosión

Respecto del tiempo promedio de incubación, que como se ha mencionado (apartado 3.2.4) es de 60 ± 5 días para la especie, los resultados de los dos ensayos experimentales mostraron un promedio de 55 ± 4 días de desarrollo total en los

animales control (calculado mediante la suma de los días de incubación artificial + el desarrollo embrionario al momento de la colección de los huevos).

En ninguno de estos dos experimentos se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a los controles, en la duración del desarrollo embrionario. Esto significa que la mayoría de los animales analizados en ambos experimentos nacieron luego de la misma cantidad promedio de días de incubación artificial. De la misma manera, las muertes registradas fueron, en promedio, similares entre los tratamientos.

No obstante, en el primer año se registraron nacimientos más tardíos a partir de huevos topicados con CIP100 y 1000, CPF100 y 1000 y GLI-RU800 respecto de los huevos del mismo nido repartidos en los demás tratamientos. Además, en el primer ensayo experimental, en relación al éxito de eclosión, se observó un mayor número de muertes de embriones expuestos a algunas concentraciones de los plaguicidas testeados en este experimental, respecto de los controles. En ambos casos estas diferencias no tuvieron significancia estadística pero se hace la mención debido a su relevancia biológica.

3.3.4 Efectos de los plaguicidas sobre el crecimiento

Las mediciones del tamaño corporal no revelaron diferencias entre los grupos experimentales dentro de las 24 horas posteriores al nacimiento ni a los tres y seis meses de edad. De esta manera, las medidas registradas del peso y la longitud hocico-cloaca, resultaron similares para todos los animales analizados en cada uno de los tres períodos. Esto estaría indicando, una ausencia de efectos de los distintos plaguicidas aplicados individualmente y en mezcla, sobre estos parámetros de crecimiento en animales recién nacidos y neonatos, expuestos durante su desarrollo embrionario.

3.4 Discusión

En el presente estudio simulamos una de las vías posibles de exposición ambiental a plaguicidas que pueden experimentar ejemplares de *S. merianae* en su área de distribución. Dentro de las ya mencionadas vías de ingreso de plaguicidas (apartado 3.1), la transferencia materna y la exposición a través del contacto con el material de nido durante la incubación (Marco y col., 2004) son especialmente importantes en ejemplares de iguana overa, debido a que las hembras arman sus nidos con materiales extraídos de las tierras lindantes a sus sitios de anidación, que están continuamente expuestos a plaguicidas. A pesar de que la aplicación directa de plaguicidas en los nidos de iguanas no representa una situación común, esta constante exposición durante la incubación podría causar efectos acumulativos en los embriones (Freeman y Rayburn, 2004). De Solla y Martin (2011) reportaron que los huevos de la tortuga *Chelydra serpentina* pueden absorber fácilmente plaguicidas de una amplia gama de características físicas y químicas, tanto a través del suelo como de sustratos acuosos (por ejemplo, cuando el suelo se satura de agua). Estos autores además explican que es posible que la absorción de plaguicidas solubles en agua en los huevos se vea reforzada por altas presiones de vapor y que particularmente, los plaguicidas de uso actual parecen penetrar más fácilmente en los huevos que los plaguicidas organoclorados más lipofílicos usados anteriormente en el sistema agropecuario.

Teniendo en cuenta estos diferentes factores: la importancia ecológica del equilibrio del agua en la composición del huevo, la elevada exposición y capacidad de absorción de plaguicidas por parte de los huevos, y los efectos tóxicos observados en embriones expuestos (apartado 3.1), así como el papel vital de la función inmune durante la etapa embrionaria (Brusch y de Nardo, 2019), es que en este trabajo nos propusimos evaluar los efectos inmunotóxicos en los embriones provenientes de huevos topicados con diferentes plaguicidas.

Los ejemplares bajo las condiciones de exposición evaluadas en este estudio, mostraron diferentes alteraciones inmunológicas, dependiendo de la etapa de desarrollo del embrión en el momento de la exposición a plaguicidas, y del tipo y concentración del plaguicida evaluado.

Cuando la aplicación tópica se realizó en animales de 33 días de desarrollo embrionario, el RDGB mostró diferencias en el número relativo de algunos tipos de células con respecto a los controles. Los grupos tratados con GLI-RU y CIP revelaron cambios numéricos en las poblaciones de heterófilos y de linfocitos, así como en el índice H/L.

Respecto de la población de heterófilos, encontramos resultados similares a los informados por Maitra y Nath (2014), quienes estudiaron peces de la especie *Heteropneustes fossilis* contaminados con urea, ya que en este trabajo los heterófilos mostraron una disminución en la mayoría de los animales expuestos a las diferentes concentraciones de CIP y GLI-RU, lo que indica un efecto negativo de estos plaguicidas sobre la producción o circulación de este tipo de leucocitos. Se ha propuesto que un factor estresante severo (como en este caso puede ser la exposición a estos compuestos; ver apartado 1.6.2, Capítulo 1) puede causar una disminución de la población de heterófilos (heteropenia), así como un aumento de linfocitos en la circulación periférica (linfocitosis), lo que resulta en una baja relación H/L (Müller y col., 2011). Los animales expuestos durante esta etapa del desarrollo embrionario (33 días) a GLI-RU 400 mostraron esas tres respuestas, mientras que en el caso de CIP 100 las diferencias fueron significativas solo para la población de heterófilos, que presentaron menores valores en relación al CV.

En el primer estudio, los embriones expuestos a los 33 días del desarrollo a formulaciones de CIP mostraron los mayores niveles de AcN respecto de su control. Según el informe de Binder y col. (2005), los AcN generalmente se consideran "polirreactivos" porque se unen a varios antígenos (propios o extraños). Este patrón de amplia reactividad de los AcN podría sugerir que alteraciones fisiológicas causadas por condiciones de estrés podrían volverse especialmente importantes. Plumb y Areechon (1990) expusieron ejemplares de peces (*Ictalurus punctatus*) a 0,5 y 1,75 mg/l de malatión (insecticida), y observaron que los títulos de AcN en los peces expuestos a la concentración más alta de malatión eran más bajos que los del control y que los expuestos a 0,5 mg/l. Por otro lado, otro estudio realizado en aves expuestas a plomo reportaron una tendencia al aumento de los niveles de títulos de AcN (Vermeulen y col., 2015), lo que parece indicar efectos contrarios sobre este parámetro tras la exposición a diferentes compuestos tóxicos. A pesar de los escasos antecedentes de trabajos que analicen este parámetro, los resultados de este y otros capítulos, han demostrado la utilidad de evaluarlo como marcador de inmunotoxicidad. En los animales expuestos durante el inicio del desarrollo embrionario (3/5 días de desarrollo), no se encontraron diferencias entre los tratamientos en la mayoría de los parámetros evaluados. Esta diferencia en la respuesta entre animales expuestos a diferentes etapas del desarrollo embrionario, podría ser una consecuencia de la falta de desarrollo en algunos órganos o sistemas de los animales topicados a los 3/5 días; o bien debido al mayor tiempo que tuvieron estos embriones para corregir los efectos causados por la exposición a través de mecanismos de reparación (Burella y col., 2017). Similares resultados han sido reportados por Bunn y col. (2001), quienes

observaron mayores efectos inmunotóxicos inducidos por plomo, en embriones de ratas expuestos en una fase gestación más tardía respecto a los expuestos en una fase más temprana.

Por otra parte, los resultados de nuestro experimento realizado a los 3/5 días de desarrollo, cuando los huevos de *S. merianae* fueron topicados con la mayor concentración de GLI-PZ, revelaron efectos inmunotóxicos sobre los títulos de AcN, que no se encontraron en los animales expuestos a GLI-RU en la misma concentración. El glifosato es el ingrediente o principio activo (p.a.) de más de 750 diferentes herbicidas de amplio espectro (Guyton y col., 2015). Sin embargo, las formulaciones de herbicidas a base de glifosato están compuestas por alrededor de 36-68% de glifosato (p.a.) y el resto de la solución puede incluir agua, sales y coadyuvantes tales como etoxilato de alquilaminas -POEA- (Mesnage y col., 2015). Así, la toxicidad del herbicida podría no sólo depender del p.a. sino de cualquiera de los componentes constituyentes de cada formulación, los cuales podrían ser incluso más tóxicos que el p.a. (Reno y col., 2016). Teniendo en cuenta lo mencionado, nuevos estudios centrados en estos aspectos pueden contribuir al desarrollo de evaluaciones más precisas del riesgo toxicológico de los plaguicidas, permitiendo un mayor control y el manejo integral de estos compuestos. Además, en comparación con otros grupos de vertebrados, la información disponible sobre la toxicidad del glifosato y sus formulaciones en reptiles es todavía escasa.

Por otra parte, considerando los resultados obtenidos para los parámetros de RTGB en ambos ensayos, este parámetro no reveló diferencias entre los animales incluidos en los tratamientos con respecto a los grupos control. Esta ausencia de diferencias también fue reportada por Latorre y col. (2016), quienes no encontraron efectos sobre el RTGB en embriones de caimanes (*C. latirostris*) expuestos al inicio de la etapa embrionaria, a los insecticidas CIP y endosulfán (por separado) con respecto a los grupos control, indicando que este parámetro del SI reaccionó de manera similar ante la exposición a CIP en ambas especies.

Respecto al RDGB, en nuestros ensayos encontramos diferencias en la respuesta de este parámetro según el momento de aplicación de los plaguicidas, donde los efectos fueron hallados sólo en ejemplares nacidos a partir de huevos topicados a la mitad del desarrollo. Latorre y col. (2016) quienes topicaron huevos de *C. latirostris* al inicio del desarrollo embrionario, dichos autores tampoco encontraron diferencias entre tratamientos. Lo mismo fue reportado por Peden-Adams (2009) para aves de la especie *Gallus gallus domesticus* nacidas de huevos inyectados al inicio del desarrollo embrionario con sulfonato de perfluorooctano. Por otra parte, otro estudio realizado en aves recién nacidas de la misma especie, pero de huevos inyectados con una mezcla

de clorpirifos y cipermetrina, mostró una reducción significativa en los recuentos de linfocitos (Khan y col., 2015).

Por su parte, el índice de lobularidad tampoco mostró diferencias entre los animales de grupos tratados en relación a los controles en ninguno de los dos ensayos.

Con respecto a los efectos comparativos sobre los índices inmunológicos de los plaguicidas cuando fueron aplicados individualmente o en mezcla (terciaria), nuestros resultados revelaron una ausencia de efectos cuando estos formulados fueron combinados.

Como hemos observado en los resultados de los dos ensayos, los parámetros inmunológicos estudiados aquí en embriones de *S. merianae* pueden reaccionar de manera diferencial ante la exposición a diferentes tóxicos, por lo que más evaluaciones de diferentes parámetros con diferentes plaguicidas y concentraciones, así como de distintas marcas comerciales de los mismos, serían de mucha utilidad para profundizar en los conocimientos de la ecotoxicología para la especie.

Este es el primer estudio que explora el efecto individual de GLI, CIP y CPF, así como de su mezcla terciaria, sobre los parámetros inmunológicos de embriones de *S. merianae*. Históricamente, se ha propuesto que la función inmune en reptiles recién nacidos está en desarrollo; sin embargo, la evidencia reciente sugiere que las respuestas del sistema inmune adaptativo en estos animales son críticas para la supervivencia del recién nacido (Brusch y de Nardo, 2019). Nuestros resultados aportan evidencia de que la función inmune se desarrolla temprano en la ontogenia e incluye respuestas innatas y adaptativas. Además, estos datos constituyen la primera evaluación de estos efectos en diferentes etapas de desarrollo embrionario de *S. merianae*.

Por un lado, se encontraron diferentes resultados según la etapa de desarrollo en el que se encontraban los animales en el momento de la exposición, mostrando los mayores efectos en los animales topicados durante una etapa más tardía del desarrollo embrionario. Por otro lado, también se observaron diferentes respuestas según cuál haya sido la formulación comercial aplicada, revelando efectos en lagartos expuestos a GLI-PZ pero no a GLI-RU para las concentraciones usadas.

Además, se ha reportado que diferentes contaminantes pueden afectar severamente el desarrollo embrionario y pueden contribuir a la mortalidad embrionaria (Marco 2004). Por ejemplo, un estudio demostró que la exposición de hembras de *Alligator mississippiensis* (caimán americano) a plaguicidas organoclorados provocó un aumento de la concentración de estos plaguicidas en los huevos que estas hembras producían y que esto desencadenó una mayor mortalidad embrionaria (Rauschenberger y col., 2004). De la misma manera, Khan y col. (2015) también

reportaron mayor porcentaje de muertes embrionarias en aves (*Gallus gallus domesticus*) nacidas de huevos expuestos a la mezcla de los insecticidas CIP y CPF en relación a los porcentajes registrados para los controles. En esta Tesis, aunque estadísticamente las diferencias no fueron significativas, se observaron más muertes embrionarias en huevos topicados a la mitad del desarrollo (33 días), constituyendo estos decesos la mitad (50%) de animales expuestos a las concentraciones medias de CIP y el 41,67% de los individuos topicados con GLI-RU. En cambio, en el ensayo realizado sobre embriones de 3-5 días de desarrollo, el promedio de los decesos fue similar en todos los tratamientos, demostrando diferentes efectos sobre esta variable según el desarrollo embrionario de los individuos al momento de la exposición.

Resulta interesante destacar respecto de lo mencionado en el párrafo anterior, que la mayor cantidad de muertes embrionarias registradas correspondieron a animales pertenecientes al nido 6, evidenciando que las diferencias en la susceptibilidad de los animales dependen de los nidos a los cuales pertenezcan, y que este “efecto nido” es muy común en reptiles. Estos resultados podrían considerarse una advertencia sobre posibles consecuencias a nivel poblacional de esta especie, especialmente en ambientes con condiciones de continua exposición a plaguicidas. Además, estos efectos podrían ser más evidentes ante la exposición a concentraciones mayores de tóxicos, no evaluadas en este estudio. Al respecto, las concentraciones utilizadas en este trabajo fueron siempre menores a las que normalmente se utilizan en campos cultivados, lo que resalta la sensibilidad de *S. merianae* como especie indicadora de daño y centinela de contaminación ambiental por plaguicidas.

Los análisis estadísticos respecto de la duración del desarrollo embrionario hasta el nacimiento de los animales, no revelaron diferencias entre los tratamientos en ninguno de los dos ensayos experimentales. Sin embargo, en el primer ensayo realizado se observó un retraso en los nacimientos de algunos animales provenientes de huevos topicados a la mitad del desarrollo (33 días) con las concentraciones medias y altas de todos los plaguicidas (CIP100 y 1000, CPF100 y 1000 y GLI-RU800). Si se considera que esta especie necesita de cuidados parentales para su subsistencia, y que los pequeños neonatos son muy susceptibles en la naturaleza por presiones de depredación y otros factores ambientales, un retraso en los nacimientos de algunos individuos podría desencadenar efectos o consecuencias indeseables y/o irreversibles para la población.

Los factores ambientales que conducen a una reducción del crecimiento corporal pueden ser particularmente importantes durante los primeros meses de vida cuando los animales crecen a un ritmo máximo para alcanzar un tamaño en el que se puedan evitar el ataque de ciertos depredadores (Poletta y col., 2013). De manera similar a lo

encontrado por Latorre y col., (2016) en los embriones de caimanes expuestos a insecticidas (CIP y endosulfán), en esta tesis no se encontraron efectos sobre el crecimiento medido en LHC y peso de los lagartos nacidos de huevos expuestos a CIP, CPF y GLI individualmente, ni tampoco en aquellos expuestos a la mezcla de los mismos. Sin embargo, otros autores han informado efectos sobre estas variables en caimanes recién nacidos expuestos *in ovo* a GLI-RU aplicado individualmente y en mezcla con otros plaguicidas (GLI-CIP-Endosulfan) (Poletta y col., 2011a); así como en tortugas de orejas rojas (*Trachemys scripta elegans*) recién nacidas de huevos topicados con atrazina (Willingham 2005) y en aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*) nacidas después de una exposición *in ovo* a sulfonato de perfluorooctano (Peden-Adams y col., 2009).

En líneas generales, nuestros hallazgos en este Capítulo de Tesis, contribuyen al conocimiento de los efectos que pueden ser encontrados en embriones de *S. merianae* expuestos a diferentes plaguicidas.

CAPÍTULO 4

Evaluación del efecto de los plaguicidas Clorpirifos, Cipermetrina y Glifosato, aplicados individualmente y en mezcla, sobre parámetros del sistema inmune y endocrino de juveniles de *S. merianae*



4.1 Introducción

La problemática desencadenada como producto de la expansión de la frontera agrícola, y su influencia sobre la biología de los animales que habitan áreas cercanas a las cultivadas, ha sido desarrollada ampliamente en el Capítulo 1 (apartado 1.2.3). También se ha mencionado allí que los productos químicos aplicados en las prácticas agrícolas resultan generalmente más tóxicos cuando son utilizados en forma combinada. Lamentablemente, el uso de estos plaguicidas en forma de mezclas químicas complejas es la forma más frecuente de aplicación, fundada principalmente (o casi exclusivamente) en razones económicas. Es por este motivo que el análisis experimental de los efectos tóxicos de estos componentes combinados resulta de gran importancia porque intenta representar lo que ocurre en la naturaleza. La forma en que los componentes químicos de una mezcla influyen en la toxicidad general del producto depende de muchos factores, entre ellos su concentración y mecanismo de acción (Lydy y col., 2004). Weston y col. (2013) informaron que la mezcla de plaguicidas puede combinar los efectos toxicológicos de uno o más componentes de una mezcla de tres maneras diferentes: 1) independiente; 2) adición de dosis [$1+1=2$] ó 3) interacción: potenciación [$1+0=2$], sinergismo [$1+1=3$] y antagonismo [$1+1=0$ ó <1], lo que resalta la importancia del estudio individual de cada formulado para evaluar las posibles interacciones entre los mismos.

La exposición a diferentes plaguicidas puede alterar los niveles de las hormonas relacionadas con el estrés como la corticosterona (CORT; en reptiles) y dependiendo del periodo de exposición al estresor se clasifica como aguda o crónica (Sapolsky y col., 2000), ésta puede causar diferentes efectos sobre el organismo, donde la supresión inmune y la atrofia muscular, por ejemplo, pueden tener lugar después de una exposición crónica (McMahon y col., 2017). De acuerdo con esto, cualquier alteración de los niveles de CORT podría afectar la salud del organismo (Woods y Wilson, 2014).

La utilidad de algunos parámetros inmunológicos como los Recuentos Totales (RTGB) y Diferenciales de Glóbulos Blancos (RDGB), los índices de Heterófilos / Linfocitos (H/L) y de Lobularidad (IL), la detección de Anticuerpos Naturales (AcN) y la actividad del Sistema de Complemento (SC), así como la importancia de la medición de los niveles de corticosterona como medida de estrés para evaluar el estado de salud de los organismos, han sido detalladas en el Capítulo 1 (apartados 1.5 y 1.6).

Por lo tanto, a continuación, se detallará la metodología utilizada para evaluar los posibles efectos endocrinos e inmunotóxicos de la mezcla terciaria de los plaguicidas más utilizados en Argentina (Clorpirifos + Cipermetrina + Glifosato) así como sus

posibles efectos individuales en ejemplares juveniles de *S. merianae*, reptil autóctono de nuestro país. Seguidamente, se presentarán los resultados obtenidos a partir del desarrollo de dichos estudios, así como la discusión de éstos y las conclusiones finales.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Ejemplares utilizados

Los huevos de *S. merianae* provenientes de nidos diferentes, que se emplearon para obtener los ejemplares a utilizar en los experimentos, fueron cosechados como parte de las actividades rutinarias del Proyecto Iguana (PI), en la Reserva Natural denominada El Fisco, un área sin actividades agrícolas ni cualquier otra que sea fuente de contaminantes, ubicada en la provincia de Santa Fe, Argentina (ver Fig. 2.7, apartado 2.2.2.1, Capítulo 2).

Después de la recolección, los huevos fueron transportados inmediatamente a las instalaciones del PI (Lab. Zool. Aplicada: Anexo Vert., FHUC-UNL / MMA, Santa Fe, Argentina) para su incubación artificial bajo condiciones controladas de temperatura (29 - 31.5 °C) y humedad (aproximadamente 20%). Después de la eclosión, las iguanas recién nacidas fueron individualmente identificadas por sus manchas ventrales (ver Fig. 2.8, Capítulo 2), y mantenidas bajo condiciones controladas hasta el inicio de cada estudio. Antes y durante los meses de los ensayos, los individuos fueron alimentados todos los días *ad libitum*, con la misma dieta utilizada para su cría en el programa de uso sustentable (PI).

Para todos los ensayos fueron utilizados animales de la misma edad (juveniles), para evitar variaciones asociadas a su clase etaria (ver apartado 2.3, Capítulo 2). La variable sexo no fue considerada debido a no haberse encontrado diferencias significativas sobre los parámetros analizados, en esta variable, en el ensayo de ajustes metodológicos. Además, para considerar el “efecto nido” en cada tratamiento se incluyeron huevos provenientes de diferentes nidos (ver apartado 3.2.1, Capítulo 3). Los animales, en todos los ensayos, fueron distribuidos uniforme y equitativamente dentro de los tratamientos analizados.

4.2.2 Compuestos químicos empleados

Los compuestos que se utilizaron fueron: Roundup Full II® (66.2% glifosato, GLI-RU), Panzer Gold® (60.8% glifosato, GLI-PZ), Clorpirifos Nufarm® (48% clorpirifos, CPF) y Cipermetrina Atanor® (25% cipermetrina, CIP). La descripción de cada uno de estos compuestos químicos fue desarrollada en el apartado 3.2.3 (Capítulo 3).

4.2.3 Diseño experimental

Se realizaron 3 ensayos semicontrolados en diferentes años para analizar los posibles efectos de la exposición de juveniles de *S. merianae* a las formulaciones individuales de CIP, CPF, GLI-RU y GLI-PZ, y de sus mezclas. Un ensayo semicontrolado consiste en un ensayo donde se controlan sólo algunas variables. En cada uno de los ensayos se incorporó un control negativo (CN). Las exposiciones se realizaron siempre en la estación cálida (entre los meses de octubre y diciembre) con una duración total de 3 meses, para simular la exposición que los animales tienen en la naturaleza, debido a que esta estación coincide con el momento de máxima aplicación de plaguicidas en los cultivos de soja.

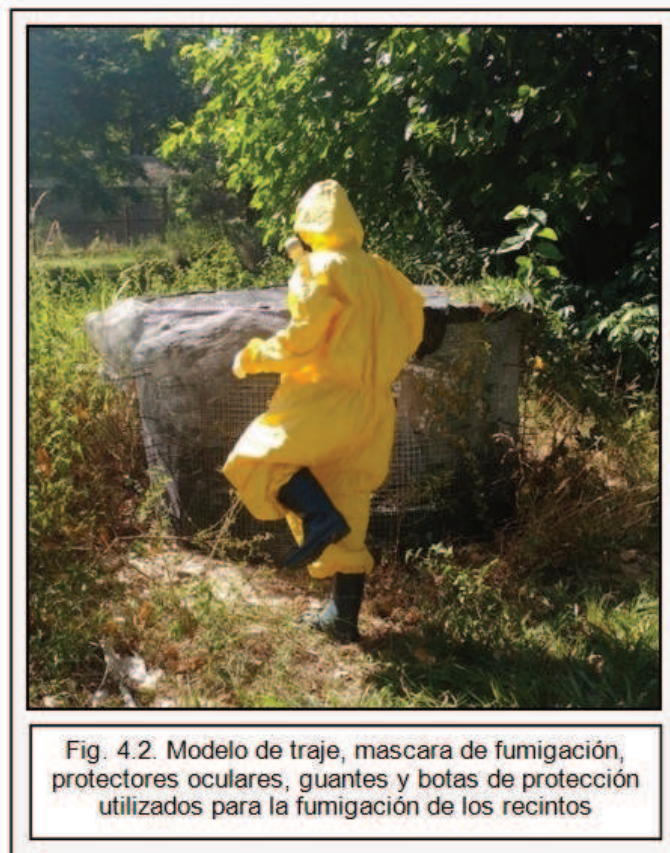
Se construyeron recintos en las instalaciones del PI, separados unos de otros por una distancia de 50 metros. El tamaño de los mismos fue de aproximadamente 2 m de diámetro en su base y 1,2 m de altura, y completamente cerrados en la parte superior con tejido de trama pequeña para evitar el ingreso de depredadores y el escape de los animales. En relación a su capacidad para trepar y cavar, estos animales son particularmente hábiles para escapar, por lo que los recintos metálicos fueron reforzados con mallas plásticas de trama pequeña unidas con alambre maleable. Cada recinto contó con varios refugios con sombra, un recipiente para el alimento y uno para la provisión de agua (Fig. 4.1).



Fig. 4.1. A) Recintos cubiertos con trama pequeña para evitar el escape de los animales. B) Detalle de juveniles de Iguana overa en el interior de un recinto

Los sitios para la instalación de los recintos fueron estratégicamente seleccionados, evaluando que se encontraran alejados de cualquier tipo de contaminación (química, sonora, etc.), y se armaron en diferentes lugares respecto de exposiciones previas para evitar la presencia de metabolitos residuales o restos de plaguicidas que pudieran interferir en los resultados.

Para todos los ensayos experimentales, se aplicaron los plaguicidas (en forma individual o mezcla) empleando un pulverizador de mochila, que logra cubrir toda la superficie del recinto desde una altura de 1 metro. Para llevar a cabo las fumigaciones se utilizó vestimenta y elementos de protección personal (Fig. 4.2).



Las concentraciones de plaguicidas utilizadas fueron equivalentes a las recomendadas por los fabricantes para su aplicación en cultivos de soja: formulación GLI-RU 2% (p.a. 66.2%); GLI-PZ 2% (p.a. 60.8%); CPF al 0,8% (p.a. 48%) y CIP al 0,12% (p.a. 25%). Las aplicaciones se realizaron siguiendo el programa utilizado en las prácticas agrícolas de la región, donde por ejemplo, la pulverización con GLI es realizada pre y post-emergencia de las plantas. La mezcla terciaria de las mencionadas formulaciones constituye una de las más utilizadas en las prácticas de la región. Por lo tanto, la preparación de esta mezcla se realizó con las mismas proporciones que las utilizadas en las aplicaciones individuales. Para que las exposiciones a la mezcla también fueran representativas de lo que sucede en campo, la primera pulverización se realizó sólo con la formulación de GLI y luego, 30 días después, con la mezcla de los 3 plaguicidas, tal cual se realiza en las prácticas agrícolas de la zona (ver Tablas 4.1; 4.2 y 4.3).

Para todos los tratamientos analizados en cada uno de los experimentos, los animales fueron mantenidos durante una semana en el interior de los recintos, antes de pulverizar los compuestos a evaluar, para permitir su aclimatación. Además, antes de cada aplicación, los animales fueron retirados de los recintos, y colocados nuevamente

24 horas después de la aspersión, para evitar que reciban los plaguicidas en forma directa sobre ellos. De igual manera, los animales pertenecientes a los grupos no fumigados fueron retirados por el mismo período de tiempo para evitar introducir efectos diferenciales en los tratamientos relacionados a la manipulación de los ejemplares.

Las exposiciones fueron realizadas en tres años consecutivos. Así, en el primer año, se realizó la exposición de ejemplares a la mezcla terciaria de las formulaciones de GLI-RU, CPF y CIP (ensayo 1), el segundo año a las formulaciones individuales de GLI-RU y de CPF (ensayo 2), y en el tercer año, a los compuestos individuales de GLI-PZ y CIP (ensayo 3).

Ensayo 1

Con la intención de poseer réplicas por tratamiento, dos de los recintos fueron expuestos a la mezcla terciaria de las formulaciones de GLI-RU, CPF y CIP, y los otros dos fueron utilizados como controles negativos (CN) y se rociaron con agua potable no clorada. Para desarrollar este experimento se seleccionaron 18 animales por nido, de 4 nidos diferentes para evaluar el “efecto nido” y realizar una réplica por cada tratamiento, por lo cual se trabajó con un N total de 72 (18 animales en cada recinto). Las aplicaciones se realizaron como lo indica la Tabla 4.1:

Tabla 4.1: Cronograma de aplicación de agua / plaguicidas en los recintos control y mezcla, respectivamente		
	RECINTOS CONTROL	RECINTOS MEZCLA
INICIO	Aplicación de agua	Aplicación de GLI-RU
30 días	Aplicación de agua	Aplicación de GLI-RU + CPF + CIP

Ensayo 2

Debido a la ausencia de diferencias en los resultados obtenidos entre las réplicas en el ensayo 1, en el Ensayo 2 y en el Ensayo 3 no fueron incluidas réplicas. De esta manera, para este ensayo se confeccionaron 3 recintos, cada uno con 28 animales pertenecientes a 4 nidos diferentes (7 ejemplares de cada nido), por lo que el N total

utilizado en este ensayo fue de 84 individuos. Uno de los recintos fue rociado con GLI-RU, otro con CPF y el otro con agua potable no declarada constituyendo el CN. Las aplicaciones se realizaron conforme al cronograma agrícola de la zona, de la siguiente manera (Tabla 4.2):

Tabla 4.2: Cronograma de aplicación de agua / plaguicidas en los recintos control (CN), expuestos a Glifosato Roundup (GLI-RU) y a Clorpirifos (CPF), respectivamente			
	RECINTO CN	RECINTO GLI-RU	RECINTO CPF
INICIO	Agua	Aplicación de GLI-RU	Agua
30 días	Agua	Aplicación de GLI-RU	Aplicación de CPF

Ensayo 3

Al igual que en el Ensayo 2, se construyeron 3 recintos en las inmediaciones del PI, separados unos de otros y con las mismas características ya descritas al inicio de este apartado. Cada uno de los recintos tuvo 20 animales, provenientes de 4 nidos diferentes (5 de cada uno), por lo cual, el ensayo empleó un N total de 60 animales. Uno de los recintos fue rociado con GLI-PZ, otro con CIP y otro con agua declarada (CN). Los momentos de la aplicación del GLI-PZ fueron idénticos al año precedente y considerando el criterio empleado en las prácticas de la región (Tabla 4.3).

Tabla 4.3: Cronograma de aplicación de agua / plaguicidas en los recintos control (CN), expuestos a Glifosato Panzer Gold (GLI-PZ) y a Cipermetrina (CIP),			
	RECINTO CN	RECINTO GLI-PZ	RECINTO CIP
INICIO	Agua	Aplicación de GLI-PZ	Agua
30 días	Agua	Aplicación de GLI-PZ	Aplicación de CIP

4.2.4 Toma de muestras

Al finalizar cada experimento (3 meses después de su inicio), se obtuvo una muestra de sangre periférica de cada uno de los animales utilizados en el ensayo experimental, a partir de la vena caudal (Olson y col., 1977) empleando jeringas heparinizadas y agujas 21G x 1" de acuerdo con el tamaño de los ejemplares juveniles (ver apartado 2.2.2.2, Capítulo 2). La muestra sanguínea recolectada a partir de cada animal fue utilizada para la medición de todos los parámetros inmunológicos (ver apartado 4.2.5) así como para la medición de los niveles de corticosterona (ver apartado 4.2.6).

4.2.5 Medición de parámetros inmunológicos

Pequeñas alícuotas de la sangre extraída por cada animal se utilizaron para determinaciones de RTGB, RDGB, H/L e IL. Aproximadamente 1 ml de la muestra restante se centrifugó a 2500 xg durante 15 min y el plasma se almacenó a -80 °C hasta su uso para la determinación de los niveles de AcN y actividad del SC (Siroski y col., 2016). Los detalles de cada metodología fueron desarrollados en el apartado 2.2.1 del Capítulo 2.

4.2.6 Medición de niveles de corticosterona

La CORT es una hormona muy sensible que a temperatura ambiente puede sufrir cambios en sus niveles, motivo por lo cual las muestras destinadas a este análisis, fueron procesadas inmediatamente después de la extracción sanguínea. Así, dichas muestras se centrifugaron a 2500 xg durante 15 min para la separación del plasma, el cual luego fue almacenado a -80 °C hasta su posterior uso. Pevio a la determinación de los niveles de CORT, fue necesario aplicar un protocolo de extracción de la hormona. Dicho protocolo fue descrito inicialmente por Jahn y col., (1995) y luego modificado para *C. latirostris* por Parachú Marco y col. (2015), y se describe a continuación:

Una vez descongelado el plasma obtenido a partir de cada muestra, se colocaron 250 µl de plasma dentro de un tubo largo de vidrio, se agregó 1 ml de éter etílico o éter sulfúrico, los tubos se agitaron empleando un vórtex por 1 minuto y se llevaron a -80 °C durante 5 min. Posteriormente, se volcó el sobrenadante en un tubo corto de vidrio (Khan). El remanente congelado dentro del tubo largo se dejó descongelar, se le agregó 1 ml más de éter etílico y se lo volvió a agitar durante 1 min más, llevándolo luego nuevamente al ultrafreezer. Una vez congelado, se retiró del freezer y se volcó el sobrenadante en el tubo de Khan. Este tubo se dejó toda la noche bajo campana para permitir la evaporación del éter. Al día siguiente, se colocó a cada tubo de Khan

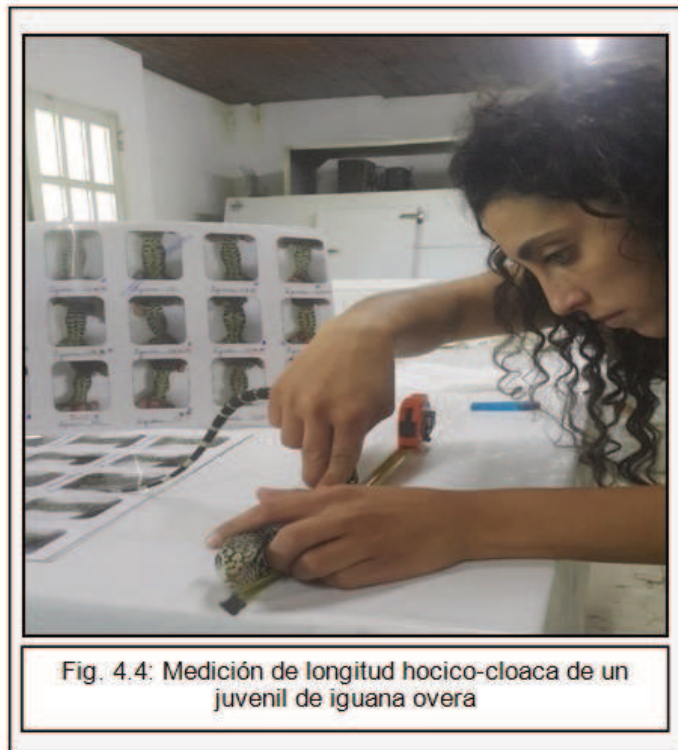
500 μ l de *buffer* PBS gelatina y luego en baño de agua térmico (37 °C) durante 2 horas, agitando cada 30 min. Finalmente, los tubos se taparon con Parafilm® para conservarlos a -20°C hasta la determinación de los niveles de corticosterona.

Los extractos de la hormona fueron enviados al Laboratorio de Reproducción y Lactancia en el CRICYT-CONICET de la ciudad de Mendoza, Argentina, para medir la concentración de esta hormona por triplicado en cada muestra mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA).

4.2.7 Medición de peso y longitud de los animales

En cada ensayo, todos los animales utilizados fueron pesados (empleando balanza electrónica de 1 gr de precisión (OHAUS® Compact scale CS 5000; Fig. 4.3) y medidos en su longitud hocico-cloaca (LHC, precisión 0,1 cm; Fig. 4.4) antes y después de cada exposición. La diferencia entre estos valores (incremento en LHC y peso) fue analizada entre los tratamientos expuestos en relación a sus respectivos controles.





4.2.8 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en relación con los diferentes parámetros inmunológicos, endócrinos y de crecimiento de todos los animales bajo estudio, fueron sometidos a pruebas de homogeneidad de varianzas utilizando una prueba de Levene, y de normalidad usando una prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Para el ensayo 1, se determinaron las diferencias entre las réplicas de cada grupo experimental, y entre los grupos control y tratados con la mezcla de plaguicidas (GLI-RU, CIP y CPF) utilizando un test T. Para aquellas variables que no cumplieron con los supuestos de normalidad y/o homogeneidad de varianzas, se utilizó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Para los ensayos 2 y 3, se analizaron las diferencias entre los grupos tratados en relación a los controles de cada año, mediante un ANOVA. Para aquellas variables que no cumplieron los supuestos de normalidad y / o homogeneidad de varianzas, se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida por una de Mann-Whitney para determinar las diferencias entre grupos tratados en relación a su respectivo CN.

Para los 3 ensayos, las correlaciones entre diferentes parámetros inmunológicos y de crecimiento con los niveles de corticosterona, se analizaron mediante una prueba de Pearson. Para determinar la correlación entre aquellas variables que no cumplieron con los supuestos de normalidad y / o homogeneidad de varianzas, se utilizó una prueba no paramétrica de Spearman.

Las posibles interacciones entre plaguicidas cuando se utilizan en mezcla, se analizaron mediante una prueba no paramétrica de Mann-Whitney, comparando las medias obtenidas para cada parámetro estudiado en grupos de animales tratados con plaguicidas individuales en relación a las obtenidas en los animales expuestos a la mezcla.

4.3 Resultados

Los resultados de los diferentes parámetros se informan por ensayo experimental en sus valores de media \pm E.E.

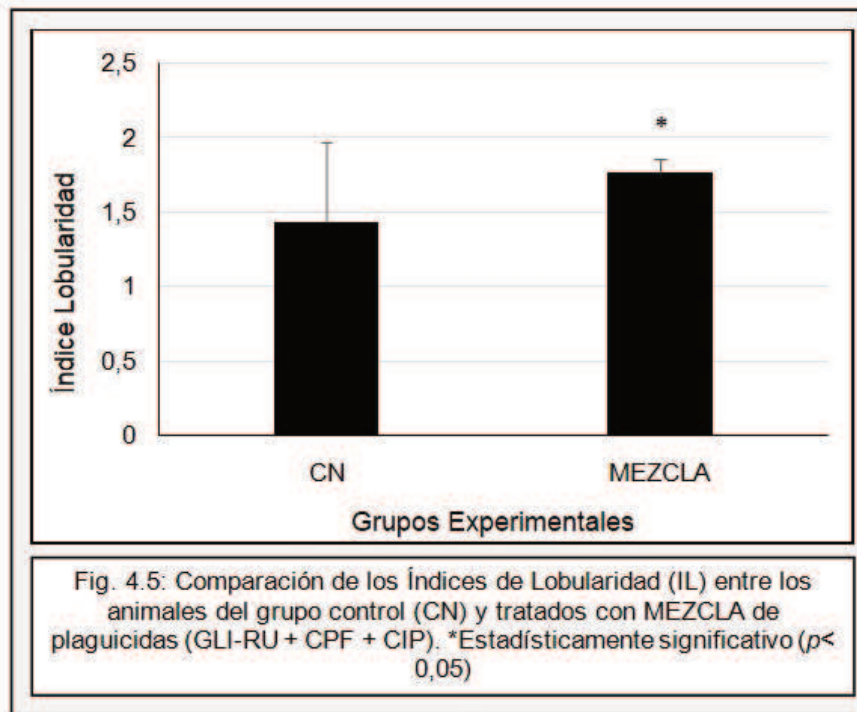
4.3.1 Efectos sobre los parámetros inmunológicos

Ensayo 1

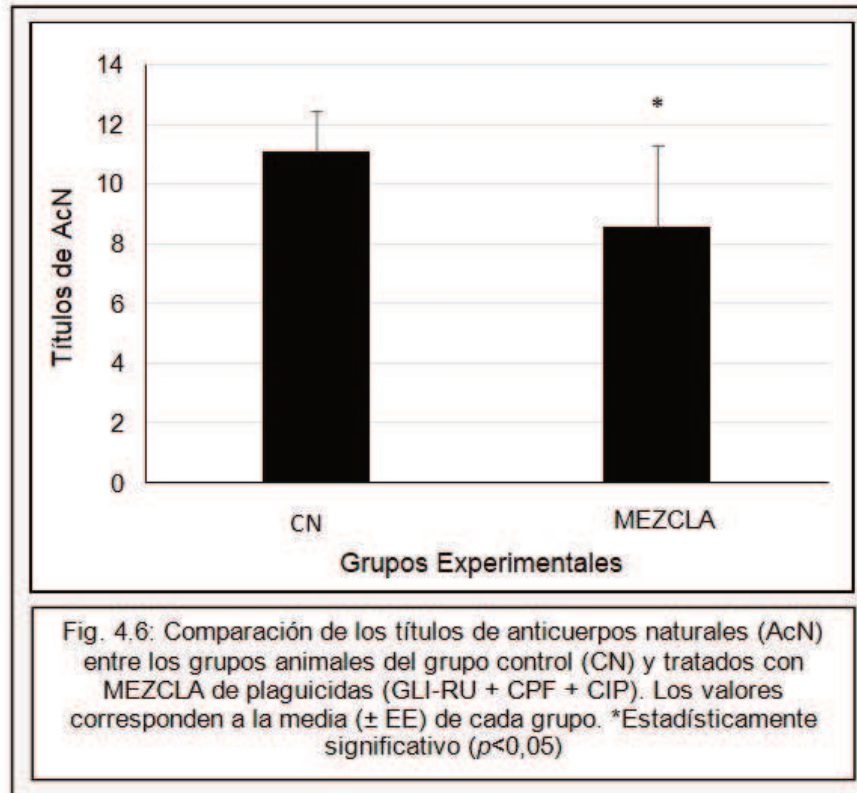
Los datos no mostraron diferencias entre los animales pertenecientes a los grupos control y los animales tratados en los valores de RTGB, pero revelaron una tendencia ligeramente negativa en los organismos expuestos a la mezcla de plaguicidas ($27676,47 \pm 2069,64$ leucocitos/mm³) en relación con los controles (31000 ± 3464 leucocitos/mm³; $p= 0,07$).

En el caso del recuento de los subtipos de leucocitos, tampoco se encontraron diferencias entre grupos tratados en relación a los CN. Del mismo modo, el índice H/L no reveló diferencias significativas, mostrando los siguientes valores para animales expuestos y controles respectivamente: $0,58 \pm 0,1$ y $0,49 \pm 0,08$.

Sin embargo, el índice de lobularidad (IL) fue diferente ($p= 0,009$) entre animales tratados y controles, siendo más frecuente la presencia de tres o más lóbulos en los animales expuestos que en los controles (Fig. 4.5).



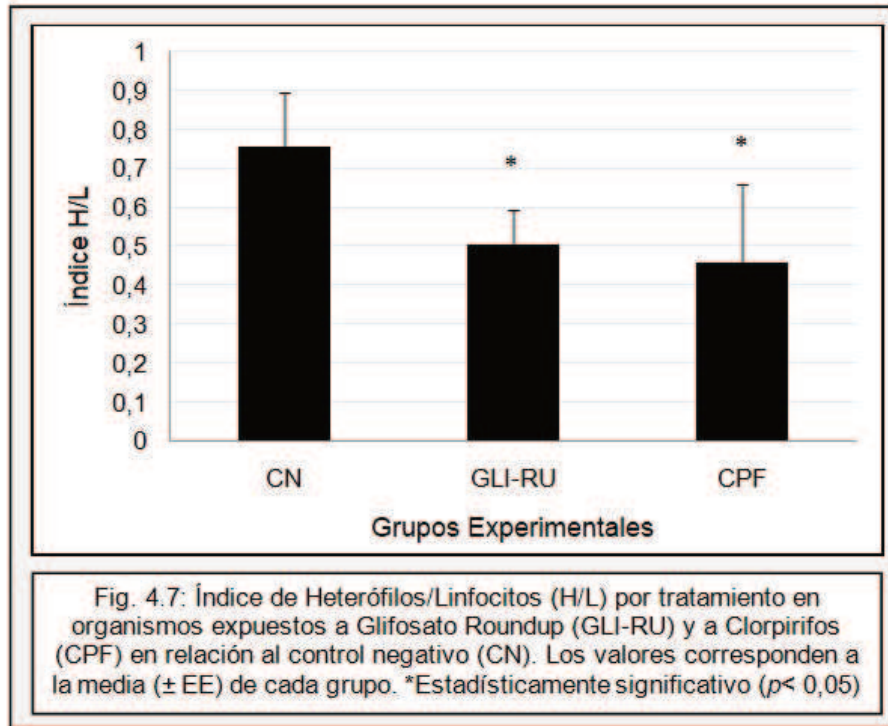
Por otra parte, los anticuerpos naturales (AcN) también mostraron diferencias entre los grupos experimentales, donde los títulos de AcN de los animales del grupo control fueron más altos que los de los expuestos a la mezcla de GLI-RU + CPF + CIP ($p = 0,013$; Fig. 4.6).



Finalmente, la actividad del SC determinada a través de la evaluación del porcentaje de máxima hemólisis (%MH), no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales, debido a que la media de este parámetro en los controles fue de $10,81 \pm 1,14$ y en los expuestos de $8,71 \pm 1,04$.

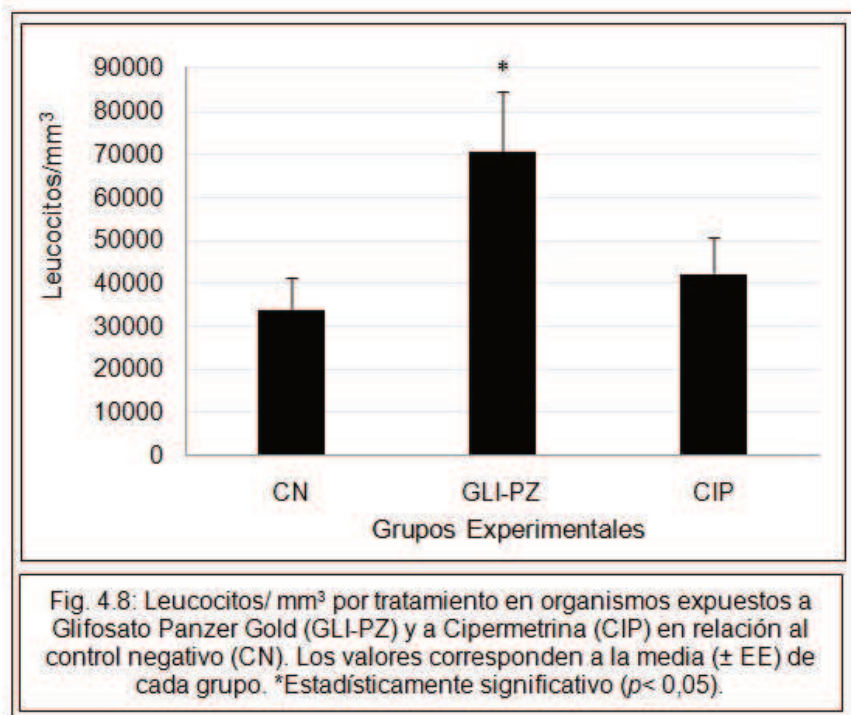
Ensayo 2

Los resultados de este ensayo experimental no mostraron diferencias estadísticas entre los animales expuestos a GLI-RU ni a CPF en relación al control negativo en la mayoría de los parámetros inmunológicos analizados (RTGB, RDGB, IL, AcN y SC). El índice H/L fue el único parámetro que reveló diferencias entre tratamientos, con una disminución en animales tratados respecto del CN (Fig. 4.7)



Ensayo 3

Los resultados del ensayo de exposición individual a GLI-PZ y CIP revelaron efectos tóxicos en los ejemplares de iguana overa expuestos. Los valores de RTGB resultaron más altos ($p = 0,055$) en los animales tratados con GLI-PZ respecto de los controles (Fig. 4.8).



En cuanto al RDGB, se observaron diferencias en las proporciones leucocitarias así como en el índice de heterófilos/linfocitos en los animales tratados en relación a los controles. Se observó una mayor proporción de linfocitos en animales expuestos a GLI-PZ (Fig. 4.9) y un menor valor del índice H/L en animales expuestos a GLI-PZ así como a CIP en relación a los controles (Fig. 4.10). Además se encontró un índice de lobularidad mayor en los organismos expuestos a CIP respecto de los controles (Fig. 4.11).

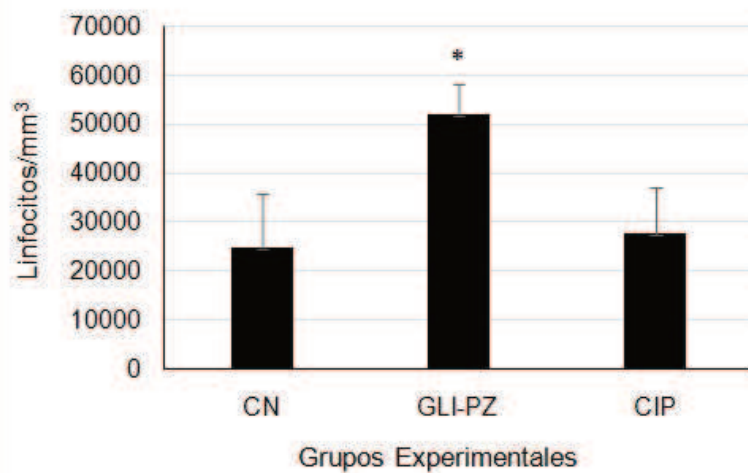


Fig. 4.9: Linfocitos/mm³ por tratamiento en organismos expuestos a Glifosato Panzer Gold (GLI-PZ) y a Cipermetrina (CIP) en relación al control negativo (CN). Los valores corresponden a la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

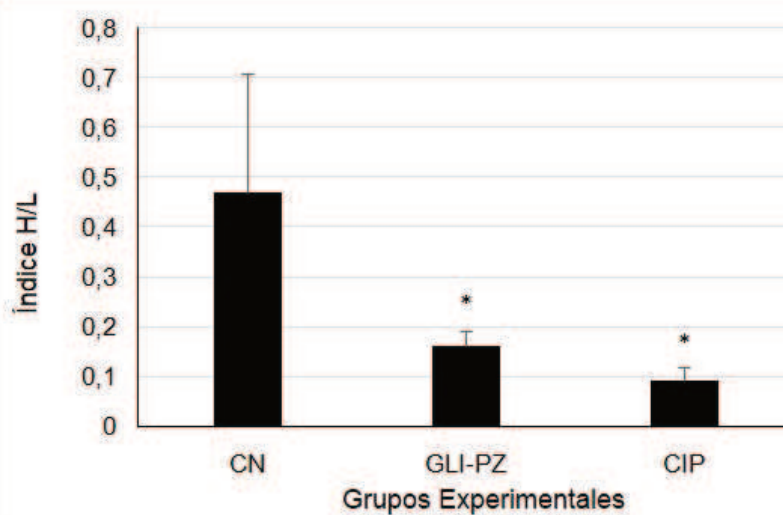
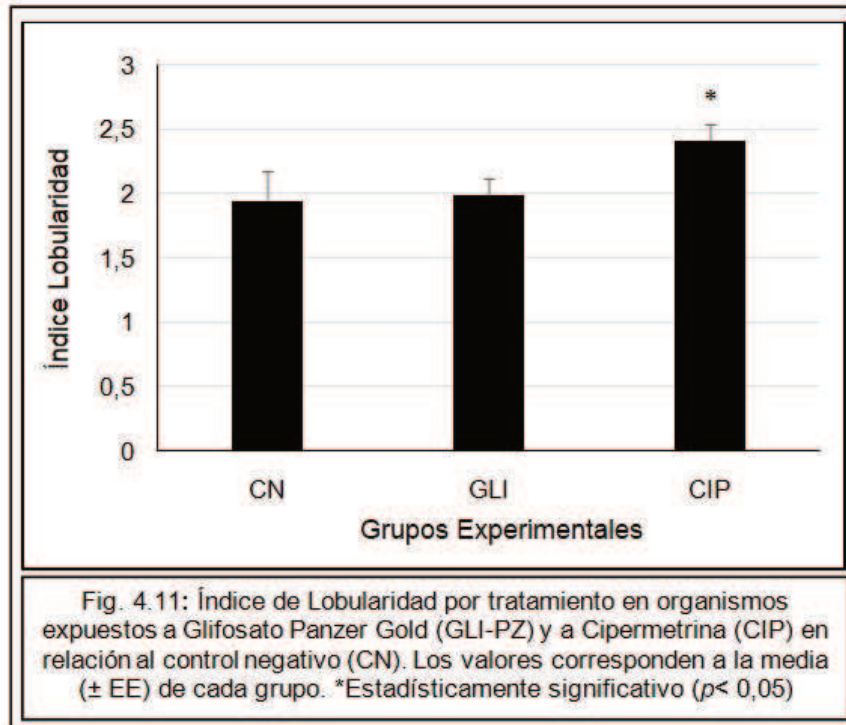
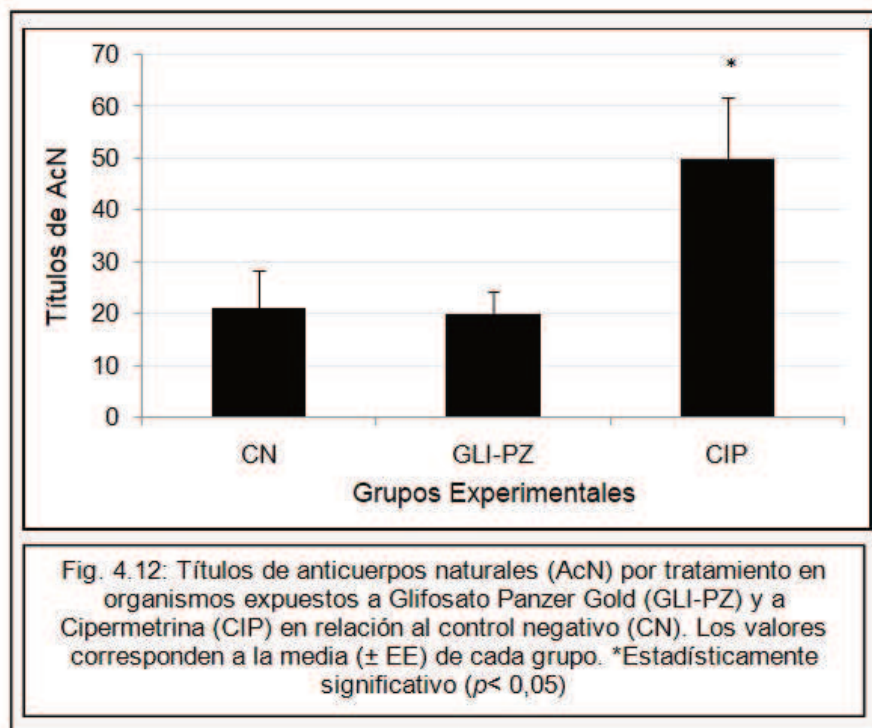


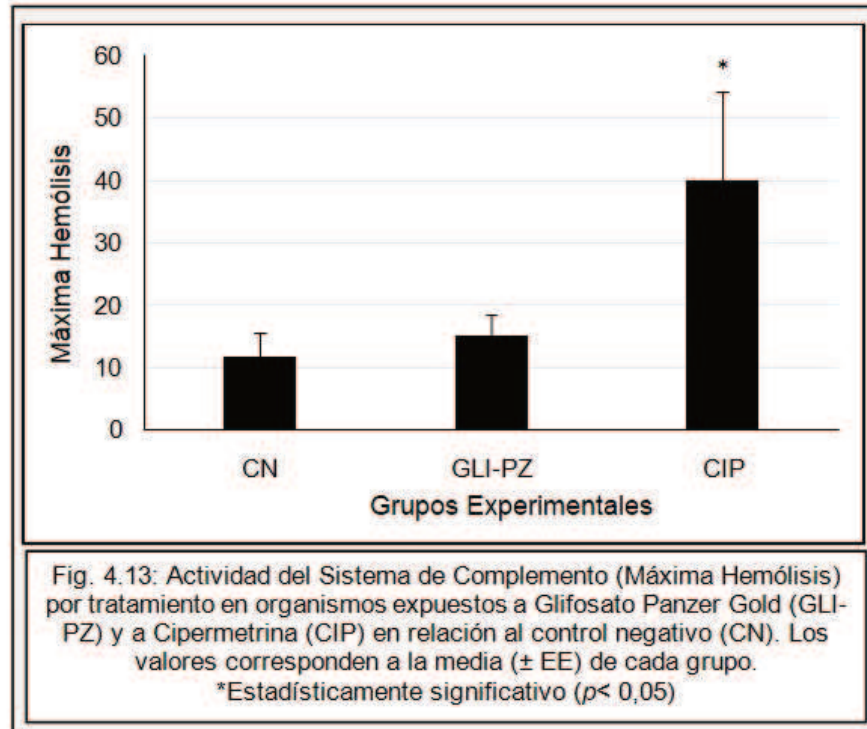
Fig. 4.10: Índice de Heterófilos/Linfocitos (H/L) por tratamiento en organismos expuestos a Glifosato Panzer Gold (GLI-PZ) y a Cipermetrina (CIP) en relación al control negativo (CN). Los valores corresponden a la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).



Los resultados de AcN también revelaron diferencias entre tratamientos, siendo mayores los títulos de animales expuestos a CIP en relación a los controles (Fig. 4.12).



Respecto a la actividad del sistema de complemento se observó un mayor porcentaje de MH en iguanas tratadas con CIP respecto de los animales del grupo control (Fig. 4.13).



4.3.2 Efectos sobre el crecimiento

Ensayo 1

Los incrementos en peso y en LHC de los animales no mostraron diferencias entre grupos experimentales. Las medias de ambos parámetros para cada grupo se muestran en la Tabla 4.4.

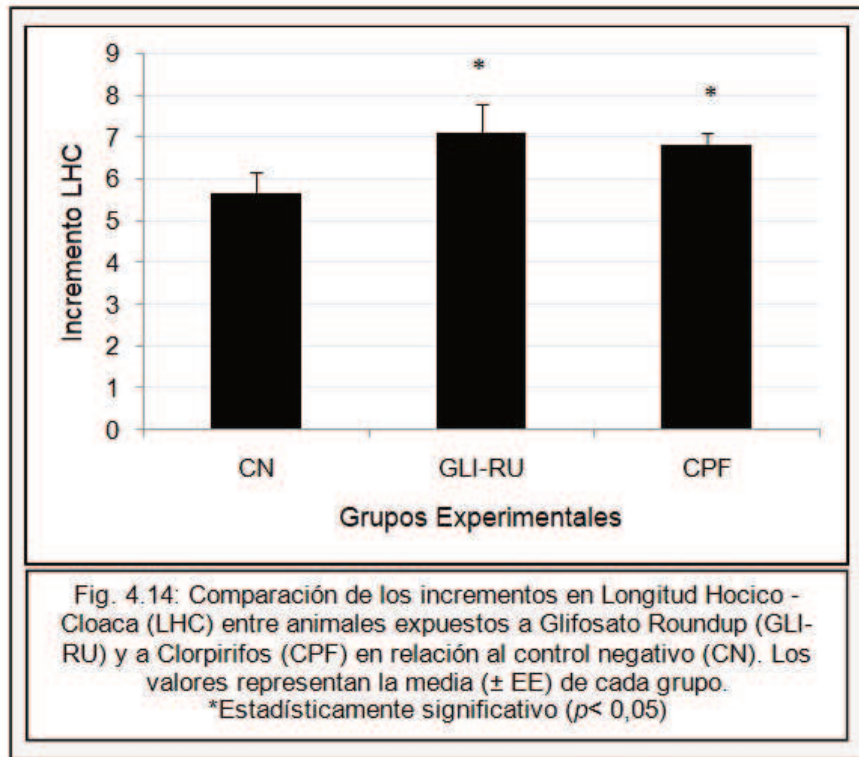
Tabla 4.4: Comparación del crecimiento en peso y Longitud Hocico Cloaca (LHC) entre animales expuestos a la mezcla GLI-RU + CPF + CIP y controles. Los valores representan la media (\pm EE) de cada grupo		
	Grupo experimental	
	Control	Mezcla (GLI-RU + CPF + CIP)
LHC (cm)		
Pre-experimental	13,37 \pm 0,39	13,58 \pm 0,35
Post-experimental	20,92 \pm 0,66	20,45 \pm 0,65
Peso (gramos)		
Pre-experimental	78,03 \pm 8,02	82,26 \pm 8,24
Post-experimental	455,14 \pm 57,64	391,51 \pm 48,12

Ensayo 2

Las medias para cada grupo experimental (GLI-RU, CPF y CN) en relación al crecimiento fueron las siguientes (Tabla 4.5):

Tabla 4.5: Comparación del crecimiento en peso y Longitud Hocico -Cloaca (LHC) entre animales expuestos a GLI-RU y CPF en relación al CN. Los valores representan la media (\pm EE) de cada grupo pre- y post-tratamiento			
	Grupo experimental		
	Control	GLI-RU	CPF
LHC (cm)			
Pre-experimental	16,86 \pm 0,2	16,3 \pm ,31	17,17 \pm 0,42
Post-experimental	22,6 \pm 0,42	23,2 \pm 0,63	23,91 \pm ,48
Peso (gramos)			
Pre-experimental	144,25 \pm 5,63	142,29 \pm 8,12	142,3 \pm 12,44
Post-experimental	472,35 \pm 29,92	560,92 \pm 47,4	597,88 \pm 45,4

Los incrementos en el crecimiento respecto del peso de los animales de cada tratamiento no mostraron diferencias; sin embargo, el incremento en la longitud hocico-cloaca (LHC) calculado como la diferencia entre los valores medidos pre y post-experimental, mostraron valores estadísticamente distintos entre los animales expuestos a plaguicidas (GLI-RU y CPF) respecto a los controles (Fig. 4.14).



Ensayo 3

Las medias para cada grupo experimental (GLI-PZ, CIP y CN) en relación al crecimiento fueron las siguientes (Tabla 4.6):

Tabla 4.6: Comparación del crecimiento en peso y Longitud Hocico Cloaca (LHC) entre animales expuestos a GLI-PZ y CIP respecto del CN. Los valores representan la media (\pm EE) de cada grupo pre- y post-tratamiento

LHC (cm)	Grupo experimental		
	Control	GLI-PZ	CIP
Pre-experimental	18,08 \pm 0,87	17,17 \pm 0,54	16,63 \pm 0,88
Post-experimental	56,7 \pm 27,73	25,83 \pm 1,43	28,89 \pm 1,48
Peso (gramos)			
Pre-experimental	207,2 \pm 36,97	174,87 \pm 16,82	154,08 \pm 27,74
Post-experimental	1174,6 \pm 207,63	773,4 \pm 168,86	992,60 \pm 117,49

Los incrementos de peso y longitud hocico-cloaca (LHC), entendidos como la diferencia entre los valores medidos pre y post-experimental, revelaron diferencias entre los animales expuestos a plaguicidas (GLI-PZ y CIP) respecto a los controles (Fig. 4.15 y 4.16, respectivamente).

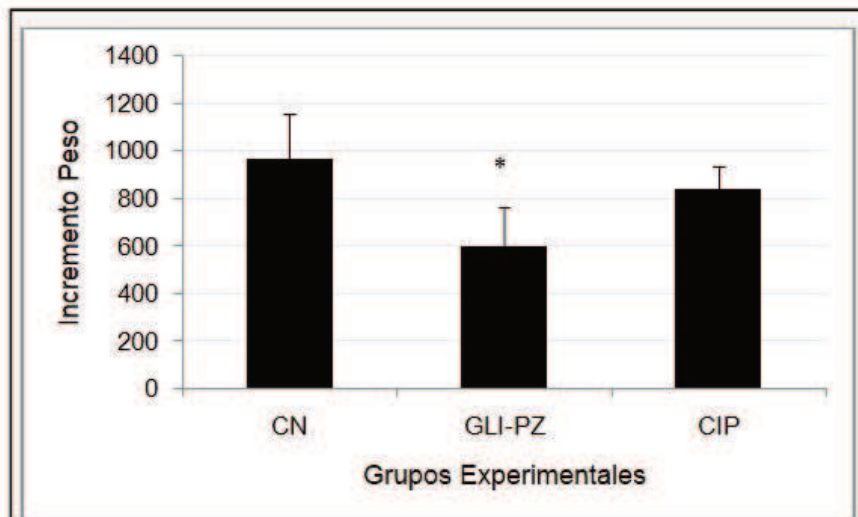
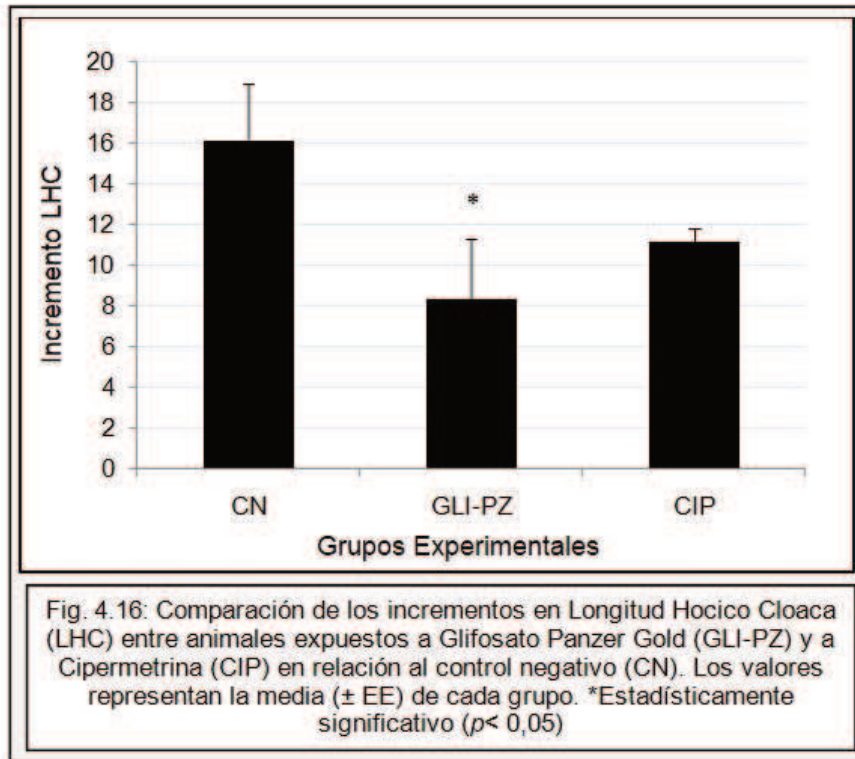


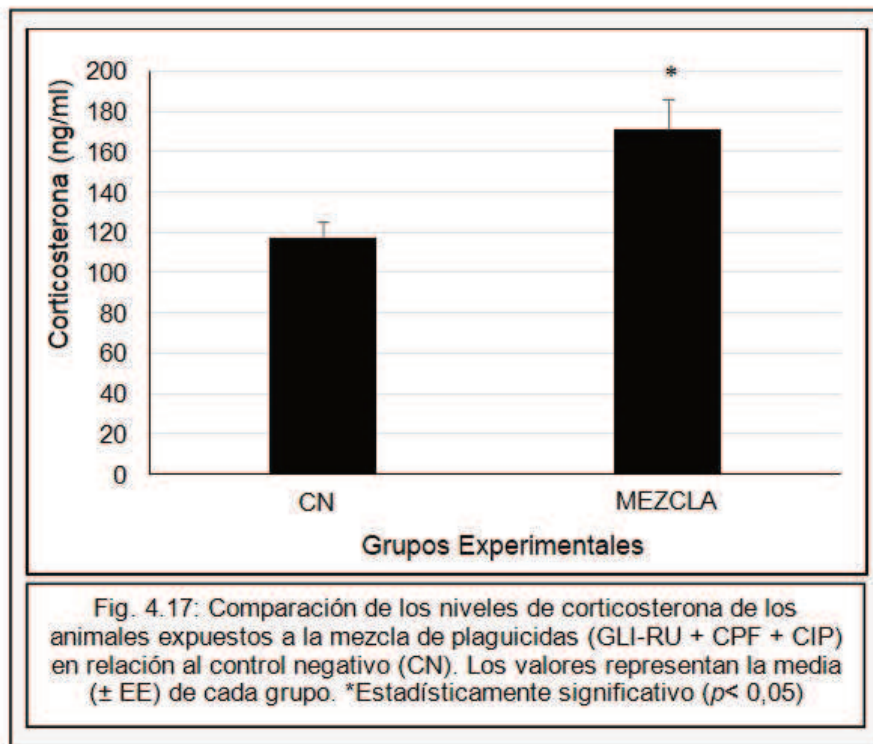
Fig. 4.15: Comparación de los incrementos en peso entre animales expuestos a Glifosato Panzer Gold (GLI-PZ) y a Cipermetrina (CIP) en relación al control negativo (CN). Los valores representan la media (\pm EE) de cada grupo. *Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)



4.3.3 Efectos sobre los niveles de corticosterona

Ensayo 1

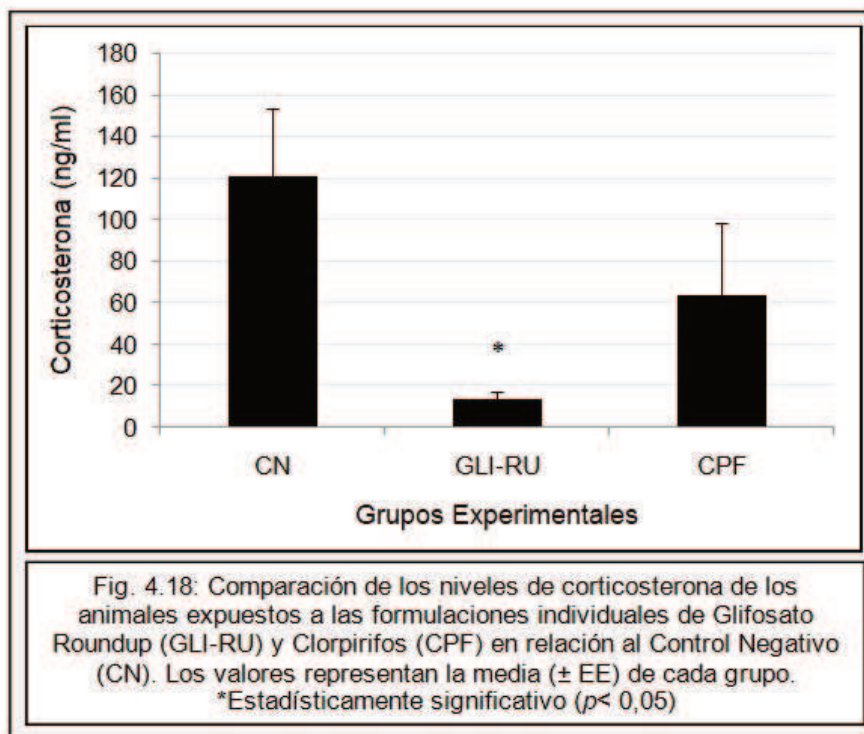
Los resultados del RIA mostraron niveles significativamente más altos de corticosterona (ng / ml) en animales expuestos a la mezcla de plaguicidas en relación con el grupo control ($p < 0,01$; Fig. 4.17).



Cuando los niveles de corticosterona se correlacionaron con los otros parámetros evaluados, se observó una correlación negativa con respecto a RTGB (índice de correlación [IC] = -0,433), a títulos de AcN (IC = -0,544) y a LHC (CI = -0,752). Sin embargo, se observó una correlación positiva cuando se comparó con los otros parámetros analizados. Por lo tanto, el grupo de eosinófilos y heterófilos, así como el índice H/L, aumentaron cuando los niveles de corticosterona aumentaron (IC = 0,767; IC = 0,919 e IC = 0,565; respectivamente).

Ensayo 2

Los valores de los niveles de corticosterona en animales expuestos a GLI-RU fueron bajos en relación con los del grupo control (Fig. 4.18).



Se observó una correlación negativa entre los niveles de esta hormona con los monocitos (IC = -0,655); con la actividad del SC (IC = -0,524), así como con LHC (IC = -0,678) y el peso (IC = -0,667).

Ensayo 3

En este ensayo experimental, las comparaciones de los niveles de corticosterona no revelaron diferencias estadísticas entre los tratamientos ni con las variables testeadas. Sin embargo, se observó que los valores de esta hormona en animales expuestos a GLI-PZ fueron de $90,03 \pm 25,934$ ng / ml, mientras en los animales expuestos a CIP fueron de $156,93 \pm 41,61$ ng / ml, y los de animales del grupo control fueron de $128,204 \pm 25,535$ ng / ml.

4.3.4 Interacciones entre formulados

Para evaluar la existencia de efectos aditivos o interacciones entre formulados cuando se usan en mezcla, se analizó mediante un test de Mann-Whitney si los valores obtenidos para la exposición individual de los animales a cada compuesto fue menor, mayor o igual a los de la mezcla. La comparación entre los grupos control no fue significativa para ninguna variable.

Respecto al índice H/L se halló una diferencia significativa entre los animales expuestos a CIP en relación a la mezcla ($p= 0,001$), siendo los valores medios para CIP inferiores a los registrados para la mezcla. La suma de las medias de H/L obtenidas en animales expuestos a CPF ($0,47 \pm 0,12$) y a CIP ($0,11 \pm 0,02$) dio como resultado, exactamente el valor de la media obtenida en los animales expuestos a la mezcla ($0,58 \pm 0,1$). Estos resultados conllevan a suponer una acción aditiva entre dichos formulados, que determina un valor superior de H/L en animales sometidos al tratamiento de mezcla.

Se encontraron índices de lobularidad diferentes para animales expuestos a los 3 formulados (GLI-RU, CPF y CIP) aplicados individualmente ($p= 0,08$; $p< 0,001$ y $p= 0,002$, respectivamente) respecto de los expuestos a la mezcla de los mismos para este parámetro. Los valores de IL hallados para los animales expuestos a la mezcla ($1,76 \pm 0,1$) fueron menores a los obtenidos para los expuestos a las formulaciones individuales (GLI-RU= $2,69 \pm 0,52$; CPF = $2,99 \pm 0,36$ y CIP = $2,4 \pm 0,13$), sugiriendo un tipo de acción antagónica entre dichas formulaciones cuando se aplican combinadas.

En relación a los títulos de AcN, podría sospecharse la presencia de interacciones antagonistas entre formulaciones debido a que los valores medios obtenidos en los animales expuestos a cada formulado (GLI-RU = $26,18 \pm 3,8$; CPF = $22,29 \pm 2,8$ y CIP = $49,78 \pm 11,76$) fueron mayores ($p< 0,001$ en todos los casos) en relación a los expuestos a la mezcla ($11,09 \pm 1,37$).

Se comprobó que los valores medios de máxima hemólisis para animales tratados con CPF ($12,63 \pm 1,73$) y CIP ($49,83 \pm 12,6$) fueron significativamente superiores ($p= 0,025$; $p= 0,009$, respectivamente) al valor medio de dicho parámetro en animales pertenecientes al grupo expuesto a la mezcla ($8,71 \pm 1,04$). Para el caso de GLI-RU, las diferencias no fueron significativas pero mostraron la misma tendencia. En su conjunto, los resultados sugieren una acción de antagonismo entre estos formulados cuando se usan en mezcla.

Finalmente, la comparación entre los efectos endócrinos producidos por los compuestos separados en relación a los de su mezcla, mostró menores niveles de CORT para animales expuestos a la mezcla ($171,19 \pm 14,76$ ng/mm), aunque las diferencias fueron significativas sólo cuando se compararon con GLI-RU ($13,86 \pm 3,65$ ng/mm; $p< 0,001$). No obstante, la sumatoria entre la media de los valores de CORT obtenidos en animales expuestos a GLI-RU y la de los animales expuestos a CIP

(156,93 \pm 41,61 ng/mm) dio como resultado el valor correspondiente a la mezcla
(170,79 \approx 171 ng/mm), indicando una acción de tipo aditiva.

4.4 Discusión

Diferentes contaminantes, incluso en niveles muy bajos, pueden causar inmunotoxicidad en organismos no blanco. Por esta razón, algunos parámetros inmunológicos podrían servir como indicadores de toxicidad altamente sensibles en organismos expuestos a pequeñas concentraciones de estos químicos (Céspedes y col., 2019). Sin embargo, si bien se han realizado estudios de estos efectos sobre el SI de animales silvestres (apartado 1.5.5, Capítulo 1), muy pocos se han focalizado en los efectos de los plaguicidas sobre el SI de reptiles (Latorre y col., 2013, 2016; Siroski y col., 2016) y menos aún sobre los efectos producidos por las mezclas complejas de estos químicos. En este estudio encontramos que los formulados de plaguicidas comúnmente utilizados en nuestro país (GLI-RU, GLI-PZ, CIP y CPF) aplicados individualmente y en mezcla, provocan alteraciones en algunos parámetros inmunológicos y endócrinos, así como en el crecimiento corporal en ejemplares juveniles de iguana overa.

Hemos mencionado también en capítulos anteriores que el perfil hematológico puede proporcionar información sobre la condición interna del cuerpo de un animal antes de que exista cualquier indicio notable de enfermedades, por lo que un extendido de sangre periférica que permite analizar diferentes parámetros -como el RDGB e índices como el H/L e IL así como el RTGB-, continúan siendo el "estándar de oro" del diagnóstico hematológico (Campuzano-Maya, 2014). En este estudio, el valor del RTGB mostró un valor levemente menor ($p < 0,07$) en los organismos expuestos a la mezcla de plaguicidas, lo que podría estar indicando un posible efecto tóxico sobre este parámetro hematológico. Cuando se analizó este parámetro en los ensayos 2 y 3, los totales de leucocitos/mm³ registrados en animales expuestos a plaguicidas aplicados individualmente, tampoco mostraron diferencias significativas en los animales expuestos a GLI-RU, CIP y CPF en relación a sus respectivos controles. De manera similar, Arguedas y col. (2018) en *Bothrops asper* (víbora equis) no hallaron variaciones importantes sobre el número de leucocitos totales entre los grupos tratados con clorpirifos, revelando una respuesta celular no significativa sobre los organismos tratados con estos tóxicos.

Sin embargo en el ensayo 3, las medias registradas para RTGB fueron significativamente mayores en animales expuestos a la formulación individual de GLI-PZ respecto de los controles. Además, si se comparan los valores hallados de leucocitos /mm³ para animales tratados con GLI-RU (ensayo 2) con los valores obtenidos en animales expuestos a GLI-PZ (ensayo 3), se puede observar que ambos superan los valores encontrados en los controles de ambos experimentos. No

obstante, las diferencias no son significativas para los valores obtenidos en los animales expuestos a GLI-RU respecto de los controles, suponiendo un efecto particular del GLI-PZ relacionado a las características propias de la formulación. Cuando se evalúan los efectos causados por herbicidas, es común centrarse en la toxicidad del principio activo (p.a.) en lugar de la correspondiente a las formulaciones que incluyen dicho p.a., aunque se ha encontrado que estas últimas pueden ser más tóxicas que los p.a. (Lajmanovich y col., 2013; Reno y col., 2016). El formulado GLI-RU por ejemplo, contiene agua, sal de isopropilamina y un porcentaje de polioxietilamina (POEA). La toxicidad de este herbicida no sólo dependería del efecto del p.a. sino de la adición de POEA así como de otros aditivos usados en dicha formulación (Anguiano y Ferrari, 2019). Con el GLI-PZ ocurre lo mismo sólo que la composición química de su formulación es distinta, de manera que las diferencias encontradas entre animales expuestos a uno u otro formulado podrían estar relacionadas a cualquiera de sus componentes constituyentes (ver apartado 3.3, Capítulo 3). Además, como la mezcla analizada en el ensayo 1 contenía la formulación de GLI-RU y no GLI-PZ, la diferencia estadística encontrada en el RTGB en el ensayo 3 en animales expuestos a GLI-PZ, plantea nuevos interrogantes para futuras investigaciones donde los estudios de mezclas de plaguicidas incluyan esta marca comercial de GLI.

Distintos autores que han estudiado el efecto de formulados individuales, han reportado diferentes resultados según el tóxico aplicado, y la especie modelo de estudio analizada. En una exposición de *Tilapia guineensis* a 2,2-diclorovinil dimetil fosfato, Akinrotimi y col. (2018) encontraron una elevación de los RTGB ante un aumento de concentración de dicha sustancia química. Según estos autores, esto podría ser un indicio de que el animal puede construir un “aparato defensivo” para superar el estrés letal. Otros estudios reportan que un aumento en el RTGB podría estar correlacionado con un aumento en la producción de anticuerpos, que ayudaría en la supervivencia y recuperación de peces de las especies *Heteropneustes fossilis* y *Puntius ticto* expuestos a concentraciones sub letales de plaguicidas (Malik y col., 2015). Finalmente, Ware (2020) explica que la leucocitosis, o recuento elevado de glóbulos blancos, puede ser producto de infecciones, afecciones inflamatorias o neoplasias, y que el tipo específico de leucocito que está elevado puede ayudar a entender la causa de la leucocitosis. En el ensayo 3 se observó un número elevado en los recuentos de leucocitos de animales expuestos a GLI-PZ asociado a un incremento en la población de linfocitos. Estos últimos están involucrados en la defensa contra las infecciones virales y juegan un papel fundamental ante condiciones inflamatorias crónicas (Glassy, 2018); por lo que los valores elevados del RTGB en estos animales

podría ser consecuencia, por ejemplo, de inflamaciones crónicas causadas por acción tóxica de los plaguicidas aplicados.

Sin embargo, lo contrario ha sido reportado por diferentes autores en varias especies de vertebrados. En ejemplares de *Caiman latirostris* (yacaré overo) expuestos a GLI-RU (Siroski y col., 2016); de *Bufo melanostictus* (sapo común) expuestos a malatión (Mahananda y Mohanty, 2012), de *Cyprinus carpio* (carpa común) expuestos a diazinon (Ahmed 2012) y de *Ambystoma tigrinum* (salamandra tigre) expuestos a atrazina (Forson y Storfer, 2006), se observaron niveles más bajos de leucocitos periféricos con respecto a los controles. En relación con esos datos, en el ensayo de mezcla se observó una tendencia a la disminución en el RTGB en respuesta a la mezcla de diferentes sustancias tóxicas, lo cual podría estar relacionado a una migración de leucocitos hacia los órganos o sistemas afectados (Malik y col., 2015) o a un “debilitamiento” del sistema inmunitario (Kumar Maurya y col., 2019) frente a la acción tóxica de algunos compuestos. Un estudio reciente sobre el análisis de este parámetro, sostiene que se pueden observar recuentos bajos de leucocitos (leucopenia) en individuos después de la exposición a ciertos fármacos (Ware, 2020). En contraste con Latorre y col. (2013, 2016) y Siroski y col., (2016) quienes reportaron diferencias significativas entre los valores de RDGB de *C. latirostris*, entre controles y grupos tratados con formulaciones individuales de CPF, CIP y GLI-RU; en la presente investigación, estos parámetros no mostraron diferencias significativas en los animales expuestos a estos plaguicidas aplicados individualmente o en mezcla. Otros autores tampoco encontraron diferencias en este parámetro en sapos comunes (*Rhinella arenarum*) expuestos a clorpirifos (Lajmanovich y col., 2018), ni en ejemplares de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) expuestos a malation (Alavinia y col., 2019). En este estudio, sólo cuando se analizó el efecto de la aplicación de GLI-PZ (ensayo 3) sobre el RDGB en animales expuestos, se observó un valor mayor de linfocitos en circulación en relación a los controles.

Con respecto al índice H/L, se observaron valores significativamente menores de este parámetro, en animales expuestos a las formulaciones individuales de GLI-RU y GLI-PZ, CPF y CIP, en relación con los controles, posiblemente relacionados con los valores más elevados de linfocitos detectados y los valores de heterófilos más bajos observados en todos los tratamientos en relación a los controles. En el caso de los animales expuestos a la mezcla de estos plaguicidas (GLI-RU, CPF y CIP), no se encontraron diferencias significativas respecto de los CN, pero se observó una relación H/L inversa a la obtenida para animales expuestos a las formulaciones individuales. Esto motivó el desarrollo de un análisis estadístico que mostró resultados compatibles con efectos aditivos de los formulados cuando son usados en combinación.

El índice de Lobularidad (IL) fue mayor en animales expuestos a la mezcla de plaguicidas en el ensayo 1 así como para los animales del grupo experimental CIP del ensayo 3, en relación a sus respectivos controles. Esos elevados valores del IL podrían estar relacionados con un entorno celular desfavorable (Boxer y Dale, 2002), debido a que este índice da cuenta de la existencia de un mayor número de heterófilos maduros (con núcleos más segmentados) en la circulación sanguínea de los individuos expuestos. De manera similar, Salinas y col. (2015) encontraron mayores valores en los IL de ejemplares adultos de *Rhinella arenarum* (sapo común) en sitios más contaminados (1,86 y 1,83) en relación a sitios menos intervenidos antrópicamente (1,48 y 1,46). Por otra parte, cabe destacar que los valores de IL encontrados en el presente trabajo para los animales expuestos a la mezcla, fueron inferiores a todos los registrados para los animales expuestos a formulaciones individuales, mostrando un posible efecto antagonista entre los compuestos que, no obstante, sigue siendo mayor a su respectivo control.

Respecto a los niveles de anticuerpos naturales, los estudios sobre *Trachemys scripta* (tortuga de orejas rojas) sustentan la hipótesis de que las respuestas de AcN, no específicas, son una línea de defensa importante en los reptiles (Zimmerman y col., 2013). En este estudio, los títulos de AcN mostraron diferencias entre los grupos analizados en el ensayo 1, donde los valores de los animales expuestos a la mezcla de plaguicidas fueron más bajos que los de los controles, revelando algún tipo de efecto sobre la producción de AcN. En este sentido, las moléculas de los plaguicidas podrían estar ejerciendo alguna alteración en la producción natural de los AcN; sin embargo, los niveles de AcN en este ensayo nunca alcanzaron valores nulos, lo que sugiere que se mantiene una inmunidad basal incluso en estos casos. Areechon y Plumb, 1990 reportaron resultados similares a los aquí mencionados, donde los títulos de AcN fueron más bajos en bagres de canal (*Ictalurus punctatus*) expuestos al organofosforado Malatión en relación a los de los animales control.

En líneas generales en los ensayos 2 y 3 donde se analizaron exposiciones de animales a plaguicidas individuales no mostraron diferencias, en este parámetro, con respecto a los controles, con la excepción de CIP, donde los valores de AcN fueron significativamente más altos. Resultados similares fueron reportados por Vermeulen y col. (2015) quienes encontraron una tendencia positiva no significativa en *Parus major* (Carbonero común) expuesto al plomo. Nuevamente, al igual que lo observado en el Capítulo 3 (apartado 3.3) se encontraron diferentes respuestas de este parámetro según cuál fue el plaguicida analizado. En los ensayos descritos en este Capítulo así como en los descritos en el Capítulo 3, los animales expuestos a CIP mostraron los títulos de AcN más altos; mientras que en aquellos animales expuestos a GLI-RU,

como se describe en el Capítulo 3, y a la mezcla, en el presente Capítulo, fueron más bajos respecto de los controles. De esta manera, los resultados observados para este parámetro parecen sugerir que diferentes plaguicidas, y aplicaciones individuales o mixtas de ellos, pueden ejercer distintas acciones sobre la producción de los AcN. Finalmente, los valores hallados para los animales expuestos a la mezcla fueron significativamente inferiores a los registrados en los animales expuestos a los plaguicidas individuales usados en ella, mostrando una interacción antagonista entre dichos compuestos.

Particularmente, el SC del plasma sanguíneo es un elemento importante de la línea de defensa inmune innata de animales contra agentes infecciosos (Siroski y col., 2010); de tal modo que ciertas sustancias tóxicas podrían alterar la respuesta inmune a través de modificaciones en este sistema. Respecto a este parámetro (SC), algunos autores informaron que algunos tóxicos podrían afectar su actividad, como el pentaclorofenol en ratón (White y Anderson, 1985) y la formulación de GLI-RU en *C. latirostris* (Siroski y col., 2016). A diferencia de los mencionados autores, nuestros ensayos mostraron valores más altos de la actividad del SC en animales expuestos a la formulación individual de CIP (ensayo 3) respecto de los controles. Dutta y col., (2008) reportaron una activación de C3 y la generación de los componentes del complemento C3b, C3d y C3a mediante una vía alterna del complemento, causada por el insecticida DDT en suero de humanos. De la misma manera, se ha propuesto la activación directa de la cascada del SC después de la exposición *in vitro* al hexaclorobenceno (compuesto organoclorado) y malatión (compuesto organofosforado) también en suero de humanos (Banerjee y col., 1996).

Al igual que lo informado por Li y col., (2013) sobre el pez *Cyprinus carpio* expuesto a CPF, en este estudio no se encontraron diferencias entre los demás tratamientos respecto del control, sobre la actividad del SC. Resulta interesante destacar que los porcentajes de MH registrados para animales expuestos a la mezcla de plaguicidas, fueron significativamente menores que los de los animales expuestos a CPF y CIP mostrando una interacción entre dichos plaguicidas cuando son utilizados en mezcla, o al menos cuando son combinados con GLI-RU.

Los resultados de los diferentes ensayos experimentales realizados en esta Tesis, mostraron diferentes respuestas en el crecimiento (LHC y peso) de los ejemplares según el plaguicida y si fueron aplicados individualmente o combinados. En el ensayo 1 no se encontraron diferencias en el crecimiento, entre animales expuestos a la mezcla de plaguicidas con respecto a los animales de los controles. En animales expuestos a las formulaciones individuales de GLI-RU y CPF (ensayo 2) se encontraron mayores valores de LHC en animales expuestos. Finalmente, de manera

semejante a lo hallado en ranas (*Xenopus laevis*) expuestas a una mezcla de plaguicidas (Hayes y col., 2006), en el ensayo semicontrolado 3, los animales expuestos a GLI-PZ mostraron un incremento menor de peso y LHC respecto a los CN. Schoenle y col. (2018) han propuesto que la activación experimental de las respuestas inmunitarias puede provocar aumentos en la tasa metabólica y pérdida de masa corporal, indicando que la inmunidad tiene costos energéticos. En este sentido, los menores tamaños corporales encontrados en animales expuestos podrían deberse a una menor inversión de energía destinada a incrementar la masa corporal, relacionada al costo energético elevado que requiere la respuesta inmune frente a dichos tóxicos.

En relación a los incrementos en LHC y peso, algunos autores (Merrill y col., 2013; Wolmarans y col., 2018) proponen que determinados compuestos tóxicos pueden causar efectos obesogénicos así como caquexia (desnutrición, deterioro orgánico) en animales expuestos. De igual manera, los mencionados autores afirman que pueden existir correlaciones positivas y negativas entre los plaguicidas y la masa de tejido adiposo, pero que estas correlaciones son específicas según el compuesto y según las dosis utilizadas de dichos compuestos. En el mismo sentido, Bingnan y col., (2020) indican que los plaguicidas tienen el potencial de inducir trastornos metabólicos energéticos al perturbar el proceso físico de absorción y almacenamiento de energía en diferentes órganos en humanos; y que estos trastornos pueden generar sobrepeso o bajo peso.

Puede notarse además que los resultados obtenidos en este Capítulo para LHC, fueron opuestos para animales expuestos a GLI-RU respecto a los expuestos a GLI-PZ, mostrando nuevamente, respuestas contrarias en relación a la marca comercial del plaguicida aplicada.

Hayes y col., (2006) reportaron un aumento en los niveles de corticosterona en el plasma en ejemplares de *X. laevis* expuestos a una mezcla de plaguicidas. En este estudio encontramos niveles significativamente más altos de CORT en plasma de animales expuestos a la mezcla de plaguicidas (ensayo 1) y, por el contrario, valores más bajos de dicha hormona en los animales expuestos a GLI-RU (ensayo 2) respecto de los controles.

Se ha reportado que los plaguicidas pueden provocar una desregulación aguda o crónica de la CORT, representada por un aumento o disminución a niveles muy bajos de esta hormona que podría, en ambos casos, comprometer la salud de los organismos expuestos (McMahon y col., 2017). Las diferentes respuestas podrían estar relacionadas a una acción tóxica de los plaguicidas sobre el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) (ver apartado 1.4, Capítulo 1).

Por otra parte, estos resultados demuestran que los efectos sobre el sistema endócrino de los plaguicidas testados individualmente fueron diferentes a los causados por la mezcla. Esto refleja la importancia de la evaluación de los efectos de las mezclas de los plaguicidas, siendo ésta la forma predominante de su aplicación en cultivos modernos.

Los niveles de la CORT mostraron una correlación positiva con los valores de eosinófilos y heterófilos, así como con el índice H/L. La correlación entre los niveles de CORT con la proporción H/L podría estar relacionado al aumento de esta hormona frente al estrés, que puede desencadenar un incremento en el número de heterófilos como fuera reportado en *Chelonia mydas* (tortuga marina verde; Aguirre y col., 1995), en alligator (Morici y col., 1997) y en otros vertebrados (Davis y col., 2008). Por otra parte, el aumento de los niveles de CORT puede causar el efecto contrario en otros componentes del sistema inmunológico. Así lo hemos observado en este trabajo para parámetros como AcN, SC y monocitos. Como se mencionó anteriormente para tetrápodos no mamíferos, el comportamiento de esta hormona podría establecer un vínculo endocrino entre la inmunocompetencia y el estrés (Apanius, 1998).

Es importante destacar que la exposición crónica a concentraciones subletales de tóxicos, que conducen a cambios estructurales y funcionales en el sistema inmune, puede además dar como resultado una inmunosupresión que termina por reducir la resistencia del huésped (Browne, 2004; Crawshaw y Weinkle, 2000). En resumen, los contaminantes pueden causar inmunoestimulación (a veces con hipersensibilidad posterior), pero más comúnmente conducen a la inmunosupresión, lo que aumenta la susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Bigazzi, 1996; Gardner y Zelikoff, 1996). Berger y col., (2005) sugieren que los glucocorticoides plasmáticos elevados temporalmente pueden mejorar el sistema inmunológico, mientras que las concentraciones elevadas crónicas pueden ser inmunosupresoras.

En este estudio, donde las iguanas fueron expuestas a diferentes plaguicidas de manera individual y en mezcla en condiciones subcrónicas, hemos encontrado efectos opuestos de la CORT, según el tipo de parámetro inmunológico analizado y el plaguicida testado. Teniendo en cuenta la alta complejidad del sistema inmunológico, se considera que se podrían obtener resultados más concluyentes aumentando el número de parámetros evaluados así como realizando exposiciones de los ejemplares a diferentes plaguicidas.

De modo similar a los datos reportados para *Alligator mississippiensis* por Morici y col. (1997), los resultados del ensayo 1 mostraron que el nivel de corticosterona en plasma se correlacionó negativamente con la longitud hocico-cloaca. Hayes y col. (2006) quienes también hallaron mayores valores de CORT en animales expuestos a mezclas

de plaguicidas, sugirieron que dichos aumentos podrían estar produciendo alteraciones en parámetros tales como un desarrollo y crecimiento corporal más lento. En el ensayo 2 se observó que si bien el nivel de CORT se correlacionó también negativamente respecto del crecimiento (peso y LHC), pero de manera inversa; es decir, los bajos valores de la hormona en los animales expuestos a GLI-RU, estuvieron en relación a los mayores tamaños corporales registrados. Este resultado puede deberse a efectos obesogénicos mencionados anteriormente.

Los resultados de este Capítulo proporcionan evidencia de efectos inmunotóxicos de los plaguicidas analizados, pero también sobre un *trade-off* entre los niveles de CORT y los parámetros inmunológicos, así como entre las fluctuaciones de esta hormona y el crecimiento. Además, estos resultados mostraron variadas respuestas inmunes y endócrinas de los animales frente a la exposición a diferentes plaguicidas (así como frente a distintas formulaciones de un mismo plaguicida), o a su mezcla, revelando diferentes interacciones. De esta manera, la variabilidad y relevancia de estos resultados, resaltan la impredecibilidad de los efectos tóxicos de los plaguicidas en las especies animales silvestres.

CAPITULO 5

Discusión general y conclusiones finales



5.1 Discusión general

Como se ha mencionado en esta Tesis, el sistema agroproductivo actual, con utilización de una superficie de terrenos cada vez mayor, con reducción o ausencia de rotaciones junto a una baja incorporación de materia orgánica en los suelos y un uso indiscriminado de plaguicidas, se ha vuelto cada vez menos sustentable desde el punto de vista ecológico. Este tipo de agricultura se tornó más dependiente del aporte permanente de fertilizantes y plaguicidas, lo que ha contribuido a una disminución de la capacidad de resistencia de los cultivos frente al ataque de insectos y enfermedades (Souza Casadinho 2019).

Respecto a las consecuencias de este modelo agroproductivo, han quedado registrados a lo largo de toda esta Tesis, diferentes efectos sobre ejemplares de iguana overa, que se suman a investigaciones realizadas en diferentes especies. Tales consecuencias de la exposición de las poblaciones silvestres a estos productos dependen de muchos factores, incluyendo el principio activo (p.a), la composición de la formulación comercial, las concentraciones aplicadas, el momento y tipo de aplicación y las circunstancias de exposición.

Los reptiles son modelos especialmente útiles para realizar evaluaciones del estado de salud de un ambiente debido a su ecología y fisiología, pero, además, por su utilidad para estudios de laboratorio y de campo (Smith y French 2017). La iguana overa particularmente, es una especie que habita frecuentemente en zonas cercanas a cultivos intensivos en nuestro país; que constituyen sitios de alta exposición a plaguicidas. Por tales motivos, ha sido propuesta en este estudio como especie modelo para el análisis de efectos tóxicos de los plaguicidas más utilizados en la agroindustria de Argentina.

Los biomarcadores son herramientas de diagnóstico que permiten identificar y determinar las respuestas de los organismos a diferentes condiciones de exposición, constituyendo una importante fuente de información para la evaluación de efectos ecotoxicológicos (Ronco y col., 2008). A partir del uso de diferentes biomarcadores de toxicidad, en los últimos años nuestro grupo de trabajo ha reportado numerosos efectos producidos por las formulaciones de plaguicidas sobre reptiles estudiados en diferentes etapas de vida, en condiciones controladas o semi-naturales, incluyendo diferentes alteraciones sobre el desarrollo embrionario. Dichos estudios se focalizaron en efectos genotóxicos (Schaumburg y col., 2014; 2016) e inmunotóxicos (Siroski y col., 2017; Mestre y col., 2019; 2020) así como en la respuesta endócrina de la iguana overa a diferentes plaguicidas o combinaciones de éstos (Mestre y col., 2019). Además, en *Caiman latirostris* (yacaré overo), otro reptil autóctono, se han detectado

numerosas modificaciones a nivel genético, enzimático y/o metabólico (López González y col., 2013; 2017, Poletta y col., 2009; 2011a; 2011b; 2013; 2017; Burella y col., 2016) así como efectos tóxicos sobre la respuesta inmune y/o endócrina (Siroski y col., 2016; Latorre y col., 2016; 2018; Moleón y col., 2018; 2020) en animales expuestos a una variedad de formulaciones de plaguicidas y/o mezclas de las mismas. Los resultados de esta Tesis amplían y complementan dichos antecedentes, a la vez que incluyen nuevos biomarcadores para la especie.

En este trabajo, inicialmente se determinaron valores basales para iguana overa en seis parámetros hematológicos importantes: Recuento Total (RTGB) y Diferencial (RDGB) de Glóbulos Blancos, Índice de Heterófilos/Linfocitos (H/L), Índice de Lobularidad (IL), Títulos de AcN y actividad del Sistema de Complemento (SC); contribuyendo al conocimiento del SI de *S. merianae*. Del total de dichos parámetros, tres (RDGB, AcN y SC) mostraron diferencias entre las clases de edad resaltando la importancia de considerar estos parámetros como biomarcadores inmunológicos para la especie. Otros autores también han reportado diferencias en los valores hematológicos registrados para reptiles de diferentes edades. Stacy y col. (2011) y Casal y col. (2009), describieron cambios en RDGB relacionados con la edad en los porcentajes de algunas clases de glóbulos blancos en tortugas *C. caretta*. Respecto a la detección de AcN, otros autores también han detectado aumentos con la edad en serpientes pitones (Ujvari y Madsen, 2011) y en tortugas de orejas rojas (Zimmerman y col., 2013). Finalmente, en relación a la actividad del SC, nuestros resultados coinciden con lo reportado en mamíferos por Strasser y col. (2000), donde dicha actividad fue mayor en animales adultos respecto de juveniles. La ausencia de diferencias entre los parámetros inmunológicos evaluados en iguanas de distintos sexos, coincide con lo reportado en tortugas *Podocnemis expansa* (Oliveira-Júnior y col., 2009) y *Phrynops hilarii* (Latorre y col., 2015) así como en especies del género *Caiman* (Troiano y col., 1996).

Para analizar los marcadores inmunológicos mencionados, así como otros parámetros: endócrinos y de crecimiento (peso y longitud hocico-cloaca -LHC-) frente a la acción de plaguicidas, se realizaron diferentes ensayos experimentales donde ejemplares de *S. merianae* de distintas clases etarias, fueron expuestos a plaguicidas utilizados en la actualidad en la agricultura: Glifosato (GLI), Clorpirifos (CPF) y Cipermetrina (CIP). Particularmente del GLI, se evaluaron las dos marcas más usadas en nuestro país: Glifosato Roundup (GLI-RU) y Glifosato Panzer Gold (GLI-PZ). Dichos ensayos experimentales consistieron en variadas exposiciones a los mencionados plaguicidas, tanto en etapas embrionarias por medio de topicación de huevos, como en juveniles bajo condiciones semicontroladas. Los resultados demostraron diferentes efectos

sobre los parámetros inmunológicos, de crecimiento y sobre la concentración de la hormona corticosterona (testada sólo en animales juveniles). Todos los parámetros analizados en cada ensayo revelaron diferencias significativas entre organismos expuestos en relación a los controles al menos en uno de los experimentales, revelando la utilidad de cada uno de estos parámetros para realizar una evaluación toxicológica. Los efectos dependieron de la clase de plaguicida testado. En este sentido, el RTGB mostró diferencias entre animales juveniles controles y aquellos expuestos a GLI-PZ, mientras que el RDGB además de mostrar los mismos efectos sobre juveniles del grupo GLI-PZ, reveló también diferentes proporciones leucocitarias en embriones expuestos a GLI-RU y a CIP, en relación a sus controles. Estos resultados demuestran la importancia del presente estudio, debido a que los mencionados parámetros han sido propuestos como buenos indicadores de salud de un organismo (Campuzano-Maya, 2014). Otros autores han reportado efectos tóxicos sobre estos parámetros en ejemplares de *C. latirostris* expuestos a GLI-RU (Siroski y col., 2016; Latorre y col., 2016); en especímenes de *Bufo melanostictus* (sapo común) expuestos a malatión (Mahananda y Mohanty, 2012), en ejemplares de *Cyprinus carpio* (carpa común) expuestos a diazinon (Ahmed 2012) y en peces de la especie *Heteropneustes fossilis* contaminados con urea (Maitra y Nath, 2014). El índice de lobularidad que informa acerca de la presencia de factores que causarían efectos agudos o crónicos a través de la evaluación del grado de madurez de los heterófilos (García y col., 1997; Cabagna Zenklusen, 2012), reveló diferencias en juveniles expuestos tanto a la formulación de CIP como a la mezcla de plaguicidas testadas. Los elevados valores del IL encontrados en este estudio coinciden con lo informado por Salinas y col. (2015), quienes encontraron mayores valores en los IL de ejemplares adultos de *Rhinella arenarum* (sapo común) en sitios contaminados en relación a sitios menos intervenidos antrópicamente. El índice H/L fue el parámetro que mostró diferencias en la mayor cantidad de los ensayos realizados, ya sea en embriones topicados con GLI-RU y con CIP, como en juveniles expuestos a las formulaciones individuales de todos los plaguicidas y marcas testadas, en relación a sus controles. Estos resultados refuerzan la propuesta de que este índice puede ser utilizado como una medida de la respuesta inmunológica de los individuos al estrés (Davis y col., 2008). El otro parámetro inmunológico que mostró ser muy eficaz para evaluación toxicológica fue el de títulos de AcN, que hasta el momento no había sido considerado para la especie. Los embriones topicados con CIP, GLI-RU y GLI-PZ, así como aquellos juveniles expuestos a la formulación de CIP y a la mezcla de plaguicidas, mostraron diferentes efectos sobre los títulos de AcN en relación a sus respectivos controles. Otros efectos similares fueron reportados en bagres de canal

(*Ictalurus punctatus*) expuestos al organofosforado Malatión (Areechon y Plumb, 1990) y en *Parus major* (Carbonero común) expuesto a dosis de plomo (Vermeulen y col. 2015). Finalmente, de modo similar a lo reportado por White y Anderson (1985) en ratones expuestos a pentaclorofenol y por Siroski y col. (2016) en *C. latirostris* expuestos a la formulación de GLI-RU, en este estudio la actividad del SC mostró efectos tóxicos en animales juveniles expuestos al plaguicida CIP; validando a la actividad del SC, como un indicador de efectos tóxicos sobre algunos organismos. Asimismo, se encontraron diferentes niveles de correlación entre la concentración de la corticosterona y los parámetros inmunológicos y de crecimiento, revelando un *trade off* entre dichas variables. Los resultados de este trabajo sugieren que el comportamiento de esta hormona determina el vínculo entre el sistema endocrino, la inmunocompetencia, el crecimiento y el estrés. Es muy importante destacar que los efectos del estrés sobre la función inmune u otras variables, a menudo dependen del contexto y pueden variar entre especies o incluso dentro de ellas, según el tipo o la duración del factor estresante (Leung y Bloom, 2003; Love y col., 2017).

En nuestros ensayos semicontrolados sobre juveniles, así como en los animales nacidos de huevos topicados, se encontraron efectos diferenciales respecto de la marca comercial aplicada de glifosato, mostrando mayor toxicidad el formulado Panzer Gold (GLI-PZ) respecto a Roundup (GLI-RU), sobre los diferentes parámetros analizados. Ambas formulaciones testeadas en los diferentes ensayos experimentales, poseen un porcentaje de p.a. declarado similar, siendo incluso menor en GLI-PZ, por lo que a pesar de que la toxicidad del p.a. no fue testada en este trabajo de Tesis, las distintas composiciones químicas de cada formulado parecen ser las responsables de las diferencias encontradas. La toxicidad de este herbicida no sólo dependería del efecto del p.a. sino de la adición de aditivos y coadyuvantes usados en dicha formulación (Anguiano y Ferrari, 2019). Es por esta razón que algunos autores recomiendan centrarse en la toxicidad correspondiente a las formulaciones cuando se evalúan los efectos causados por herbicidas, en lugar de la que representa solo el p.a. (Lajmanovich y col., 2013; Reno y col., 2016).

Para el caso de los embriones, las exposiciones se realizaron por topicación de huevos de los plaguicidas en dos estadios diferentes de desarrollo. Los efectos encontrados dependieron de la clase de plaguicida analizado (GLI, CPF o CIP), de las concentraciones testeadas para cada uno y de la marca comercial de GLI empleada, así como también del desarrollo embrionario que poseían los animales al momento de la exposición. Se observaron mayores efectos cuando los animales fueron expuestos en un estadio más avanzado del desarrollo. Similares resultados han sido reportados en embriones de ratas expuestos a plomo en una fase gestación más tardía respecto a

los expuestos en una fase más temprana (Bunn y col. 2001). Estas diferencias en la respuestas entre animales expuestos a diferentes etapas del desarrollo embrionario, podrían ser una consecuencia de la falta de desarrollo en algunos órganos o sistemas de los animales expuestos en una etapa de gestación más incipiente; o bien debido al mayor tiempo que tuvieron estos embriones para corregir los efectos causados por la exposición a través de mecanismos de reparación (Burella y col., 2017).

Otro hallazgo importante, fue un mayor número de muertes embrionarias en huevos expuestos en un estadio intermedio de desarrollo, a varias concentraciones de los tres plaguicidas testeados. Khan y col. (2015) también reportaron mayor porcentaje de muertes embrionarias en aves (*Gallus gallus domesticus*) nacidas de huevos expuestos a la mezcla de los insecticidas CIP y CPF en relación a los porcentajes registrados para los controles. De la misma manera, en este mismo grupo de huevos de *S. merianae* topicados a la mitad de su desarrollo embrionario, se detectaron retrasos en los nacimientos respecto de los controles. Estos efectos no fueron detectados en huevos topicados durante los primeros días de desarrollo, sugiriendo nuevamente que los resultados pueden ser diferentes dependiendo el momento en que se realiza la aplicación. Además, se encontró una relación en las muertes de embriones expuestos según el nido de procedencia. Estas diferentes respuestas cobran especial interés desde un punto de vista biológico, revelando diferentes susceptibilidades de cada nido conocidas como "efecto nido". Nuestros resultados mostraron dicha variación entre nidos, validando la utilización de diferentes nidos y su distribución equitativa en los distintos grupos experimentales de cada ensayo.

En todos los ensayos de exposición se analizaron tanto efectos individuales de los plaguicidas como de las mezclas de tales formulados. Independientemente del tipo de exposición llevada a cabo (ensayos semicontrolados y de topicación de huevos), las mezclas de plaguicidas mostraron distintos efectos en relación a los causados por los compuestos individuales, evidenciando en algunos casos interacciones antagónicas, efectos aditivos e incluso, independientes. Al respecto, las formulaciones testeadas son aplicadas comúnmente en mezclas terciarias en la agricultura moderna, pero también existen actualmente otras combinaciones posibles, tanto de diferentes clases de plaguicidas, como de marcas comerciales (Beyer y col., 2014). Esto plantea el interrogante para futuras investigaciones acerca de cuáles serían los resultados al evaluar los parámetros que revelaron diferentes interacciones, cuando sean analizados animales expuestos a mezclas que incluyan otras marcas comerciales. Por esta razón, el presente estudio podría considerarse como un punto de partida para futuras investigaciones, donde sean considerados estos efectos diferenciales entre formulaciones sumados a posibles interacciones entre los mismos.

Los resultados de la presente Tesis también revelaron diferentes respuestas inmunes frente a las exposiciones de los plaguicidas, observándose en ciertos casos una disminución en la respuesta de alguna variable respecto de los controles, así como un incremento en dicha respuesta en otros casos. En relación a este punto, algunos autores (Medzhitov y col., 2012; Smith y French 2017) sostienen que una respuesta inmune agresiva no siempre resulta beneficiosa para la supervivencia y la aptitud en animales silvestres, y que el aumento de la eficiencia inmune en lugar de maximizar la robustez de la respuesta, es probablemente la estrategia más eficaz ante situaciones de estrés ambiental. De lo anterior se desprende que el sistema inmune es complejo y que involucra tanto coordinación como interacciones antagónicas entre diferentes componentes inmunes (Zimmerman y col., 2018). Además, mientras estas respuestas inmunes son críticas para la supervivencia del huésped ante el ingreso de cualquier sustancia ajena al organismo, se cree que la participación de cada componente de la inmunidad puede variar según el medio ambiente en que se encuentra el animal (Martin y col., 2009). En este contexto, en un mundo dominado por el cambio antropogénico, es crucial entender cómo los individuos informan a través de sus respuestas inmunes las dinámicas de una población, que a su vez, determinan la persistencia de su especie (Smith y French 2017).

5.2 Conclusiones finales

La variabilidad y relevancia de los resultados encontrados en esta Tesis, se suman a las evidencias informadas en otras especies, resaltando la impredecibilidad de los efectos tóxicos de los plaguicidas en las especies animales silvestres. En líneas generales, los hallazgos de este estudio contribuyen al conocimiento de los efectos de la exposición a diferentes plaguicidas en distintas clases etarias de *S. merianae*, además de validar el uso de diferentes biomarcadores para el análisis de dichos efectos. A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis, así como mediante comunicaciones volcadas en distintos artículos de revistas científicas especializadas y en congresos nacionales e internacionales, se han generado valiosos conocimientos que intentan alertar sobre los efectos de plaguicidas sobre los animales silvestres e impactan potencialmente sobre las estrategias de uso sustentable para *S. merianae*, así como de especies similares. Debido al rol ecológico que desempeña la iguana overa como indicador ambiental y a su rol socioeconómico de importancia regional (Siroski y col., 2017), la información generada por este trabajo de Tesis resulta de gran utilidad para el programa de conservación (PI), aportando al conocimiento de la biología de la especie y al estado de salud de sus ambientes. En este contexto, se sugiere continuar con la evaluación de los efectos de estos plaguicidas, empleando biomarcadores que permitan identificar las condiciones reales de exposición en las que se encuentra esta especie en su ambiente natural. Al respecto, resulta crucial que aquellos estudios futuros en relación con esta problemática vinculada al modelo productivo actual, se centren en fomentar la interacción entre la comunidad científica y quienes elaboran y aplican las normas, para que la información basada en investigaciones sea integrada a leyes progresivas que permitan proteger las especies silvestres potencialmente afectadas (Croteau y col., 2008). En nuestro país, existen legislaciones y normativas que promueven y recomiendan una aplicación responsable para una producción sustentable, pero no se efectúan los controles necesarios para el cumplimiento de las mismas (Tomasoni, 2013).

Por otra parte, al abordar las causas y consecuencias de la variación inmune en el contexto de cambio antropogénico, la ecoinmunología podría proporcionar ideas que tengan implicancias para la salud pública y la conservación, al colocar a la inmunología en contextos evolutivos y ecológicos en los diferentes niveles de organización biológica, desde el organismo a las interacciones a nivel comunitario (Schoenle y col., 2018). En este sentido, se podría proponer combinar medidas de control biológico y cultural, adoptando técnicas no químicas conocidas para controlar o

eliminar las poblaciones de plagas, incluyendo la aplicación de productos biológicos como bioplaguicidas, variedades resistentes de plantas y rotación de cultivos (Wagner y col., 2015; Abubakar 2020). Concluyentemente, se podría pensar la agroecología como un paradigma civilizatorio, con mayor profundidad conceptual y práctica que un modo de producción agrario, tanto para la sustitución de plaguicidas, como para la recreación de sistemas productivos viables y sustentables (Souza Casadinho 2019).

Por último, considerando los objetivos planteados para el presente trabajo de Tesis Doctoral y los resultados obtenidos, se resumen a continuación las siguientes conclusiones finales:

- Se incorporaron y caracterizaron nuevos biomarcadores de inmunotoxicidad para evaluar exposición de *S. merianae* a diferentes formulaciones de plaguicidas, los cuales mostraron ser variables y sensibles ante dichas exposiciones.
- Los resultados sugieren un daño inmunotóxico inducido por formulaciones de los insecticidas Cipermetrina y Clorpirifos y del herbicida Glifosato, así como por su mezcla, en embriones y juveniles de *S. merianae*, bajo condiciones controladas de exposición (*in ovo* y semicontroladas respectivamente).
- En todos los ensayos experimentales las diferentes respuestas inmunológicas, endócrinas y de crecimiento -según corresponda- de los organismos a las exposiciones a plaguicidas dependieron del compuesto aplicado, de la marca comercial de Glifosato probada y del método de exposición: individual o combinada.
- Las mezclas de plaguicidas mostraron menores, iguales o mayores efectos en relación a los causados por los compuestos individuales, evidenciando en algunos casos interacciones antagónicas o efectos aditivos entre dichos formulados, así como efectos independientes en otros.
- En juveniles expuestos en condiciones semicontroladas a mezcla de plaguicidas así como a algunas formulaciones individuales de estos, se encontraron efectos sobre la hormona corticosterona y diferentes tipos de correlación entre ésta y algunos parámetros inmunológicos y de crecimiento, revelando un *trade off* entre dichas variables.
- En las exposiciones *in ovo* las respuestas inmunológicas dependieron además del plaguicida testeado, su marca comercial y aplicación individual o en mezcla, de las diferentes concentraciones testeadas y de la etapa embrionaria al momento de la aplicación tópica.

- Se observaron mayores muertes embrionarias en huevos topicados con algunas concentraciones de plaguicidas que dependieron de la sensibilidad del nido de procedencia, aún cuando las concentraciones aplicadas fueron siempre inferiores a las recomendadas y aplicadas en campo.
- En base a estos estudios, es necesario continuar con la evaluación de los efectos de plaguicidas, atendiendo también a las diversas marcas comerciales así como a las diferentes combinaciones de los mismos utilizadas en la agricultura moderna, mediante el uso de biomarcadores que nos permitan identificar las condiciones reales de exposición en las que se encuentra esta especie en su ambiente natural.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2012. Cellular and molecular immunology. 7a ed. Elsevier Health Sciences, USA. p. 545.
- Abdou RH, Sayed N. 2019. Antioxidant and anti-inflammatory effects of nano selenium against cypermethrin induced liver toxicity. *Cell Bio.* 8(04): 53.
- Abrahão CR, Russell JC, Silva JCR, Ferreira F, Dias RA. 2019. Population assessment of a novel island invasive: tegu (*Salvator merianae*) of Fernando de Noronha. En: Island invasives: scaling up to meet the challenge. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission N° 62: 317-325.
- Abubakar Y, Tijjani H, Egbuna C, Adetunji CO, Kala S, Kryeziu TL (...), Patrick-Iwuanyanwu KC. 2020. Pesticides, history, and classification. En: Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control. Academic Press. Nigeria. p 29-42.
- Adelizzi R, Portmann J, Van Meter R. 2019. Effect of individual and combined treatments of pesticide, fertilizer, and salt on growth and corticosterone levels of larval southern leopard frogs (*Lithobates sphenoccephala*). *Archives Environ Contam Toxicol.* 77(1): 29-39.
- Agost L, Velázquez GA. 2020. Peri-urban pesticide contamination risk index. *Ecol Indic.* 114: 106-338.
- Aguirre AA, Balazs GH, Spraker TR, Gross TS. 1995. Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropillomas. *Physiol Zool.* 68: 831-854.
- Ahmad Z. 2011. Acute toxicity and haematological changes in common carp (*Cyprinus carpio*) caused by diazinon exposure. *African J Biotech.* 10(63): 13852-13859.
- Akinrotimi OA, Wilfred EPC, Ukwe OIK. 2018. Effects of 2, 2-Dichlorovinyl Dimethyl Phosphate (DDVP) on leukocyte profiles in juveniles and adult sizes of *Tilapia guineensis*. *MO J Immunol.* 6(5): 173-176.
- Alavinia SJ, Mirvaghefi A, Farahmand H, Rafiee G, Alavinia SJ, Shiry N, Moodi S. 2019. DNA damage, acetylcholinesterase activity, and hematological responses in rainbow trout exposed to the organophosphate malathion. *Ecotoxicol Environ Safety.* 182: 109-31.
- Andert S, Mutz JE, Wiese A, de Mol F, Steinmann HH, Gerowitt B. 2019. Farmers' statements are reliable comparing two different data sources about glyphosate use in Germany. *Crop Protection.* 124: 104-876.

- Andrews RM. 2004. Patterns of embryonic development. *Rep Inc Environ Evolut Beh.* 75-102.
- Anguiano OL, Ferrari A. 2019. Riesgo Ecotoxicológico de Plaguicidas Utilizados en Argentina. Tesis Doctoral. Fac. Ingeniería y Fac. Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue PROBIEN (CONICET – UNCo).
- Apanius V. 1998. Stress and immune defense. En: Moller AP, Milinski M, Slater PJB. p 133-153. Ed. *Stress Beh.* Academic Press. New York.
- Aragón j, Flores F. 2006. Control integrado de plagas en soja en el sudeste de Córdoba. *Sección Entomología. Área Suelos y Producción Vegetal.* 7: 43-46.
- Areechon N, Plumb JA. 1990. Sublethal effects of malathion on channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 44(3): 435-442.
- Arguedas R, Gómez A, Barquero MD, Chacón D, Corrales G, Hernández, León G. 2018. Effect of exposition to chlorpyrifos upon plasmatic cholinesterases, hematology and blood biochemistry values in *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae). *Chemosphere.* 205: 209-214.
- Arya AK, Singh A, Bhatt D. 2019. Pesticide applications in agriculture and their effects on birds: An overview. *Contaminants in Agriculture and Environment: Health Risks and Remediation.* 1-129. Chapter 10.
- Ávila-Pires T. 1995. Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). p 706-710. Ed. Leiden: Zoologische. Verhandelingen.
- Avrameas S. 1991. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunology today.* 12(5): 154-159.
- Baldwin NP. 2019. Evaluating the sub-lethal toxicity of the organophosphate pesticide, chlorpyrifos, on the amphibian, *xenopus laevis* (doctoral dissertation). University of Saskatchewan.
- Banerjee K, Oulkar DP, Patil SB, Jadhav MR, Dasgupta S, Patil SH., (...) Adsule PG. 2009. Multiresidue determination and uncertainty analysis of 87 pesticides in mango by liquid chromatography– tandem mass spectrometry. *J agricultural food chemistry.* 57(10): 4068-4078.
- Bano F, Mohanty B. 2020. Thyroxine modulation of immune toxicity induced by mixture pesticides mancozeb and fipronil in mice. *Life Sci J.* 240: 117078.

- Barboza N, Mussart N, Coppo J, Fioranelli S, Koza G. 2008. Internal medium of *Caiman latirostris* in captivity. Influence of sex, growth, and season. *Res Vet.* 19: 33-41.
- Beldomenico PM, Rey F, Prado WS. 2007. *In ovum* exposure to pesticides increases the egg weight loss and decreases hatchlings weight of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Ecotoxicol Environ Saf.* 68: 246-251.
- Beldomenico PM, Begon M. 2016. Stress-host-parasite interactions: a vicious triangle?. *Fave Ciencias Veterinarias*. Universidad Nacional del Litoral. Esperanza, Santa Fe, Argentina.
- Belperron AA, Bockenstedt LK. 2001. Natural antibody affects survival of the spirochete *Borrelia burgdorferi* within feeding ticks. *Infect Immun.* 69/64: 56-62.
- Benatuil L, Kaye J, Cretin N, Godwin J, Cariappa A, Pillai S, Iacomini J. 2008. Igknock in mice producing anti-carbohydrate antibodies: Breakthrough of B-cells producing low affinity anti-self antibodies. *J Immunol.* 180: 3839-3848.
- Berger S, Martin II LB, Wikelski M, Romero LM, Kalko EKV, Vitousek MN, Rodl T. 2005. Corticosterone suppresses immune activity in territorial Galapagos marine iguanas during reproduction. *Horm Behav.* 47: 419-429.
- Bertero A, Chiari M, Vitale N, Zanoni M, Faggionato E, Biancardi A, Caloni F. 2020. Types of pesticides involved in domestic and wild animal poisoning in Italy. *Sci Total Environ.* 707: 136129.
- Beyer J, Petersen K, Song Y, Ruus A, Grung M, Bakke T, Tollefsen KE. 2014. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: A discussion paper. *Marine Environ Res.* 96: 81-91.
- Bigazzi PE. 1996. Autoimmunity induced by metals. En: Chang LW. p 835-852. Ed. *Toxicology of Metals*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Bingnan QIAN, Fan SUN, VERMAUT P, PRIMA F. 2020. Fine-tuning of stress-induced martensite in TRIP/TWIP Ti alloys. In *MATEC Web of Conferences* 321: 11038. EDP Sciences.
- Binder CJ, Shaw PX, Chang MK, Boullier A, Hartvigsen K, Hörkkö S, Miller YI, Woelkers DA, Corr M, Witztum JL. 2005. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. The role of natural antibodies in atherogenesis. *J lipid res.* 46(7): 1353-1363.

Bolsa de cereales de Buenos Aires. Panorama agrícola semanal: soja. [Http://www.bolsadecereales.com](http://www.bolsadecereales.com) Último acceso 23-04-2020.

Bonanseña RI, Amé MV, Wunderlin DA. 2013. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquía River basin (Argentina). *Chemosphere*. 90: 1860-1869.

Boxer L, Dale DC. Neutropenia: causes and consequences. *Sem Hematol*. Department of Pediatrics, University of Washington, Seattle, WA 98195-6422, USA. Abril 2002. 39(2): 75-81.

Browne CL. 2004. Impacts of Urbanisation and Metal Pollution on Freshwater Turtles. Thesis Doctor of Philosophy. School of Biological Sciences. University of Sydney.

Brusch IV, GA, De Nardo DF. 2019. Egg desiccation leads to dehydration and enhanced innate immunity in python embryos. *Develop Come Immunol*. 90: 147-151.

Bunn TL, Parsons PJ, Kao E, Dietert RR. 2001. Exposure to lead during critical windows of embryonic development: differential immunotoxic outcome based on stage of exposure and gender. *Toxicol Sci*. 64(1): 57-66.

Burella PM, Simoniello MF, Poletta GL. 2017. Evaluation of Stage-Dependent Genotoxic Effect of Roundup® (Glyphosate) on *Caiman latirostris* Embryos. *Archives Environ Contam Toxicology*. 72(1): 50-57.

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. *Ecotox Environm Saf*. 161: 441-463.

Burns L, Meade B, Munson A. 1996. Toxic Responses of the Immune System. En: Casarett & Doull's Toxicology: Basic Science of Poisons. p 355-402. Ed. (5th) Klaassen C. New York: McGraw Hill.

Cabagna Zenklusen M, Lajmanovich R, Attademo A, Peltzer P, Junges C, Fiorenza Biancucci G, Bassó A. 2011. Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islas del río Paraná, Argentina. *Rev Biol Trop*. 59: 17-28.

Cabagna Zenklusen M. 2012. Caracterización hematológica de especies de anfibios anuros con distribución en los ecosistemas del litoral fluvial argentino (provincias de Entre Ríos y Santa Fe). Potencialidad de su utilización como biomarcadores. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

- Campbell TW. 2006. Chapter 28: Clinical Pathology of Reptiles. En: Mader, D.R. p 453-470. Ed. Reptile Medicine and Surgery. Elsevier Inc. St Louis.
- Campuzano-Maya G. 2007. Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. *Med Lab.* 13(11-12): 511-50.
- Campuzano-Maya G. 2014. Hematologic manifestations of *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol.* 20(36): 12818.
- Cardona Y, Chaparro AL, Calderón LS, Peláez MJ, García CH. 2011. Estandarización de un método analítico para extracción y cuantificación de cipermetrina en pastos. *Rev Colomb Quím.* 40(2): 211-226.
- Carrascal Velásquez J, Negrete Cartagena H, Rojano Bolaño C, Álvarez Otero G, Chacón Pacheco J, Linares Arias J. 2014. Hematological Characterization of *Hicotea* Turtles (*Trachemys callirostris* Gray, 1856) in Córdoba (Colombia). *Rev Med Vet.* (28): 43-55.
- Carroll MC. 1998. The role of complement and complement receptors in the induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.* 16: 545-68.
- Carvalho RL, Antoniazzi MM, Jared C, Silva AMJ, Egami MI. 2006. Morphological, cytochemical, and ultrastructural observations on the blood cells of the reptile *Tupinambis merianae* (Squamata). *Comp Clin Pathol* 15: 169-174.
- Carvalho WF, de Arcaute C, Torres L, e Silva DDM, Soloneski S, Larramendy ML. 2020. Genotoxicity of mixtures of glyphosate with 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid chemical forms towards *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Environ Sci Pollut Res.* 27(6): 6515-6525.
- Casal AB, Camacho M, López-Jurado LF, Juste C, Orós J. 2009. Comparative study of hematologic and plasma biochemical variables in Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Vet Clin Pathol.* 38(2): 213-218.
- Céspedes GKH, Ocampo LMM, Méndez EJM, Rubiom ÁEC, Barragán ISR. 2019. Evaluación de la toxicidad del clorpirifos en alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Rev Int Contam Ambie.* 35(4): 815-829.
- Charipper H. 1928. Studies on the Arneth count. The effect of the injection of thyroid extract on the polynuclear count in a perennibranchiate amphibian (*Necturus maculosus*). *Exp Physiol.* 19: 109-113.
- Chiaia-Hernandez AC, Keller A, Wächter D, Steinlin C, Camenzuli L, Hollender J, Krauss M. 2017. Long-term persistence of pesticides and TPs in archived agricultural

soil samples and comparison with pesticide application. *Environ Sci Technol.* 51(18): 10642-10651.

Chi-Coyoc TE, Segura GE, Moncada AV, Contreras JAV, Vela GEC, Reyna, JL 2016. Pesticidas organoclorados y anticolinérgicos en ratones salvajes de ecosistemas de humedales del Golfo de México. *Therya.* 7(3): 465-482.

Christin MS, Gendron AD, Brousseau P, Ménard L, Marcogliese DJ, Cyr D, Ruby S, Fournier M. 2003. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. *Environ Toxicol Chem.* 22: 1127-1133.

Claus G, Spanoghe P. 2020. Quantification of pesticide residues in the topsoil of Belgian fruit orchards: terrestrial environmental risk assessment. *Pest Manag Sci.* p 1-16.

Claver J, Quaglia A. 2009. Comparative morphology, development, and function of blood cells in non-mammalian vertebrates. *J Exp Pet Med.* 18: 87-97.

Collado V, Porras R, de Simón M, Lucía E. 2008. The innate immune system: Mechanisms. *Rev Comp Vet.* 2: 1-16.

Comité de Acción para la Resistencia a los Insecticidas. 2015. [Http://www.irac-online.org/countries/spain](http://www.irac-online.org/countries/spain) Último acceso 07-07-2020.

CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas). 2005. Reference Ethical Framework for Biomedics Research: Ethical Principles for Research with Laboratory, Farm, and Wild Animals, #1047. Anexo II, Buenos Aires, Argentina: CONICET.

Cotter PF, Ayoub J, Parmentier HK. 2005. Directional selection for specific sheep cell antibody responses affects natural rabbit agglutinins of chickens. *Poult Sci.* 84: 220-225.

Crawshaw GJ, Weinkle TK. 2000. Clinical and pathological aspects of the amphibian liver *Sem Av Exot Pet Med.* 9(3): 165-173.

Croteau MC, Hogan N, Gibson JC, Lean D, Trudeau VL. 2008. Toxicological threats to amphibians and reptiles in urban environments. *Urban herpetology. Herpetol Conservation.* 3: 197-209.

Cuervo-Perez JF, Camilo Arango J, Cardona-Arias JA. 2014. Evaluación de técnicas inmunológicas in vitro para el diagnóstico de alergias: metanálisis 2000-2012. *Rev Esp Salud Pub.* 88(1): 67-84.

- da Silva EAP, Santos TD, Leite GN, Ribeiro LB. 2013. *Tropidurus hispidus* (Squamata: Tropiduridae) and *Leptodactylus cf. fuscus* (Anura: Leptodactylidae) as prey of the teiid lizards *Salvator merianae* and *Ameiva ameiva*. Herpetol Notes. 6: 51-53.
- Davico CE, Loteste A, Parma MJ, Poletta G, Simoniello MF. 2020. Stress oxidative and genotoxicity in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) exposed to commercial formulation of insecticide cypermethrin. Drug and chemical toxicology. 43(1): 79-84.
- Davison F, Magor KE, Kaspers B. 2008. Structure and Evolution of Avian Immunoglobulins. En: Avian Immunology. Fred Davison, Bernd Kaspers Karel A. Schat. p 107-27. Ed. Academic Press. London. UK.
- Davis AK, Maerz JC. 2009. Effects of larval density on hematological stress indices in salamanders. J Exp Zool. 311A: 1-8.
- Davis KA, Schmidt JB, Doescher RM, Satterlee DG. 2008. Fear responses of offspring from divergent quail stress response line hens treated with corticosterone during egg formation. Poul Sci. 87(7): 1303-1313.
- de Andrade Vieira JE, de Oliveira Ferreira R, dos Reis Sampaio DM, da Costa Araújo AP, Malafaia G. 2019. An insight on the mutagenicity and cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles in *Gallus gallus domesticus* (Phasianidae). Chemosphere. 231: 10-19.
- de Castro ER, Galetti M. 2004. Frugivoria e dispersão de sementes pelo lagarto teiú *Tupinambis merianae* (Reptilia: Teiidae). Pap Avulsos Zool. 44(6): 91-97.
- Deeming DC. 2004. Prevalence of TSD in crocodylians. Temperature-dependent sex determination in vertebrates. Washington: Smithsonian. 33-41.
- del Puerto Rodríguez AM, Tamayo SS, Estrada DEP. 2014. Effects of pesticides on health and the environment. Rev Cubana Hig Epidemiol. 52(3): 372-387.
- de Solla SR, Martin PA. 2011. Absorption of current use pesticides by snapping turtle (*Chelydra serpentina*) eggs in treated soil. Chemosphere. 85(5): 820-825.
- Deza FG, Espinel CS, Mompó SM. 2009. The immunoglobulin heavy chain locus in the reptile *Anolis carolinensis*. Molecular Immunol. 46(8-9): 1679-1687.
- Dias C, Serra CR, Simões LC, Simões M, Martinez-Murcia A, Saavedra MJ. 2014. Extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase-producing *Aeromonas* species in wild animals from Portugal. Vet Rec.
- Di Fiori E, Pizarro H, Dos Santos AM, Cataldo D. 2012. Impact of the invasive mussel *Limnoperna Fortunei* on glyphosate concentration in water. Ecotoxicol Environ Saf. 81: 106-113.

- Donadio OE, Gallardo JM. 1984. Biología y conservación de las especies del género *Tupinambis* (Squamata, Sauria, Teiidae) en la República Argentina. Rev Museo Argentina Cs Nat "Bernardino Rivadavia" (Zool). 13: 117-127
- Douglas RS, Afifyan NF, Hwang CJ, Chong K, Haider U, Richards P, Gianoukakis AG, Smith TJ. 2010. Increased generation of fibrocytes in thyroid-associated ophthalmopathy. J Clin Endocrinol Metabol. 95(1): 430-438.
- Durbach N. 2007. James Colgrove. State of Immunity: The Politics of Vaccination in Twentieth-Century America. figs. Index. Berkeley. Los Angeles: University of California Press. 332 pp.
- Dutta R, Mondal AM, Arora V, Nag TC, Das N. 2008. Immunomodulatory effect of DDT (bis [4-chlorophenyl]-1, 1, 1-trichloroethane) on complement system and macrophages. Toxicology. 252(1-3): 78-85.
- Eaton DL, Daroff RB, Daroff HA, Bridges J, Buffler P, Lucio G, Costa JC, Guy MK, Mobley WC, Nadel L, Diether N, Rolf S-H, Spencer PS. 2008. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. Crit Rev Toxicol. 38(2): 1-125.
- El-Sheshtawy SM, El-Gobary GI, Omar NA, Shawky NA. 2019. Ameliorating the toxic effects of cypermethrin by sesame oil in male rabbits. Slovenian Vet Res. 56: 51-59.
- Embert D, Fitzgerald L, Waldez F. 2009. *Tupinambis meriana*. En: IUCN Red List of Threatened Species; Version 2010.4. [Http://www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) Último acceso 26-05-2020.
- Espinoza Machuca S. 2018. Impacto Ambiental de Pesticidas en el Cultivo de la Papa en el Distrito de Chaglla, en la Provincia de Pachitea. Tesina de Grado. Facultad de Ingeniería, Universidad de Huánuco, Perú.
- Ewert M, Nelson C. 2003. Metabolic heating of embryos and sex determination in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). J Therm Biol. 28:159-165.
- Fainboim L, Geffner J. 2011. Introducción a la Inmunología Humana. p 584. Ed. (6ª) Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- Fast MD, Hosoya S, Johnson SC, Afonso LO. 2008. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar Linnaeus*) subjected to short-and long-term stress. Fish shellfish immunol. 24(2): 194-204.
- Finger JW. 2014. Stressor Induced Immunomodulation in Crocodylians. Tesis Doctoral. North Carolina State University, Athens, Georgia, Estados Unidos.

Flores F. 2011. Hacia dónde vamos con el manejo de plagas. Suelos y producción Vegetal. Estación Experimental Agropecuaria (EEA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Marcos Juárez. 8.

Forson DD, Storfer A. 2006. Atrazine increases ranavirus susceptibility in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Ecol Appl.* 16(6): 2325-2332.

Freeman JL, Rayburn AL. 2004. *In vivo* genotoxicity of atrazine to anuran larvae. *Mutat Res.* 560: 69-78.

Furness AI, Morrison KR, Orr TJ, Arendt JD, Reznick DN. 2015. Reproductive mode and the shifting arenas of evolutionary conflict. *Annals New York Acad Sci.* 1360(1): 75-100.

Gantress J, Maniero GD, Cohen N, Robert J. 2003. Development and characterization of a model system to study amphibian immune responses to iridoviruses. *Virology*, 311(2): 254-262.

García B, Rubio F, Carrasco M. 1997. Hematología. Citología, fisiología y Patología de hematíes y leucocitos. Paraninfo, Madrid, España.

García C, Heredia C, Flores P, Parra C. 2016. El uso de los productos agrícolas y su afectación al sistema inmune: un tema de interés actual. *Rev CON-CIENCIA.* 4: 61.

García KY, Salazar M, García JE. 2018. Efecto del neonicotinoide-tiametoxam en el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio Rerio*). *Rev Toxicol.* 35: 22-27.

Gardner D, Zelikoff JT. 1996. An introduction to immunomodulation by metals. En: Chang LW. p 783-796. Ed. *Toxicol Metals*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Gilbertson M, Haffner G, Drouillard G, Albert A, Dixon B. 2003. Immunosuppression in the Northern Leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure. *Environ Toxicol Chem.* 22: 101-110.

Glassy EF. 2018. *Color Atlas of Hematology: An Illustrated Field Guide Based on Proficiency Testing*. Ed (2ª) College of American Pathologists, Northfield, Illinois.

Good Z, Glanville J, Gee MH, Davis MM, Khatri P. 2019. Computational and Systems Immunology: A Student's Perspective. *Trends immunol.* 40(8): 665-668.

Grasman KA. 2002. Assessing immunological function in toxicological studies of avian wildlife. *Integr Comp Biol.* 42(1): 34-42.

Guirlet E, Das K, Thomé JP, Girondot M. 2010. Maternal transfer of chlorinated contaminants in the leatherback turtles, *Dermochelys coriacea*, nesting in French Guiana. *Chemosphere*, 79(7): 720-726.

- Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Scoccianti C, Mattock H, Straif K. 2015. International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, I.L.F. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol.* 16 (5): 490-491.
- Hall B. 1978. Note on the husbandry, behavior, and breeding of captive tegulizards *Tupinambis teguixin*. *Intl Zoo Yearbook.* 91-101.
- Harvey M, Ugueto G, Gutberlet R. 2012. Review of Teiid morphology with a revised taxonomy and phylogeny of the Teiidae (Lepidosauria: Squamata). *Zootaxa.* 34: 1-156.
- Hayes TB, Case P, Chui S, Chung D, Haeffele C, Haston K, Lee M, Mai VP, Marjua Y, Parker J, Tsui M. 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environ Health Perspect.* 114: 40-50.
- He B, Ni Y, Jin Y, Fu Z. 2020. Pesticides-induced energy metabolic disorders. *Sci Total Environ.* 139033.
- Heinemann JA, Agapito-Tenfen SZ, Carman JA. 2013. A comparative evaluation of the regulation of GM crops or products containing dsRNA and suggested improvements to risk assessments. *Environ Int.* 55: 43-55.
- Hernández-Ríos I, Vasco-Leal JF, Mosquera-Artamonov JD, Acosta-Osorio AA, Torres-Aquino M, García-Herrera EJ. 2018. Use of glyphosate and resistant transgenic crops. *Agro productividad.* 11(4): 112-117.
- Hoffmann J, Kafatos F, Janeway C, Ezekowitz R. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 284: 1313-1318.
- Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K, Veldhoen N. 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environ Toxicol Chem.* 23(8): 1928-1938.
- Huber T, Zon L. 1998. Transcriptional regulation of blood formation during *Xenopus* development. *Semin Immunol.* 10: 103-109.
- Han J, Zhang L, Yang S, Wang J, Tan D. 2014. Detrimental effects of metronidazole on selected innate immunological indicators in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *B Environ Contam Toxicol.* 92(2): 196-201.
- Iungman JL, Molinero MN, Simoncini MS, Piña CI. 2019. Embryological development of *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae). *Wiley Genesis.*
- Jahn GA, Moya G, Jammes H, Rosato RR. 1995. Effect of chronic thyroid hormone treatment on cycling, ovulation, serum reproductive hormones and ovarian LH and

prolactin receptors in rats. *Endocrine*. 3: 121-127.

Jergentz S, Mugni H, Bonetto C, Schulz R, 2004a. Runoff-related endosulfan contamination and aquatic macroinvertebrate response in rural basins near Buenos Aires, Argentina. *Arch Environ Contam Toxicol*. 46(3): 345-353.

Jergentz S, Pessacq P, Mugni H, Bonetto C, Schulz R, 2004b. Linking in situ bioassays and dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine Pampa. *Ecotoxicol Environ Saf*. 59: 133-141.

Jergentz S, Mugni H, Bonetto C, Schulz R. 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere*. 61(6): 817-826.

Kanchanapangka S, Youngprapakorn P, Pipatpanukul K, Krobpan S, Kongthaworn N. 1999. Differentiation of crocodilian granulocytes via histochemical techniques. 4th Symposium Diseases in Asian Aquaculture, Cebu City. Philippines. p 43.

Khan MZ, Fatima F. 2002. Comparison of induced effect of pyrethroid (Cypermethrin) with organophosphate (Malathion) on GOT and GPT in liver, kidney and brain of *Calotes versicolor* Daudin (Agamidae: Reptilia). *Online J Biol Sci*. 2(6): 408-410.

Khan NA, Uggini GK, Patel S, Balakrishnan S. 2015. *In-ovo* treatment of chlorpyrifos and cypermethrin in combination altered the haematological parameters in two generations of domestic hen. *Indian J Fundam Appl Life Sci*. 5: 120-126.

Kiesecker JM. 2002. Synergism Between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proc Natl Acad Sci*. 99: 9900-9904.

Kirschfink M, Mollnes TE. 2003. Modern complement analysis. *Clin Diag Lab Immunol*. 10(6): 982-989.

Krieger R. 2010. Handbook of Pesticide Toxicology. Two-Volume Set: Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. Ed (3^a) Academic Press, México. p. 2000.

Kohler H, Bayry J, Nicoletti A, Kaveri SV. 2003. Natural autoantibodies as tools to predict the outcome of immune response? *Scand J Immunol*. 58: 285-289.

Kumar Maurya P, Malik DS, Kumar Yadav K, Gupta N, Kumar S. 2019. Haematological and histological changes in fish *Heteropneustes fossilis* exposed to pesticides from industrial waste water. *Human Ecol Risk Assess: An Int J*. 1-28.

Lafuente Giménez MA, Paternáin JL, Hardisson A. 2001. Riesgos toxicológicos por la exposición a metales. *Rev Asoc Esp Toxicol*. 18(3): 139-141.

- Lajmanovich RC, Peltzer PM, Attademo AM, Colussi CL, Martinuzzi CS. 2018. Blood biomarkers of common toad *Rhinella arenarum* following chlorpyrifos dermal exposure. *Interd toxicol.* 11(2): 148-154.
- Latchman Y, Banerjee P, Poulter LW, Rustin M, Brostoff J. 1996. Association of immunological changes with clinical efficacy in atopic eczema patients treated with traditional Chinese herbal therapy (Zemaphyte®). *Inter archiv allergy immunol.* 109(3): 243-249.
- 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.
- Latorre M, López González E, Siroski P, Poletta G. 2015. Basal frequency of micronuclei and hematological parameters in the side-necked turtle, *Phrynops hilarii*. *Acta Herpetol.* 10: 31-37.
- Latorre MA, Romito ML, Larriera A, Poletta GL, Siroski PA. 2016. Total and differential white blood cell counts in *Caiman latirostris* after *in ovo* and *in vivo* exposure to insecticides. *J Immunotoxicol.* 13(6): 903-908.
- Latorre MA. 2018. Evaluación del efecto de plaguicidas sobre el sistema inmune en *Caiman latirostris* (yacaré overo). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Litoral, Argentina.
- Leiva D. 2013. Para poder usar insecticidas poco tóxicos hay que hacer inteligencia. . Departamento de Documentación e Información Bibliográfica. Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Pergamino, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.
- Leung DY, Bloom JW. 2003. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol.* 111: 3-22.
- Lewis S, Bates I, Bain, B. 2008. *Hematología Práctica*. Ed (10ª). Madrid, Elsevier.
- Li X, Liu L, Zhang Y, Fang Q, Li Y, Li Y. 2013. Toxic effects of chlorpyrifos on lysozyme activities, the contents of complement C3 and IgM, and IgM and complement C3 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Chemosphere.* 93(2): 428-433.
- Liguori B, Alexander A, Wyatt D, Wellehan J, Santoro D. 2020. Orchard grass allergy in an African spur-thighed tortoise (*Centrochelys sulcata*) confirmed via intradermal allergen testing and provocation testing. *Veterinary Dermatol.*

Loaiza AC. 2005. Lineamientos de políticas sobre uso y manejo mesurado de plaguicidas con énfasis en el sector agropecuario y forestal del departamento de Antioquia. Convenio Interinstitucional, 23 de diciembre de 2003 entre Ceiba, Cornare y Dama-Antioquia. Medellín Colombia. p 142.

López González EC, Latorre MA, Larriera A. 2013. Induction of micronuclei in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) hatchlings exposed in vivo to Roundup® (glyphosate) concentrations used in agriculture. Pestic Biochem Physiol. 105: 131-134

López González EC, Larriera A, Siroski PA, Poletta GL. 2017. Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. Ecotoxicol Environ Saf. 136: 84-91.

Love AC, Lovern MB, DuRant SE. 2017. Captivity influences immune responses, stress endocrinology, and organ size in house sparrows (*Passer domesticus*). General Comp Endocrinol. 252: 18-26.

Luaces JP, Rossi LF, Chirino MG, Browne M, Merani MS, Mudry MD. 2017. Genotoxic effects of Roundup Full II® on lymphocytes of *Chaetophractus villosus* (Xenarthra, Mammalia): *in vitro* studies. PloS one. 12(8): e0182911.

Lydy M, Belden J, Wheelock C, Hammock B, Denton D. 2004. Challenges in regulating pesticide mixtures. Ecol Soc. 9: 1-13

Maceda-Veiga A, Figuerola J, Martínez-Silvestre A, Viscor G, Ferrari N, Pacheco M. 2015. Inside the red-box: Applications of hematology in wildlife monitoring and ecosystem health assessment. Sci Total Environ. 514: 322-332.

Magadán-Mompó S, Sánchez-Espinel C, Gambón-Dez, F. 2013. IgH loci of American alligator and saltwater crocodile shed light on IgA evolution. Immunogenetics. 65: 531-541.

Mahananda MR, Mohanty BP. 2012. Toxicity on biochemical and hematological parameters in *Bufo melanostictus* (Schneider) (Common Indian Toad) exposed to malathion. En: Soundarajan PR. p 3-12. Ed. Pesticides-Advances in Chemical and Botanical Pesticides. Intech, Croatia.

Maitra S, Nath S. 2014. Toxic impacts of urea on the hematological parameters of air breathing fish *heteropneustes fossils* (Bloch). Am Eurasian J Agric Environ Sci. 14 (4): 336-342.

- Malik DS, Maurya PK. 2015. Heavy metal concentration in water, sediment, and tissues of fish species (*Heteropneustis fossilis* and *Puntius ticto*) from Kali River. *Toxicol Environ Chem*. 96: 1195-206.
- Marco A, López-Vicente M, Pérez-Mellado V. 2004. Arsenic uptake by reptile flexible-shelled eggs from contaminated nest substrates and toxic effect on embryos. *Bull Environ Contam Toxicol*. 72(5): 983-990.
- Marino D, Ronco A. 2005. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bull Environ Contam Toxicol*. 75(4): 820-826.
- Martin LB, Weil ZM, Nelson RJ. 2008. Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs. *Philos Trans R Soc B*. 363: 321-339.
- Martin LB. 2009. Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything. *Gen Comp Endocrinol*. 163(1-2): 70-76.
- Massaro R, Gonsebatt G, De Altube M, Vicente D, Remorini P. 2005. Efecto de la aplicación temprana del insecticida cipermetrina en el cultivo de soja, sobre la entofauna fitófaga y benéfica. Ciclo 2004/05, para mejorar la producción. Estación Experimental Agropecuaria (EEA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Oliveros, Santa Fe, Argentina. 30: 77-79.
- Matson K, Ricklefs R, Klasing K. 2005. A hemolysis-hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Dev Comp Immunol*. 29: 275-286.
- Mayer J, Knoll J, Innis C, Mitchell MA. 2005. Characterizing the hematological and plasma chemistry profiles of captive Chinese water dragon *Physignathus concincinnus*. *J Herp Med Surg*. 15(3): 193-202
- Mazzotti FJ, McEachern M, Rochford M, Reed RN, Eckles JK, Vinci J, Edwards J, Wasilewski J. 2015. *Tupinambis merianae* as nest predators of crocodylians and turtles in Florida, USA. *Biol Invasions*. 17(1): 47-50.
- McEwen BS, Wingfield JC. 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav*. 43: 2-15.
- McMahon, TA, Boughton, RK, Martin, LB y Rohr, JR. 2017. La exposición al herbicida atrazina afecta de forma no lineal los niveles de corticosterona del renacuajo. *Rev Herpetol*. 51(2): 270-273.

- McCormick GL, Shea K, Langkilde T. 2015. How do duration, frequency, and intensity of exogenous CORT elevation affect immune outcomes of stress?. *Gen Comp Endocrinol.* 222: 81-87.
- Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP. 2012. Disease tolerance as a defense strategy. *Science.* 335: 936-941.
- Mensah PK, Muller WJ, Palmer CG. 2011. Acute toxicity of Roundup® herbicide to three life stages of the freshwater shrimp *Caridinanilotica* (Decapoda: Atyidae). *Phys Chem Earth.* 36(14-15): 905-909.
- Mensah PK, Palmer CG, Odume ON. 2015. Ecotoxicology of glyphosate and glyphosate-based herbicides toxicity to wildlife and humans En: Larramendy ML, Soloneski S. p 281-304. Ed. *Toxicity Hazard Agrochem.* InTech, Rijeka, Croatia.
- Merchant M, Pallansch M, Paulman R, Wells J, Nalca A, Ptak R. 2005. Antiviral activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Antiviral Res.* 66: 35-38.
- Merchant M, Britton A. 2006. Characterization of serum complement activity of saltwater (*Crocodylus porosus*) and freshwater (*Crocodylus johnstoni*) crocodiles. *Comp. Biochem Physiol A MollIntegr Physiol.* 143: 488-493.
- Merrill TW, Schizer DM. 2013. The shale oil and gas revolution, hydraulic fracturing, and water contamination: a regulatory strategy. *Minn L Rev.* 98: 145.
- Mesnage R, Defarge N, De Vendomois JS, Seralini GE. 2015. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem Toxicol.* 133-153.
- Meylan S, Haussy C, Voituron Y. 2010. Physiological actions of corticosterone and its modulation by an immune challenge in reptiles. *Gen Comp Endocrinol.* 169: 158-166.
- Ministerio de Agricultura. 2019. Estimaciones Agrícolas y Estadísticas. <http://www.siiia.gov.ar> Último acceso 28-07-2020.
- Milnes MR, Bryan TA, Medina JG, Gunderson MP, Guillette Jr LJ. 2005. Developmental alterations as a result of in ovo exposure to the pesticide metabolite p, p'-DDE in *Alligator mississippiensis*. *General Comp Endocrinol.* 144(3): 257-263.
- Mitra A, Sarkar M, Chatterjee C. 2019. Modulation of immune response by organophosphate pesticides: mammals as potential model. En: *Proceedings of the Zool Society.* Springer India. 72: 13-24.

- 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. *J Zool.* 304(3): 151-158.
- Moleón MS, Merchant ME, Ortega HH, Siroski PA. 2020. Comparison of complement system activity amongst wild and domestic animals. *Acta Herpetologica*, 15(1): 59-64.
- Montagna DR, Rigo V, Ramayo Lg, goldman LH, Huguet MJ, Maceira N, Jar AM. 2013. Characterization of *Rhea americana* immunoglobulins. *In Vet.* 15: 91-100.
- Montali R. 1988. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *J Comp Pathol.* 99: 1-20.
- Morici LA, Eelsey RM, Lance VA. 1997. Effects of long-term corticosterone implants on growth and immune function in juvenile alligators, *Alligator mississippiensis*. *J Exp Zool.* 279: 156-162.
- Mourthe IMC. 2010. *Tupinambis meriana* (common tegu). Feeding behavior. *Herpetol Rev.* 41: 232-233.
- Mugni H, Demetrio P, Bulus G, Ronco A, Bonetto C. 2011. Effect of aquatic vegetation on the persistence of cypermethrin toxicity in water. *Bull Environ Contam Toxicol.* 86: 23-27.
- Müller HL, Gebhardt U, Teske C, Faldum A, Zwiener I, Warmuth-Metz M, Pietsch T, Pohl F, Sörensen N, Calaminus G. 2011. Post-operative hypothalamic lesions and obesity in childhood craniopharyngioma: results of the multinational prospective trial KRANIOPHARYNGEOM 2000 after 3-year follow-up. *European J Endocrinol.* 165(1): 17-24.
- Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. 2012. *Janeway's Immunobiology*. Ed (8^a). New York: Garland Science.
- Mussart N, Barboza N, Fioranelli S, Koza G, Prado W, Coppo J. 2006. Age, sex, year season, and handling system modify the leukocytal parameters from captive *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae). *Res Vet.* 17: 3-10.
- Nieman DC, Pence BD. 2019. Exercise immunology: Future directions. *J Sport Health Sci.*
- Nissen S, Namuth D, Hernández-Ríos EL. 2004. Introduction to the Aromatic Amino Acid Synthesis Inhibitors. Library of Crop Technology Lessons. University of Nebraska, Lincoln. <http://croptechnology.unl.edu/viewLesson.cgi?Lesson ID= 1008088419>.

- Novoa-Fajardo D, Benítez-Tumay I, Corredor-Matus J, Rodríguez-Pulido J. 2008. Hallazgos hematológicos en iguana verde suramericana (*Iguana iguana*), de ejemplares ubicados en zona urbana y suburbana de Villavicencio (Meta). Orinoquia. 12: 67-79.
- Ochsenbein A, Zinkernagel RM. 2000. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. Immunol Today. 21: 624-30.
- Odetti LM, González EL, 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 Safety. 193: 110-312.
- Oliveira-Junior AA, Tavares-Dias M, Marcon JL. 2009. Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. Res Vet Sci. 86(1): 146-151.
- Olson GA, Hessler JR, Faith RE. 1977. Techniques for the blood collection and intravascular infusion of reptiles. Lab Anim Sci. 25: 783-786.
- OMS. 1982. DDT y sus derivados. Criterio de salud ambiental. Organización Mundial de la Salud, Ginebra. Actualización 2009.
- Ouyang N, Storts R, Tian Y, Wigle W, Villanueva I, Mirhosseini N, (...), Tizard I. 2009. Histopathology and the detection of avian bornavirus in the nervous system of birds diagnosed with proventricular dilatation disease. Avian Pathol. 38(5): 393-401.
- Owen JA, Punt J, Stranford SA. 2013. Kuby Immunol. p 692 Ed. New York: WH Freeman.
- Parachu-Marco MV, Piña CI, Somoza GM, Jahn GA, Pietrobon EO, lungman JL. 2015. Corticosterone Plasma levels of Embryos and Newly Hatched Broad-snouted Caiman (*Caiman latirostris*) Incubated at Different Temperatures. South American J Herpetol. 10(1): 50-57.
- Parmentier H, Lammers A, Hoekman J, de Vries Reilingh G, Zaanen I, Savelkoul H. 2004. Different levels of natural antibodies in chickens divergently selected for specific antibody responses. Dev Compl Immunol. 28: 39-49.
- Peden-Adams MM, Stuckey JE, Gaworecki KM, Berger-Ritchie J, Bryant K, Jodice P G, Scott TR, Ferrario JB, Guan B, Vigo C, Boone JS, McGuinn D, DeWitt JC, Keil DE. 2009. Developmental toxicity in white leghorn chickens following *in ovo* exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS). Reproductive Toxicol. 27(3-4): 307-318.

Peterson DE, Thompson CR, Regehr DL, Al-Khatib K. 2001. Herbicide mode of action. Kansas State University. 715: 24.

Plumb JA, Areechon N, 1990. Effect of malathion on humoral immune response of channel catfish. *Dev Comp Immunol.* 14(3): 355-358.

Poletta GL, Larriera A, Kleinsorge E, Mudry MD. 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mut Res. Gen Toxicol Environ Mutagen.* 672(2): 95-102.

Poletta GL, Kleinsorge E, Paonessa A, Mudry MD, Larriera A, Siroski PA. 2011a. 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 Safety.* 74(4): 852-859.

Poletta GL, Larriera A, Siroski P, Kleinsorge E, Mudry MD. 2011b. Integral approach of Glyphosate-induced alterations in a South American caiman species. En: *Herbicides: Properties, Crop Protection and Environmental Hazards.* Chapter 5. Ed. Nova Science Publishers, Inc. New York, USA.

Poletta GL, Siroski PA, Amavet PS, Ortega HH, Mudry MD. 2013. Reptiles as animal models: examples of their utility in genetics, immunology and toxicology. En: *Reptile across research field.* Chapter 21, p 1-39. Ed. Universidad nacional del Litoral, Argentina.

Poletta GL, López González Evelyn, 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). *Ecotoxicol Genotoxicol.* 467-517.

Porini GM. 2006. Proyecto Tupinambis. Una propuesta para el manejo de *Tupinambis rufescens* y *T. merianae* en la Argentina. En: *Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina.* Programas de Uso Sustentable. p 65-75. Ed. Bolkovic ML, Ramadori D.

Presch W. 1973. A review of the tegus, lizard genus *Tupinambis* (Sauria: Teiidae) from South America. *Copeia.* 740-746.

Racca AL, Eberhardt AT, Moreno PG, Baldi C, Beldoménico PM. 2014. Differences in natural antibody titres comparing free-ranging guanacos (*Lama guanicoe*) and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Vet J.* 199(2): 308-309.

Rauschenberger RH, Wiebe JJ, Buckland JE, Smith JT, Sepulveda MS, Gross TS. 2004. Achieving environmentally relevant organochlorine pesticide concentrations in

eggs through maternal exposure in *Alligator mississippiensis*. *Marine Environ Res.* 58: 851-856.

Reno U, Regalado LM, Gagneten AM. 2016. Efectos subletales de cuatro formulaciones de glifosato sobre *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea, Cladocera). *Natura Neotropicalis.* 1 (47): 7-20.

Rich CN, Talent LG. 2009. Soil ingestion may be an important route for the uptake of contaminants by some reptiles. *Environ Toxicol Chem.* 28(2): 311-315.

Rigoni A, Colombo MP, Pucillo C. 2018. Mast cells, basophils and eosinophils: From allergy to cancer. En: *Seminars in immunology.* Academic Press. Septiembre de 2018.35: 29-34.

Rios C, Zapata B, Marín, MP, Pacheco S, Rivera K, González BA, Bas F. 2003. Cambios hematológicos, bioquímica sanguínea y cortisol sérico en crías de guanaco (*Lama guanicoe*) en cautiverio desde el nacimiento al destete. *Av Cienc Vet.* 18: 1-2.

Roberts ML, Buchanan KL, Hasselquist D, Evans, MR, 2007. Effects of testosterone and corticosterone on immunocompetence in the zebra finch. *Hormones and Behavior.* 51: 126-134.

Rohe F, Antunes AP. 2008. Barred Forest Falcon (*Micras turrucillis*) predation on relatively large prey, Wilson. *J Ornithol.* 120: 228-230.

Rotllant J, Balm PHM, Ruane NM, Pérez-Sánchez J, Wendelaar-Bonga SE, Tort L. 2000. Pituitary proopiomelanocortin-derived peptides and hypothalamus-pituitary-interrenal axis activity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during prolonged crowding stress: differential regulation of adrenocorticotropin hormone and α -melanocyte-stimulating hormone release by corticotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. *General Comp Endocrinol.* 119(2): 152-163.

Ronco A, Carriquiriborde P, Natale GS, Martin ML, Mugni H, Bonetto C. 2008. Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides impact on low order stream ecosystems of the Pampasic Region. En: *Ecosystem Ecology Research Trends.* Ed: Nova Publishers, Inc. New York, USA.

Rossi LF, Luaces JP, Browne M, Chirino MG, Merani MS, Mudry MD. 2016. *Chaetophractus villosus* as a sentinel organism: baseline values of mitotic index, chromosome aberrations and sister chromatid exchanges. *Mutation Res Genetic Toxicol Environ Mutagen.* 796: 40-45.

- Russell RW, Gobas FAP, Haffner D. 1999. Maternal transfer and *in ovo* exposure of organochlorines in oviparous organisms: a model and field verification. *Environ Sci Technol.* 33:416-420.
- Salakij C, Salakij J, Apibal S, Narkkong N, Chanhom L, Rochanapat N. 2002. Hematology, morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells in king cobras (*Ophiophagus hannah*). *Vet Clin Pathol.* 31: 116-126.
- Salbego J, Pretto A, Gioda CR, Cavalheiro de Menezes C, Lazzari R, Radünz Neto J, Baldisserotto B, Loro VL. 2010. Herbicide Formulation with Glyphosate Affects Growth, Acetylcholinesterase Activity, and Metabolic and Hematological Parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch Environ Contam Toxicol.* 58(3): 740-745.
- Salinas Z, Salas N, Baraquet M, Martino A. 2015. Biomarcadores hematológicos del sapo común *Bufo arenarum* en ecosistemas alterados de la provincia de Córdoba. *Acta toxicol Argentina.* 23: 25-35.
- Sanchez ML, Almeida J, Gonzalez D, Gonzalez M, Garcia-Marcos MA, Balanzategui A (...), Orfao A. 2003. Incidence and clinicobiologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood.* 102(8): 2994-3002.
- Sandmeier FC, Tracy CR, Dupré S, Hunter K. 2012. A *trade-off* between natural and acquired antibody production in a reptile: implications for long-term resistance to disease. *Biology Open.* 1(11): 1078-1082.
- Santos X, Llorente G. 2009. Decline of a common reptile: Case study of the viperine snake *Natrix maura* in a Mediterranean wetland. *Acta Herpetol.* 4(2): 161-169.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Rev.* 21: 55-89.
- Schaaf Alejandro Alberto. 2016. Valoración de impacto ambiental por uso de pesticidas en la región agrícola del centro de la provincia de Santa Fe, Argentina. *Rev Mexicana Cs Agrícolas.* 7(6): 1237-1247.
- Schaumburg LG, Poletta GL, Siroski PA, Mudry MD. 2014. Spontaneous genetic damage in the tegu lizard (*Tupinambis merianae*): the effect of age. *Mutat Res.* 766: 5-9.
- Schaumburg L, Siroski P, Poletta G, Mudry M. 2016. Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pesticide Biochem Physiol.* 130: 71-78.

- Schoenle LA, Downs CJ, Martin LB. 2018. An introduction to ecoimmunology. En: Cooper E. (eds) Avances en inmunología comparada. Springer, Cham. p 901-932.
- Sexton OJ, Bramble JE, Heisler IL, Phillips CA, Cox DL. 2005. Eggshell composition of squamate reptiles: relationship between eggshell permeability and amino acid distribution. *J chemical ecol.* 31(10): 2391-2401.
- Silvestre A. 2014. Hematología y bioquímica en reptiles. EN PORTADA. Barcelona–Espanha. p 32-35.
- Siroski P, Merchant M, Parachu Marco V, Piña C, Ortega, H. 2010. Characterization of serum complement activity of broad snouted caiman (*Caiman latirostris*, Crocodylia: Alligatoridae). *Zool Stud.* 49: 64-70.
- Siroski P. 2011. Caracterización del Sistema de Complemento e Identificación de Componentes del Sistema Inmune Innato del Yacaré Overo (*Caiman latirostris*). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Esperanza, Argentina.
- Siroski P, Poletta G, Latorre M, Merchant M, Ortega H, Mudry M. 2016. Immunotoxicity of commercial-mixed glyphosate in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Chem-BiolInteract.* 244: 64-70.
- Siroski PA, Poletta GL, Mudry MD. 2017. The Lizard *Salvator merianae* (Squamata, Teiidae) as a Valid Indicator in Toxicological Studies. *Ecotoxicol Genotoxicol.* 228-251.
- Smith GD, French SS. 2017. Physiological trade-offs in lizards: costs for individuals and populations. *Int Comp Biology.* 57(2): 344-351.
- Souza Casadinho J, Weber JM, Guadarrama Zugasti C, Escamilla Prado E, Beristáin Ruiz B, Acosta M, Cárcamo MI, Ramírez Muñoz F. 2008. El endosulfán y sus alternativas en América Latina. <http://www.rapaluruaguay.org> Último acceso 27-02-2020.
- Souza Casadinho JS. 2019. El proceso de artificialización de la naturaleza y el desarrollo de la agroecología en la Argentina. *J Cult Econ.* 36-96.
- Sparkman A, Palacios M. 2009. A test of life-history theories of immune defense in two ecotypes of the garter snake, *Thamnophis elegans*. *J Anim Ecol.* 78: 1242-1248.
- Spencer SJ, Heida JG, Pittman QJ. 2005. Early life immune challenge effects on behavioural indices of adult rat fear and anxiety. *Behav Brain Res.* 164: 231-238.
- Stacy B, Whitaker N. 2000. Hematology and blood biochemistry of captive mugger crocodiles (*Crocodylus palustris*). *J Zoo Wild Med.* 31: 339- 347.

Stacy NI, Alleman AR, Sayler KA. 2011. Diagnostic hematology of reptiles. Clin Lab Med. 31(1): 87-108.

Strasser A, Teltscher A, May B, Sanders C, Nieder Müller H. 2000. Age-associated changes in the immune system of German shepherd dogs. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 47(3): 181-192.

Strik NI, Alleman AR, Harr KE. 2007. Circulating inflammatory cells. Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text. 167-218.

Téllez-Bañuelos MC, Santerre-Lucas A, Zaitseva GP. 2016. El sistema inmune como biomarcador de toxicidad por endosulfán en peces teleósteos y otros modelos de laboratorio. Rev AquaTIC. 33.

Toledo LF, Prado CPA, Andrade DV. 2004. *Tupinambis merianae* (tegu lizard). Frugivory Herpetol Rev. 35(2): 173-174.

Tomasoni M. 2013. No hay fumigación controlable generación de derivas de plaguicidas. Red Universitaria de Ambiente y Salud /Red de Médicos de pueblos Fumigados. Disponible en: <http://www.reduas.com.ar/wpcontent/uploads/downloads/2013/11/DERIVA-practica-incontrolable-2013.pdf>

Tort L, Balasch JC, MacKenzie S. 2004. Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence. Contributions Sci. 2(4): 443-454.

Troiano J, Silva M, Esarte M, Márquez A, Mira G. 1996. Valores hematológicos de las especies argentinas del género Caiman (Crocodylia-Alligatoridae). Rev Facena. 12: 111-117.

Troiano J, Silva M. 1998. Valores hematológicos de referencia en tortuga terrestre argentina (*Chelonoidis chilensis chilensis*). Anal Vet. 18: 47- 51.

Troiano JC, Gould EG, Gould I. 2008. Intervalos de referencia hematológicos en lagarto argentino *Tupinambis merianae* (Sauria-Teiidae). Comp Clin Pathol. 17- 93.

Troiano JC, Gould EG. 2011. Interspecific differences in the haematological reference intervals in *Tupinambis* genus from Argentina (Sauria-Teiidae). Comp Clin Pathology. 20(4): 309-312.

UICN. 1991. The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2020-1. <http://www.iucnredlist.org> Último acceso 29-04-2020.

Ujvari B, Madsen T. 2011. Do natural antibodies compensate for humoral immunosenescence in tropical pythons? Func Ecol. 25: 813-817.

- Van Meter RJ, Adelizzi R, Glinski DA, Henderson WM. 2019. Agrochemical Mixtures and Amphibians: The Combined Effects of Pesticides and Fertilizer on Stress, Acetylcholinesterase Activity, and Bioaccumulation in a Terrestrial Environment. *Environ toxicol chem*. 38(5): 1052-1061.
- Val J, Gronwall C, Silverman GJ. 2013. Fundamental roles of the innate-like repertoire of natural antibodies in immune homeostasis. *Front Immunol*. 4: 1-8.
- Velásquez JC, Cartagena HN, Bolaño CR, Otero GÁ, Pacheco JC, Arias JL. 2014. Caracterización hematológica de hicoetas (*Trachemys callirostris* Gray, 1856) en Córdoba, Colombia. *Rev Med Vet*. 28: 43-55.
- Vermeulen A, Müller W, Matson KD, Tieleman BI, Bervoets L, Eens M. 2015. Sources of variation in innate immunity in great tit nestlings living along a metal pollution gradient: an individual-based approach. *Sci Total Environ*. 508: 297-306.
- Vila-Aiub MM, Vidal RA, Balbi MC, Gundel PE, Trucco F, Ghersa CM. 2008. Glyphosate-resistant weeds of South American cropping systems: an overview. *Pest Manag Sci*. 64: 366-371.
- Villaamil Lepori, EC, Bovi Mitre G, Nassetta M. 2013. Situación actual de la contaminación por plaguicidas en Argentina. *Rev Intern Contamin Amb*. 29:25-43.
- Wagner N, Mingo V, Schulte U, Lötters S. 2015. Risk evaluation of pesticide use to protected European reptile species. *Biol Conservation*. 191: 667–673.
- Walsh CJ, Cocilova C, Restivo J, Flewelling L, Milton S. 2019. Immune function in *Trachemys scripta* following exposure to a predominant brevetoxin congener, PbTx-3, as a model for potential health impacts for sea turtles naturally exposed to brevetoxins. *Ecotoxicology*. 28(9): 1085-1104.
- Ware GW. 2000. *The pesticide book*. Ed (5^a). Thomson Publications. p 1-415.
- Ware AD. 2020. The complete blood count and white blood cell differential. *Contempt Pract Clin Chemistry*. p 429-444.
- Weir S, Yu S, Talent L, Maul J, Anderson T, Salice C. 2015. Improving reptile ecological risk assessment: oral and dermal toxicity of pesticides to a common lizard species (*Sceloporus occidentalis*). *Environ Toxicol Chem*. 34: 1778-1786.
- Weis GCC, Assmann CE, Cadoná FC, Bonadiman BDS, de Oliveira Alves R, Machado A, Medeiros Frescura Duarte MM, Mânica da Cruz IB, Costabeber AKI. 2019. Immunomodulatory effect of mancozeb, chlorothalonil, and thiophanate methyl pesticides on macrophage cells. *Ecotoxicol Environ Safety*. 182: 109-420.

- Weston DP, Poynton HC, Wellborn GA, Lydy MJ, Blalock BJ, Sepulveda MS, Colbourne JK. 2013. Multiple origins of pyrethroid insecticide resistance across the species complex of a non target aquatic crustacean, *Hyalella azteca*. *Proc Natl Acad Sci*. 110(41): 16532-16537.
- White KL, Anderson AC. 1985. Suppression of mouse complement activity by contaminants of technical grade pentachlorophenol. *Inflamm Res*. 16(5): 385-392.
- Whiteman NK, Matson KD, Bollmer JL, Parker PG. 2006. Disease ecology in the Galapagos Hawk (*Buteo galapagoensis*): host genetic diversity, parasite load and natural antibodies. *Proc Roy Soc B: Biol Sci*. 273(1588): 797-804.
- Willingham EJ. 2005. The effects of atrazine and temperature on turtle hatchling size and sex ratios. *Frontiers Ecol Environ*. 3(6): 309-313.
- Winck G, Blanco C, Cechin S. 2011. Population ecology of *Tupinambis meriana* (Squamata, Teiidae): Home-range, activity and space use. *Anim Biol*. 61: 493-510.
- Wolmarans NJ, Du Preez LH, Yohannes YB, Ikenaka Y, Ishizuka M, Smit NJ, Wepener V. 2018. Linking organochlorine exposure to biomarker response patterns in Anurans: a case study of Müller's clawed frog (*Xenopus muelleri*) from a tropical malaria vector control region. *Ecotoxicology*. 27(9): 1203-1216.
- Woodcock BA, Bullock JM, Shore RF, Heard MS, Pereira MG, Redhead J (...) Peyton J. 2017. Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. *Science*. 356(6345): 1393-1395.
- Woods HA, Wilson JK. 2014. An elephant in the fog: unifying concepts of physiological stasis and change. En: *Integrative Organismal Biology*. Martin LB, Ghalambor CK, Woods HA. Ed. Wiley and Sons, Inc, Hoboken, New Jersey.
- Wrubleswski J, Reichert FW, Galon L, Hartmann PA, Hartmann MT. 2018. Acute and chronic toxicity of pesticides on tadpoles of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae). *Ecotoxicology*. 27(3): 360-368.
- Wu B, Liang L, Liang MA, Weiguo DU. 2016. Effects of Pesticide Exposure on Embryonic Development and Hatchling Traits of Turtles. *Asian Herpetol Res*. 7(1): 28-33.
- Yang X, Song Y, Zhang C, Pang Y, Song X, Wu M, Cheng Y. 2019. Effects of the glyphosate-based herbicide roundup on the survival, immune response, digestive activities and gut microbiota of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Aquatic Toxicol*. 214: 105-243.

- Yanosky A, Mercolli C. 1992. Tegu lizard (*Tupinambis teguixin*) management in captivity at El Bagual Ecological Reserve. Argentina Arch Zootec. 41: 41-51.
- Zamora-Camacho FJ. 2019. Integrating time progression in ecoimmunology studies: beyond immune response intensity. Current Zool. 2: 205-212.
- Zayas MA, Rodriguez HA, Galoppo GH, Stoker C, Durando M, Luque EH, Munoz-de-Toro M. 2011. Hematology and blood biochemistry of young healthy broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*). J Herpetol. 45: 516-524.
- Zimmerman L, Vogel L, Bowden R. 2010. Understanding the vertebrate immune system: Insights from the reptilian perspective. J Exp Biol. 213: 661-671.
- Zimmerman L, Clairardin S, Paitz R, Hicke J, La Magdeleine K, Vogel L, Bowden R. 2013. Humoral immune responses are maintained with age in a long-lived ectotherm, the red-eared slider turtle. J Exp Biol. 216: 633-640.
- Zimmerman LM. 2018. Reptilia: inmunidad humoral en reptiles. En: Cooper E. (eds) Avances en inmunología comparada. Springer, Cham.

ANEXO I:

PUBLICACIONES VINCULADAS A LA TESIS DOCTORAL

-Mestre Ana Paula, Amavet Patricia Susana Siroski Pablo Ariel. 2017. Baseline Values of Immunologic Parameters in the Lizard *Salvator merianae* (Teiidae, Squamata). Open Vet J. 7(2): 143-149.

-Mestre Ana Paula, Amavet Patricia Susana, Vanzetti Agustín Iván, Moleón María Soledad, Parachú Marcó María Virginia, Poletta Gisela Laura, Siroski Pablo Ariel. 2019. Effects of cypermethrin (pyrethroid), glyphosate and chlorpyrifos (organophosphorus) on the endocrine and immune system of *Salvator merianae* (Argentine tegu). Ecotoxicol Environ Safety. 169: 61–67.

-Mestre AP, Amavet PS, van der Sloot IS, Carletti JV, Poletta GL, Siroski PA. 2020. Effects of glyphosate, cypermethrin, and chlorpyrifos on hematological parameters of the tegu lizard (*Salvator merianae*) in different embryo stages. Chemosphere. 126433.