



Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Ciencias Veterinarias

*Laboratorio de Genética, Ambiente y Reproducción (GenAR),
Universidad Juan Agustín Maza*

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

**Evaluación de las aves silvestres como posibles
centinelas de salud ambiental a través de la exposición
a plaguicidas anticolinesterásicos**

Autor: Vet. Arnoldo Ángel Martín Quero

**Director/a: Dra. Nora Bibiana María Gorla
Codirector/a: Dra. Gisela Laura Poletta**

*A mis padres, Sandra y Tito,
Por enseñarme a volar*

*A Lela,
Por fortalecer mis alas con amor*

AGRADECIMIENTOS

Agradecer es reconocer que este camino ha sido posible transitarlo gracias al apoyo, la sabiduría y el cariño de personas que estuvieron a la par durante años. Es reconocer que este vuelo no se emprende sólo, sino que es necesario el equipo personal que cada uno reúne para que te enseñen a volar. También es dar espacio a esas instituciones, que no son más que equipos de personas que confían en un proyecto propuesto y en quienes pueden desarrollarlo para ofrecerles solvencia y tranquilidad en la labor diaria.

Reconozco y agradezco a mi directora, la Dra. Nora Gorla, quien desde mi carrera de grado me brindó un espacio y apostó por mi formación. Quién me adoptó como un “hijo académico”, confiando en mis habilidades para dar forma a un futuro profesional. Agradezco sus palabras, su confianza, sus incontables horas de debate, correcciones, explicaciones y momentos de alegría en un laboratorio que pasó a ser mi segundo hogar. Agradezco siempre su apoyo en mi camino de libertad. Mi admiración por su entrega diaria.

Reconozco y agradezco a mi co-directora, La Dra. Gisela Poletta, quien desde la distancia y sin conocerme tuvo su disposición absoluta para ayudarme en cada pedido, apoyo, explicación y mirada crítica. Mi admiración por su excelencia.

Reconozco y agradezco al Dr. Agustín Zarco, quien de a poco y naturalmente se convirtió para mí en un referente y mentor. Agradezco *yanosécuenatas* cosas me enseñó y su trabajo en las memorables campañas de campo. Mi admiración a su pensamiento crítico y adaptabilidad.

Reconozco y agradezco a mis compañeros de laboratorio: Daniela Ferré, Martina Caliri, Valentina Hynes, Pablo Cuervo por hacer que un lugar de “trabajo” se convierta en hogar. Por hacer mucho más fácil enfrentar cualquier desafío. Mi admiración por su crecimiento.

Reconozco y agradezco a Yanina Olivi, Daniel Ordovini, Sofía Méndez y Renzo Robbio, quienes parecieron atravesar este vuelo de forma fugaz y en su propio rumbo, pero con quienes unimos fuerza para llegar a nuestras propias metas. Agradezco su confianza por permitir dar mis primeros pasos en dirigir sus propias tesis de grado y por todo el trabajo realizado. Mi admiración por su esfuerzo.

Reconozco y agradezco a la Dra. Analía Pedroza por sus horas dedicadas y por todo el conocimiento volcado para procesar información valiosa, que hoy da forma a esta tesis doctoral.

Reconozco y agradezco a Paula Gerlo, Mariana González, Fátima Silva, Guillermo Giambastiani, Lizzet Vejling, quienes forman parte del equipo de la UMaza, pero que hoy son amigos de largas charlas. Agradezco cada posibilidad que pusieron a mi disposición. Agradezco a Damián Murcia, por abrirme las puertas de su hogar donde fue posible realizar parte los muestreos de esta tesis doctoral.

Reconozco y agradezco a mis padres, Sandra y Tito, por el apoyo incondicional, incluso sumándose en este vuelo, desde lo simple y artesanal como fabricar los soportes de mis redes, o desde lo técnico y complejo como incluir biopsias en parafina.

Reconozco y agradezco a Germán, por compartir un mismo rumbo y por ser quien muchas veces es mi soporte desde un lugar invisible. Agradezco a Cecilia Muzzio, Rubén Grosso, Santiago Yapura, Rubén y Brenda Quero, y todo el equipo de LAT por ser mi familia elegida, por su apoyo y amistad.

Agradezco a CONICET por otorgarme la beca doctoral gracias a la cual pudo ser financiada mi dedicación para realizar esta tesis (2015- 2020). Agradezco a la Universidad Juan Agustín Maza por los subsidios otorgados, por el espacio de trabajo y su constante apoyo y motivación.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	V
SIGLAS Y SÍMBOLOS.....	IX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	4
Ecotoxicología aviar.....	4
Las aves como bioindicadores ambientales.....	5
Contaminantes agrícolas: los plaguicidas anticolinesterásicos.....	8
Características ecotoxicológicas de los insecticidas organofosforados y carbamatos.....	12
Consideraciones toxicológicas del clorpirifos.....	16
Consideraciones toxicológicas del carbosulfán.....	17
Biomarcadores y herramientas para la valoración de la exposición a plaguicidas en aves silvestres.....	21
Biomarcadores de genotoxicidad.....	23
Biomarcadores hematológicos.....	29
Colinesterasas plasmáticas como marcadores de exposición a OPs y CBs.....	35
Efectos de embriotoxicidad y biomarcadores histopatológicos en pichones de aves.....	38
OBJETIVOS.....	43
OBJETIVO GENERAL.....	43
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
HIPOTESIS.....	44
VALORACIÓN DE BIOMARCADORES EN AVES SILVESTRES DE ÁREAS NATURALES Y AGRÍCOLAS.....	46
INTRODUCCIÓN.....	46
La interacción de los insecticidas clorpirifos y el carbosulfán con aves silvestres.....	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
Descripción de los sitios de estudio.....	51
Captura, identificación y muestreo de aves silvestres.....	54
Análisis hematológico.....	57

Análisis de genotoxicidad: Ensayo de Micronúcleos - Citoma en eritrocitos	61
Análisis de la actividad de colinesterasas plasmáticas	63
Análisis estadístico	65
Consideraciones éticas.....	66
RESULTADOS	67
DISCUSIÓN.....	100
VALORACIÓN DE BIOMARCADORES EN CODORNIZ COMÚN (<i>Coturnix coturnix</i>) ANTE LA EXPOSICION A CLORPIRIFOS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN INCUBACIÓN ARTIFICIAL	120
INTRODUCCIÓN.....	120
MATERIALES Y MÉTODOS	124
Modelo y condiciones experimentales	124
Estudios Histopatológicos	131
Análisis de genotoxicidad: Ensayo de Micronúcleos- Citoma en eritrocitos	134
Análisis de actividad de colinesterasas plasmáticas	135
Análisis estadístico	135
Consideraciones éticas.....	136
RESULTADOS	137
DISCUSIÓN.....	157
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	176
BIBLIOGRAFÍA	181

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Adaptación de esquema representativo de la función normal en una sinapsis nerviosa.....	13
Figura 2. Estructura química de la molécula de clorpirifos.....	16
Figura 3. Rutas metabólicas y de transformación del clorpirifos en organismos vertebrados.....	17
Figura 4. Estructura química de la molécula de carbosulfan.....	18
Figura 5. Rutas metabólicas y de transformación del carbosulfan en organismos vertebrados.....	19
Figura 6. Degradación de carbosulfan a carbofurano, vía oxidativa, y su hidrólisis a hidroxibenzofuran.....	20
Figura 7. Formación de micronúcleos por evento clastogénico o aneugénico.....	26
Figura 8. Componentes de la sangre en aves.....	30
Figura 9. Células sanguíneas identificadas en aves silvestres.....	34
Figura 10. Extensión de la región biogeográfica del Desierto del Monte Central Argentino.....	53
Figura 11. Imágenes que refieren al ambiente típico o predominante de cada sitio de muestreo.....	55
Figura 12. Técnica de recolección de sangre por punción de vena braquial en ejemplar de gorrión común (<i>Passer domesticus</i>).....	57
Figura 13. Análisis hematológico.....	60
Figura 14. Representación esquemática de eritrocitos normales y con potenciales alteraciones nucleares reconocidas en el ensayo Micronucleos- Citoma.....	63
Figura 15. Cubeta de espectrofotómetro.....	65
Figura 16. Caracterización sobre superficie de 5 km de diámetro mediante mapa de polígonos y proporción de la cobertura terrestre en áreas naturales y agrícolas del desierto del Monte, Argentina.....	68
Figura 17. Ejemplar de gorrión doméstico macho y torcacita común muestreados en sitios agrícolas de la Provincia de Mendoza.	69
Figura 18. Valores de recuentos celulares en las poblaciones de <i>Passer domesticus</i> de las áreas naturales protegidas y agrícolas del desierto del Monte, Argentina.....	81
Figura 19. Valores de recuentos celulares en las poblaciones de <i>Columbina picui</i> de las áreas naturales protegidas y agrícolas del desierto del Monte,	

Argentina.....	82
Figura 20. Alteraciones nucleares en eritrocitos maduros de sangre periférica de aves silvestres.....	84
Figura 21. Frecuencias de diversas alteraciones nucleares en las poblaciones de <i>Passer domesticus</i> de las áreas naturales protegidas y agrícolas del desierto del Monte, Argentina.....	90
Figura 22. Frecuencias de diversas alteraciones nucleares en las poblaciones de <i>Columbina picui</i> de las áreas naturales protegidas y agrícolas del desierto del Monte, Argentina.....	91
Figura 23. Análisis de Componentes Principales entre las frecuencias de distintas alteraciones nucleares y los sitios de muestreos.....	92
Figura 24. Linealidad en la actividad de la enzima ChE: acetilcolinesterasa en plasma de <i>M. bonariensis</i>	97
Figura 25. Valores de actividad colinesterasa (ChE) plasmática para la especie <i>Passer domesticus</i> y <i>Columbina picui</i> en áreas naturales y agrícolas del desierto del Monte, Argentina.....	98
Figura 26. Ejemplares de codorniz común (<i>Coturnix coturnix</i>).....	122
Figura 27: Toma de variables en huevos de codorniz común previo a la incubación	125
Figura 28. Procedimiento de la aplicación de plaguicidas sobre la superficie de huevos de codorniz común.....	128
Figura 29. Disección de pichones de codorniz común recién nacidos para realizar estudios histopatológicos de órganos.	131
Figura 30. Método de medición del grosor de la cáscara de huevo de codorniz con calibre micrométrico.....	131
Figura 31. Registro fotográfico de embriones y pichón de <i>Coturnix coturnix</i> con eclosión fallida luego de una exposición por topicación con clorpirifos durante la incubación artificial.....	138
Figura 32. Registro fotográfico de anomalías morfológicas en pichones de <i>Coturnix coturnix</i> con eclosión efectiva luego de una exposición por topicación con clorpirifos e incubación artificial.....	141
Figura 33. Registro fotográfico de lesiones histopatológicas observadas en tejido hepático en pichones de <i>Coturnix coturnix</i> expuestas a clorpirifos en concentración de 38,4, 192 y 384 µg/huevo.....	143
Figura 34. Análisis de correspondencia entre concentraciones de aplicación y categorías de severidad según tipo de lesión para la valoración del daño histopatológico en hígado de pichones de <i>Coturnix coturnix</i> expuestos a clorpirifos	145

durante la incubación artificial.....	
Figura 35. Registro fotográfico de estructuras normales y diversas lesiones histopatológicas observadas en tejido renal de pichones de <i>Coturnix coturnix</i> expuestos a clorpirifos en concentración de 38,4, 192 y 384 µg/huevo.....	146
Figura 36. Análisis de correspondencia entre concentración de aplicación y categorías de severidad según tipo de lesión para la valoración del daño histopatológico en riñón de pichones de <i>Coturnix coturnix</i> expuestos a clorpirifos durante la incubación artificial.....	148
Figura 37. Frecuencia de biomarcadores citogenéticos en eritrocitos de pichones de codorniz expuestos a distintas concentraciones de clorpirifos durante días claves de la incubación artificial.....	154
Figura 38. Actividad ChE plasmática y porcentaje de inhibición de actividad enzimática en pichones de <i>Coturnix coturnix</i> expuestos a distintas concentraciones dosis de clorpirifostopificado durante días claves de la incubación artificial.....	156
Tabla 1. Especies de aves silvestres muestreadas en áreas naturales y agrícolas que habitan el desierto del Monte, Argentina.....	71
Tabla 2. Parámetros hematológicos de especies de aves silvestres que habitan áreas naturales y agrícolas del desierto del Monte, Argentina.....	75
Tabla 3. Frecuencia de alteraciones nucleares en eritrocitos maduros de aves silvestres que habitan en áreas naturales y agrícolas del desierto del Monte, Argentina.	85
Tabla 4. Actividad de colinesterasa plasmática en aves silvestres de áreas naturales y agrícolas del desierto del Monte, Argentina.....	93
Tabla 5. Características en huevos, embriones y pichones de <i>Coturnix coturnix</i> topicados experimentales con clorpirifos en tres momentos claves del desarrollo embrionario durante la incubación artificial.....	139
Tabla 6. Tipos y severidad de lesiones tisulares hepáticas observadas a nivel histopatológico en pichones de <i>Coturnix coturnix</i> recién nacidos expuestos a clorpirifos durante su desarrollo embrionario en incubación artificial.....	144
Tabla 7. Estructuras renales afectadas y tipos de lesiones observadas a nivel histopatológico en pichones de <i>Coturnix coturnix</i> recién nacidos expuestos a clorpirifos durante su desarrollo embrionario en incubación artificial.....	147

Tabla 8. Biomarcadores de genotoxicidad observados en pichones de <i>Coturnix coturnix</i> recién nacidos en el ensayo experimental durante el desarrollo embrionario en incubación artificial.....	150
Tabla 9. Resultados de los Modelos Lineales independientes aplicados a los datos obtenidos de Biomarcadores de genotoxicidad observados en pichones de <i>Coturnix coturnix</i> recién nacidos en el ensayo experimental durante el desarrollo embrionario en incubación artificial.....	152
Tabla 10. Actividad de colinesterasa plasmática en pichones de <i>Coturnix coturnix</i> recién nacidos expuestos en el ensayo experimental durante su desarrollo embrionario en incubación artificial.....	155
Tabla 11. Resultados de los Modelos Lineales independientes aplicados a la actividad ChE en pichones de <i>Coturnix coturnix</i> durante el desarrollo embrionario en incubación artificial concentraciones y días variables.....	155

SIGLAS Y SÍMBOLOS

AChE: Acetilcolinesterasa
AN: Alteraciones nucleares
ANT: Alteraciones Nucleares Totales
BChE: Butirilcolinesterasa
Bin: Células binucleadas
C: Colas nucleares
CB/ CBs: Carbamatos
CBF: Carbofurán
ChE: Colinesterasas
CPF: Clorpirifos
CSF: Carbosulfán
E: Eritroplástidos
FM-Post: Finca Maipú post aplicación de plaguicidas
FM-Pre: Finca Maipú pre aplicación de plaguicidas
FSR: Finca Santa Rosa
Hto: Hematocrito
MitC: Mitomicina C
MN: Micronucleos
Np: Núcleos periféricos
Hn: Hendiduras nucleares (notched)
OF/OFs: Organofosforados
Pn: Puentes nucleoplásmicos
RBÑ: Reserva de Biosfera de Ñacuñán
RNT: Reserva Natural Bósques Telteca
RTE: Recuento Total Eritrocitario
RTL: Recuento Total Leucocitario
UI/L: Unidades Internacionales/ Litro
Y: Brotes nucleares (yemas)

RESUMEN

Las aves reúnen condiciones suficientes para poder ser consideradas como bioindicadores frente a la presencia de contaminantes ambientales. Los carbamatos y organofosforados (OF) son insecticidas anticolinesterásicos ampliamente utilizados en nuestra región para el control de plagas agrícolas y pecuarias, lo que implica un riesgo de exposición para los seres vivos, incluido el ser humano. Con el fin de detectar los efectos provocados por la exposición a insecticidas anticolinesterásicos, se analizaron biomarcadores hematológicos, de genotoxicidad y enzimáticos en comunidades aviares de la región del Monte central, Mendoza, Argentina. Las aves fueron muestreadas en dos reservas naturales sin aplicación de plaguicidas y en fincas frutícolas luego de su fumigación con carbosulfán 25% (Posse 25®) o clorpirifos (CPF) 48% (Lorsban 48®). Se analizó un total de 297 aves silvestres de 37 especies diferentes, principalmente paseriformes. Además, se realizó la exposición de huevos de *Coturnix coturnix* (codorniz) a una única concentración de CPF 48% (Pirfos -Icona®) aplicados en tres momentos críticos de la incubación y con tres concentraciones diferentes, incluyendo la concentración sugerida de aplicación a campo (38,4; 192 y 384 µg/huevo), como modelo de laboratorio para detectar los efectos embriotóxicos. Solo *Passer domesticus* y *Columbina picui* estuvieron en todos los sitios de muestreo, y admitieron comparaciones específicas. Las *C. picui* de las zonas agrícolas presentaron índices Heterófilos/ Linfocitos (H/L) con el doble de valor que las de las reservas, lo que puede ser interpretado como un indicador de estrés. Los parámetros hematológicos parecieron menos sensibles a cambios del ambiente que los enzimáticos, en los que se observó una menor actividad de colinesterasa plasmática en aves de sitios agrícolas, alcanzando diferencias de hasta un 34% respecto a las aves de áreas naturales. Para los embriones de codorniz expuestos en condiciones controladas, se detectó un aumento de muertes embrionarias y efectos teratogénicos en patas, así como una asociación entre el daño hepático y renal, hasta un 38% de depresión de actividad colinesterasa plasmática y, un aumento en las frecuencias de biomarcadores de genotoxicidad como micronúcleos y hendiduras nucleares para todas las concentraciones de CPF utilizadas. Entre los biomarcadores de genotoxicidad se propone a la frecuencia de hendiduras nucleares para ser utilizadas en programas de biomonitoreos o en evaluaciones de emergencia ambiental. Las evidencias sugieren que los insecticidas anticolinesterásicos podrían provocar efectos con tan solo un único momento de exposición en embriones de aves y adultos, con potencialidad de poner en riesgo mecanismos fisiológicos que comprometan la viabilidad de los organismos. Las aves resultan un modelo interesante para alertar sobre los efectos que provocan los plaguicidas en la biota terrestre, incluyendo los humanos que desarrollan su vida en entornos agrícolas.

ABSTRACT

Birds meet sufficient conditions to be considered as bioindicators for the presence of environmental contaminants. Carbamates and organophosphates (OP) are anticholinesterasic insecticides widely used in our region for the control of agricultural and livestock pests, which implies a risk of exposure for living beings, including humans. In order to detect the effects caused by exposure to anticholinesterase insecticides, we analyzed hematological, genotoxicity and enzymatic biomarkers in avian communities in two natural reserves without pesticide application and in fruit farms after spraying with carbosulfán 25% (Posse 25®) or chlorpyrifos (CPF) 48% (Lorsban 48®), in the region *Monte central*, Mendoza, Argentina. In this study, a total of 297 wild birds belonging to 37 species, mainly passerines, were captured and sampled. In addition, *Coturnix coturnix* eggs were exposed under controlled conditions, to a single dose of CPF 48% (Pirfos -Icona®) applied on three critical moments of incubation and with three different concentrations, including that suggested for field application (38.4, 192 and 384 µg/egg), as a laboratory model to detect embryotoxic effects. Only *Passer domesticus* and *Columbina picui* were present at all sampling sites and allowed specific comparisons. *Columbina picui* from agricultural areas have twice the value of the H/L index than those from reserves, which can be interpreted as an indicator of stress. Hematological parameters seemed less sensitive to changes in the environment than enzymatic ones, in which lower plasma cholinesterase activity was observed in birds from agricultural sites, reaching differences of up to 34% compared to birds from natural areas. For laboratory-exposed quail chicks, an increase in embryonic deaths and teratogenic effects in legs was detected, as well as an association between liver and kidney damage, up to 38% depression of plasma cholinesterase activity and an increase in frequencies of genotoxicity biomarkers such as micronuclei and nuclear cleavages for all concentrations of CPF used. Among the biomarkers of genotoxicity, the frequency of nuclear notches is proposed with the possibility of being used in biomonitoring programs or in environmental emergency evaluations. The evidence suggests that anticholinesterase insecticides could cause effect with only one single moment of exposure in embryonic and adult birds, having the potential to compromise the survival of birds with effects that can trigger health effects from chronic exposures. Birds are an interesting model to warn about the effects of pesticides on terrestrial biota including humans living in agricultural environments.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Ecotoxicología aviar

La ecotoxicología es una ciencia aplicada y multidisciplinaria que estudia la dinámica de los contaminantes en los ambientes, su vinculación con los ecosistemas y los potenciales efectos producidos sobre la biota (Walker *et al.*, 2005). El concepto de ecotoxicología fue utilizado por primera vez por el toxicólogo francés René Truhaut durante el encuentro de la *International Council of Scientific Unions* en el año 1969. La propagación de los fines de esta área interdisciplinaria comenzó a naturalizarse cuando la comunidad científica reconoció la importancia de los efectos producidos por los contaminantes sobre los ambientes naturales. Fue de gran relevancia comprender que la calidad de los componentes abióticos y la salud de las poblaciones animales, vegetales y humana se encontraban íntimamente vinculadas. La ecotoxicología, en consecuencia, se sustenta en conocimientos obtenidos a partir de múltiples ciencias, como la biología, química, toxicología, ecología, patología, estadística, entre otras de interés.

Los fines de la ecotoxicología aviar se sustentan en la generación de conocimientos referidos a los efectos de los contaminantes sobre las aves como individuos protagónicos, y en caso de ser posible, sobre sus poblaciones y comunidades (García- Fernández, 2014). Probablemente, los estudios vinculantes entre aves y tóxicos tuvieron sus inicios a fines del siglo XIX, época en la que se registraron los primeros reportes de mortandad a consecuencia de la ingestión de residuos de plomo. En la década de los 30' fueron publicados los primeros estudios que hallaron evidencias de tóxicos, tales como plomo, arsénico, fósforo blanco y estricnina en el análisis de tejidos de aves silvestres. Al mismo tiempo, durante la *Third North America Wildlife Conference* (1983) se plantea la potencial relevancia de los plaguicidas como posibles promotores de efectos adversos en la fauna silvestre, y las aves son tomadas como eje central de la problemática. Así, y en continuidad con las investigaciones generadas, durante fines de la década de los '40 y principios de los '50 aumentan los reportes que relacionan el intenso uso de dicloro difenil tricloroetano (DDT) en la actividad agrícola, con un notorio incremento en la mortalidad de especies aviares, principalmente rapaces. Luego de la Segunda Guerra Mundial, evento que implicó la innovación y desarrollo de

compuestos químicos como potenciales armas, que luego fueron usados como plaguicidas, tuvo notorio crecimiento la ocurrencia de episodios que vincularon el uso de insecticidas, no solo con el deceso de individuos, sino con las transformaciones de poblaciones y comunidades enteras de aves observadas a campo. Durante la década de los '50 y '60, comienzan a describirse los efectos producidos por la exposición crónica a los tóxicos mencionados. En 1962 se publica la obra *Silent spring*, de Rachel Carson, hito que marcó un punto de reconocimiento significativo hacia las aves como organismos útiles para valorar los efectos de los plaguicidas en los ecosistemas. Desde entonces, múltiples especies presentes en ecosistemas acuáticos y terrestres sirven como modelos para la valoración de los efectos producidos por una amplia variedad de contaminantes, entre los que destacan los metales pesados, los plaguicidas, los contaminantes orgánicos persistentes (Persistent Organic Pollutants- POPs), los residuos de diversos fármacos y los derivados de hidrocarburos (Newman *et al.*, 2019).

Las aves como bioindicadores ambientales

El concepto de bioindicador es utilizado con frecuencia y como pilar fundamental en los estudios referidos a las ciencias ecotoxicológicas. Se ha tomado como bioindicador a todas aquellas especies utilizadas como herramientas para apreciar las condiciones de un ambiente, la salud de un ecosistema y sus cambios, cuando son capaces de determinarlos a partir del estudio de sus funciones y poblaciones (Hoffma, 2003; Parmar *et al.*, 2016). El término “centinela” ha sido utilizado como sinónimo de bioindicador, aunque especialmente ligando a una especie con un contaminante o grupo de contaminantes ambientales, y las aves han sido utilizadas como tales en la valoración de ecosistemas acuáticos y terrestres, con igual importancia (Burger y Gochfeld, 2004; Mo *et al.*, 2018, Kalisiska, 2019).

Egwumah *et al.* (2017) realizaron una amplia clasificación de bioindicadores, donde incluyen y diferencian conceptos como los de indicadores ecológicos, indicadores de diversidad, especies claves, especies focales, especies paraguas, indicadores de contaminación, entre otros. Particularmente, dentro del concepto de “indicadores ambientales”, clasifica las categorías de especies centinelas, especies detectoras y especies explotadoras, definiendo a las primeras como aquellas especies sensibles a demostrar efectos tempranos de exposición a un contaminante.

Un excelente bioindicador, de acuerdo con Burger y Gochfeld (1999) y Kalisiska (2019), debe reunir condiciones que lo determinen como biológica, metodológica y socialmente relevante. En referencia a la importancia biológica, una especie bioindicadora debería presentar: baja variabilidad genética natural, cambios mensurables y persistentes que puedan atribuirse a una causa, sensibles a cambios en el ecosistema y con historial biológico conocido (historia de vida). En referencia a su éxito como herramienta metodológica, son deseables características como: que sean fáciles y abundantes para monitorear, que permitan recopilación y análisis de datos bien definidos, como así también que faciliten el planteo de objetivos claros e hipótesis comprobables. Finalmente, la relevancia social determina el uso de ciertas especies como centinelas, ya que se prefiere la elección de especies que puedan otorgar rentabilidad, fácil comprensión de los cambios, científicamente defendibles y que presenten pertinencia a lo relativo al bienestar animal y humano.

Las aves son vertebrados bípedos y vivíparos con adaptaciones únicas como alas y plumas, que en la mayoría de los casos les confieren habilidades particulares como la capacidad de vuelo. A diferencia de otras clases de vertebrados, también presentan particularidades en su sistema respiratorio, digestivo, hematopoyético, entre otros. Existen alrededor de 10.000 especies conocidas que habitan una extensa superficie del planeta comprendida entre la Antártida y el Ártico (Cotín Martínez, 2012). En particular, Argentina cuenta con una avifauna representada por aproximadamente 1007 especies, las cuales habitan las 18 ecorregiones del país y representan el 31% de las especies que habitan América del Sur. En la mayoría de los casos, Argentina comparte más del 50% de su diversidad de aves con los países limítrofes (Cuervo *et al.* 2011). Las aves ocupan una gran diversidad de ecosistemas urbanos, rurales y naturales, incluidos los ecosistemas netamente marítimos. Los comportamientos alimenticios y reproductivos son altamente variados, como así también presentan comportamientos que hasta la actualidad aún no han sido completamente descritos, por citar el caso de los movimientos migratorios de muchas especies.

Alineado con las propiedades citadas sobre un buen bioindicador, las aves presentan ciertas características generales que les han conferido, con el tiempo, la posibilidad de ser tomadas en cuenta como tal (Gregory *et al.*, 2005; Egwumahet *al.*, 2017):

- Las aves pueden ser observadas, halladas y muestreadas con relativa facilidad en comparación con otras clases de vertebrados,
- La taxonomía de estos vertebrados ha sido bien descrita y es fácil su identificación a campo,
- La distribución, abundancia, preferencias de hábitat, biología e historias de vida son bien conocidas para una gran cantidad de especies,
- Son sensibles a cambios específicos en los ambientes, en especial, frente a la exposición a diversos tipos de tóxicos,
- Ocupan diferentes eslabones de la cadena trófica, lo que hace que sean sensibles al impacto de los contaminantes en los distintos escalafones, además de permitir estudios de comunidades donde los diversos niveles tróficos se encuentran representados en un mismo ambiente,
- Su longevidad hace que manifiesten las presiones ambientales a lo largo del tiempo, posibilitando la medición de los efectos en plazos iguales o superiores a un año,
- Muchas especies son consideradas emblemáticas o agentes polinizadores y de dispersión de semillas, lo que les confiere una importante relevancia biológica y social.

Algunas características han producido que ciertos investigadores encuentren controversias en su utilización como agentes bioindicadores (Gregory *et al.*, 2005). Estas condiciones pueden atribuir una ventaja o desventaja dependiendo de la escala espacial o temporal del estudio y los objetivos que se plantean en particular. Las mismas se encuentran vinculadas a:

- Las aves son organismos móviles, y si bien se facilita su observación, puede ser complejo atribuir una relación con ciertos cambios a ambientes específicos. Se requiere de la comprensión de los movimientos migratorios para muchas especies, a fin de integrar los efectos con los puntos de muestreos,
- Varios y diversos factores estresantes podrían afectar y producir respuestas similares frente a situaciones de cambios en los ecosistemas,
- Varias especies se encuentran amenazadas o en peligro, por lo que su abundancia dificulta la obtención de muestras representativas.

El punto de ser un bioindicador apto o no se determinará en función de las especies elegidas y la muestra a ser tomada para cada estudio en particular. En la

historia de la ecotoxicología las aves han sido tomadas como centinelas de salud humana y ambiental. El ejemplo más antiguo quizás se cita incluso antes de la descripción de los conceptos de “ecotoxicología” y “bioindicadores” en un contexto científico. Los canarios fueron las aves utilizadas desde principio del siglo 20 en el interior de las minas de carbón, con el objeto de advertir a los trabajadores de forma temprana y rápida, sobre el escape y la contaminación del aire producida por gases tóxicos, especialmente monóxido de carbono. Los canarios, debido a su sensibilidad, se desmayaban o morían 20 minutos antes que los mineros, lo que daba una advertencia fiable y a tiempo para salvar múltiples vidas humanas en riesgo (Pollock, 2016).

En esta investigación, los contaminantes que nos interesan y en los que hemos puesto el foco de interés son los plaguicidas, en especial aquellos categorizados como anticolinesterásicos, de acuerdo con su mecanismo de acción. Dado que la provincia de Mendoza representa uno de los principales oasis productivos agrícolas del oeste argentino, estos plaguicidas cobran una importancia marcada sobre otros contaminantes, debido al volumen de aplicación en los agroecosistemas, como así también a su preferencia de uso como estrategia en el control químico de plagas.

Contaminantes agrícolas: los plaguicidas anticolinesterásicos

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 1988) define que un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar los organismos que originan acciones perjudiciales para el hombre y sus actividades económicas. Desde el punto de vista ambiental se los define como productos intrínsecamente tóxicos desarrollados para blancos biológicos selectivos, que tienen el potencial de contactar con otros organismos y matrices (aire, suelo y agua), y afectan la salud pública y el ambiente (Miller, 2014).

El producto comercial que se aplica directamente o tras ser diluido se denomina formulación y puede encontrarse constituido por diversos componentes, como: *principio activo*, *ingredientes inertes*, *coadyuvantes* y *aditivos*. Los plaguicidas pueden ser clasificados de múltiples maneras: de acuerdo a su grado de toxicidad, su objetivo, su mecanismo de acción y grupo químico. De acuerdo a estos criterios de clasificación,

podemos reconocer en general tres grandes grupos de plaguicidas: herbicidas, fungicidas e insecticidas. Los últimos, presentan la nómina más diversa de principios activos en donde se destacan, debido a su uso histórico o actual, los compuestos organoclorados, organofosforados (OF), carbamatos (CB), n-metilcarbamatos, piretrinas y piretroides, neonicotinoides, lactonas macrocíclicas, entre otros (Ferré *et al.*, 2019). En este estudio, nos centraremos en los insecticidas OF y CB, los cuales tienen un mecanismo de acción con el mismo fin: inhibición de la acción de las enzimas colinesterasas (ChE).

La introducción de los plaguicidas para el control de plagas en agricultura fue una de las tecnologías que tuvieron más rápida adopción a nivel mundial, si bien su uso masivo comienza luego de la Segunda Guerra Mundial (March *et al.*, 2014). A lo largo de un período de 30 años, comprendido entre la década de los '60 y los '90, la expansión de la superficie de suelos para agricultura en los países en desarrollo alcanzó un total de 172 millones de hectáreas, lo que representó el mayor incremento de la actividad agrícola en la historia (25%). Las perspectivas indican que entre los años 2000 al 2030 existirá un incremento de 120 millones de hectáreas (13%) cultivadas teniendo lugar principalmente en los países latinoamericanos. Este menor aumento no estará dado por un menor consumo, sino por un aumento en la eficiencia e intensificación de los sistemas productivos. Si bien las perspectivas a futuro implican que el impacto de la agricultura en el ambiente será proporcionalmente menor, hasta la fecha, las prácticas implementadas en el agro han sido las principales responsables de la contaminación de aguas por nitratos, fosfatos y plaguicidas, la mayor fuente antropogénica de gases de efecto invernadero, y la principal causa estimada de pérdida de biodiversidad en el mundo (FAO, 2002).

La intensificación agrícola aporta sus propios problemas. Las plagas se encuentran entre los factores limitantes más importantes de los sistemas productivos agrícolas y forestales, pudiendo ser responsables del 37 al 50% de pérdidas en la agricultura mundial (Barrera, 2007). Por otro lado, los insecticidas y herbicidas son uno de los factores que reducen la biodiversidad, ya que destruyen hierbas e insectos y con ellos las especies que sirven de alimento a otros eslabones de las cadenas tróficas. Por tanto, la pérdida de biodiversidad no se limita a la fase de ocupación de la tierra en la expansión agrícola, sino que continúa mucho después. Se prevé que, hacia el futuro, la pérdida de hábitat para la vida silvestre a favor de la agricultura continuará, pero a un

ritmo más lento; la deforestación se hará más pausada y el pastoreo extensivo dejará paso cada vez más a la producción pecuaria industrial. Sin embargo, el panorama relativamente alentador se ve limitado, ya que los riesgos medioambientales relacionados con los plaguicidas, fertilizantes químicos y residuos animales, seguirá siendo preocupante, amén de la inclusión cada vez mayor de políticas agrarias que bregan por atenuar o contrarrestar los efectos negativos (FAO, 2002; Bernardos y Zaccagnini, 2011).

Tilman *et al.* (2002) habían estimado que para el 2020 el consumo de plaguicidas a nivel mundial alcanzaría los 6 millones de toneladas en caso de no incurrir en el mejoramiento de estrategias para el manejo de plagas. Se conoce que el 85% de la producción mundial de plaguicidas se destina al uso agrícola (Ramírez y Lacasaña, 2001). Solo para el año 2017 (último año publicado en las bases de datos de la FAO), se reporta que se utilizaron mundialmente un total de 4.113.591 toneladas (Tn) de plaguicidas con fines agrícolas, de las cuales 716.881 Tn fueron aplicadas en los suelos de América del Sur (FAO, 2017). No se dispone de los valores globales referido únicamente al uso de plaguicidas anticolinesterásicos. Sin embargo, Argentina para ese año utilizó un valor aproximado a 196.000Tn de plaguicidas, en las cuales se incluyeron un total de 3.736 Tn de insecticidas. Se estimó que la cantidad de OFs aplicados llegó a 2.212 Tn, mientras que los CB solo alcanzaron una cifra de 84 Tn (<http://www.fao.org/faostat/es/#data/RP>).

En el presente, una de las actividades económicas centrales de la provincia de Mendoza es la producción de hortalizas pesadas y frutales, en especial vid, olivos, ciruelos, duraznos, perales, manzanos, nogales y almendros (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2010). Esto representa el 14% de la producción nacional de vegetales y el 21% de la producción de frutas. De acuerdo a los datos reportados por la investigación realizadas por Ferré *et al.*, (2018a), se estimó que en la provincia se utilizan a modo de agroquímicos al menos 51 principios activos diferentes, donde el mayor porcentaje de uso (32,7%) fue representado por los insecticidas. Al menos un 40% de los productores entrevistados reportó el uso del OF clorpirifos (CPF) de manera individual o en mezclas y un 5% reportó el uso del CB carbosulfán (CSF).

En cuanto a los efectos adversos agudos de los plaguicidas, se calcula que a nivel mundial se producen 3 millones de intoxicaciones agudas por plaguicidas en humanos, y en promedio 20 mil concluyen en la muerte de los afectados (WHO, 1990;

Satoh, 2006). En Argentina, se encuentran registrados alrededor de 3000 formulaciones comerciales de productos fitosanitarios (Pórfido *et al.*, 2014), donde están incluidos los plaguicidas anticolinesterásicos. Muchas de estas formulaciones pueden ser adquiridas sin prescripción profesional, en comercios de acceso libre al público y sin asesoramiento sobre su correcto uso y disposición final (Villamil Lepori *et al.*, 2013). En el 2017, la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) recibió 6080 consultas por intoxicaciones y asesoramiento, donde solo el 14% fue debido a plaguicidas, y de estos, el 33% fue por productos agrícolas, en su mayoría insecticidas (61%) (CASAFE, 2017). En tanto el CIAT Mendoza (Centro provincial de Información y Asesoramiento Toxicológico, 2018), informó que en ambientes agrícolas los compuestos OF aportan el 23% de los casos de intoxicaciones, seguido de los CB (18,4%), y luego los herbicidas y fungicidas con el 14% de los casos cada uno. Mientras que los efectos agudos de la exposición humana a plaguicidas son claros y evidentes, el impacto para la salud en exposiciones crónicas de bajo nivel es menos conocida (Butinofet *et al.*, 2019). A la exposición a bajas dosis de plaguicidas durante largos períodos de tiempo, incluso años, se la ha relacionado con procesos carcinogénicos, teratogénicos, y de disrupción endócrina (Mnifet *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Ferré *et al.*, 2019; Hwa Yun *et al.*, 2020).

En referencia a los animales, existen reportes que evidencian el impacto de los plaguicidas anticolinesterásicos en diversos grupos animales alrededor del mundo, pero poder estimar cifras concretas de intoxicaciones, reparando en casos agudos y crónicos a nivel global sería probablemente inmensurable. Con enfoque en Argentina, las cifras de casos registrados en animales domésticos o silvestres son actualmente desconocidas, y solo se reportan casuísticas o hallazgos eventuales. Por ejemplo, en publicaciones científicas se encuentran casos de envenenamientos intencionales con CBs de perros en ambientes domésticos o peridomésticos (Ferré *et al.*, 2015; Saldeña *et al.*, 2017), intoxicaciones accidentales en toros por OFs en ambientes pecuarios (D’Espósito *et al.*, 2005) o casos de afección y rastros de diversos compuestos anticolinesterásicos en fauna silvestre, entre ellos peces (Carrquiribordeet *et al.*, 2005; Ballesteros *et al.*, 2007; Brodeaur *et al.*, 2021) y aves (Goldstein *et al.*, 1999; Cid *et al.*, 2007). El uso del tipo de plaguicidas relacionados con intoxicaciones accidentales en humanos, e indirectos o intencionales en animales, está directamente relacionado con los plaguicidas que se utilizan en el ambiente agrícola de la región, al conocimiento popular de la toxicidad del

principio activo y a la disponibilidad de los mismos en el mercado local (Martínez-Haro *et al.*, 2007).

Características ecotoxicológicas de los insecticidas organofosforados y carbamatos

Los insecticidas son todos aquellos compuestos pesticidas específicamente utilizados para matar, prevenir el crecimiento o evitar comportamientos indeseables y destructivos de los insectos (USEPA, 2020). Estos pueden ser clasificados de acuerdo a su estructura química o mecanismo de acción. Prácticamente, la totalidad de los compuestos insecticidas que se emplean en la actualidad afectan el sistema nervioso central de los insectos, ya sea al interferir con el transporte de membrana, inhibir enzimas específicas o producir la liberación y permanencia de neurotransmisores particulares (Ware, 2004). La gran mayoría de estos compuestos desafortunadamente no son selectivos y afectan tanto a los organismos destinatarios como así también a las especies contra las que no están dirigidos (Devine *et al.*, 2008).

Se considera compuesto OF a los insecticidas que derivan del ácido fosfórico y tienen en común un átomo de fósforo pentavalente y un enlace fosforil ($P = O$) o tiofosforil ($S = P$). Se conocen al menos 13 variaciones de OP. Una reacción típica de transformación que sufren estos compuestos es la desulfuración oxidativa (paso de $P = S$ a $P = O$), generando un oxón activo que incrementa el potencial tóxico (Gupta, 2007). Se los considera como los pesticidas más riesgosos para los vertebrados (Story y Cox, 2001), si bien son ampliamente utilizados por ser considerados de baja persistencia en el ambiente y alta efectividad. La prohibición de los plaguicidas organoclorados intensificó y popularizó el uso de OF (Badii y Varela, 2008).

En condiciones fisiológicas normales, la AChE se encarga de la hidrólisis de la acetilcolina. Este neurotransmisor se almacena en vesículas sinápticas dentro de las terminales axónicas. El cambio en la concentración de iones cerca de la terminal hace que las vesículas se fusionen con la membrana y la acetilcolina es liberada hacia la hendidura sináptica, donde encuentra los receptores específicos sobre la célula postsináptica y genera un cambio en el potencial de membrana. Generada esta reacción, cada molécula de la enzima AChE, anclada entre la terminal nerviosa y la membrana de la célula muscular, se encarga de hidrolizar en acetato y colina hasta 10 moléculas de

acetilcolina por milisegundo (Albetset *al.*, 1983) (Figura 1). Ante una inhibición de las enzimas colinesterásicas, debe comprenderse que su principal acción ocurre en las sinapsis muscarínicas y nicotínicas (sinapsis colinérgicas), por lo que la signología a presentarse se relaciona con la afección de las fibras nerviosas autónomas pre-ganglionares, fibras simpáticas post-ganglionares, terminaciones nerviosas de la médula adrenal, otras glándulas, vasos sanguíneos y placa neuromotora (Bujdud León y Pereda Solís, 2019).

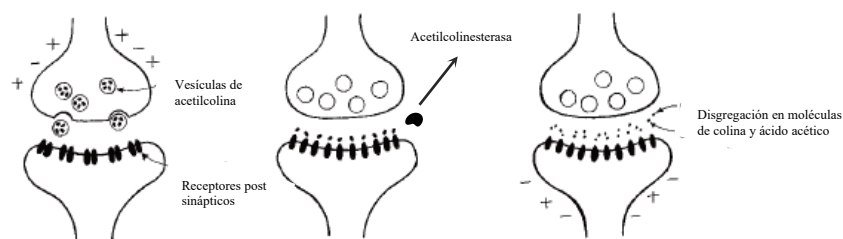


Figura 1. Adaptación de esquema representativo de la función normal en una sinapsis nerviosa. Se demuestra la transferencia del impulso nervioso mediante la acción de las moléculas de acetilcolina.

El mecanismo de toxicidad se desarrolla cuando un OF forma un complejo intermediario transitorio al unirse al hidroxilo de la serina en la región activa de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) que al hidrolizarse genera una unión estable y mantiene a la enzima fosforilada, inhibida y no reactiva (Klaassen y Watkins, 2005). La AChE es responsable de descomponer y extinguir la actividad biológica de la acetilcolina y, al encontrarse inactiva, provoca la acumulación del neurotransmisor en las terminaciones nerviosas de todos los nervios colinérgicos y produce una estimulación continua de actividad eléctrica del sistema nervioso autónomo, la placa neuromotora y el sistema nervioso central. En la mayoría de los casos la desfosforilación es tan lenta o nula que se considera a la formación del complejo OF-AChE como irreversible y, de acuerdo a la evolución en el organismo, la toxicidad puede persistir entre 20 a 30 días posteriores a la exposición hasta que la enzima es nuevamente re-sintetizada y logra disminuir el exceso de acetilcolina.

Los CB son insecticidas derivados del ácido carbámico. El carbaril fue el primero de estos compuestos en ser introducido en los programas agrícolas en 1956 (Ware y Whitacre, 2004). El mecanismo de acción de un CB consiste también en inhibir la enzima AChE. Sin embargo, a diferencia de los OFs, estos compuestos se unen a la región activa de la enzima y sufren una hidrólisis en dos fases: la primera que

consiste en la carbamilación de la enzima, mientras la segunda consta de un proceso de descarbamilación de la molécula inhibida, lo que da lugar nuevamente a una enzima libre y activa. Esta última fase suele presentar una biotransformación acelerada, por lo que se considera que los CB producen una inhibición reversible. En consecuencia, los niveles de AChE se restablecen en el corto plazo y los signos de neurotoxicidad aguda permanecen poco tiempo, además de no presentar toxicidad retardada como los OFs (Klaassen y Watkins, 2005).

Los signos observados en humanos, mamíferos y aves en intoxicaciones agudas por OF y CB suelen ser similares y se encuentran asociados a neurotoxicidad, entre los que suelen destacar la sialorrea y aumento de las secreciones glandulares, vómitos, diarreas, cólicos, hipotensión, bradicardia, palidez, fasciculaciones, hiporreflexia, debilidad y parálisis muscular, temblores, letargo, convulsiones, disnea, coma y muerte, entre otros signos. También, se han descrito cuadros secundarios y tardíos de la intoxicación en humanos y otros mamíferos, como el síndrome intermedio y el síndrome de neurotoxicidad retardada por OF (Klaassen y Watkins, 2005; Saldeña *et al.*, 2017). Por otro lado, se han observado variados efectos subletales a causa de exposiciones crónicas, entre los que se pueden enlistar cambios estructurales y bioquímicos en órganos como el riñón, hígado, cerebro, ovarios, etc.; procesos degenerativos del sistema nervioso; efectos mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos; citotoxicidad; inmunotoxicidad; toxicidad reproductiva; cambios comportamentales y; disrupción endócrina (Hoffman, 2003; Ghorab y Khalil, 2015).

Los OF y CB son aplicados a campo en distintas presentaciones: gránulos, polvo o líquidos, disueltos en solventes orgánicos para ser pulverizados con distintas tecnologías. Existen formulaciones de compuestos únicos o mezclas. La principal fuente de liberación de estos contaminantes es la actividad agrícola, la cual ocupa el 10% de la superficie terrestre mundial (150 millones de km²) (Devine *et al.*, 2008). En menor proporción son utilizados para los ambientes domiciliarios o rurales principalmente contra moscas y mosquitos, y como fármacos externos en mascotas y humanos contra pulgas, piojos y garrapatas. Tanto los humanos como los animales pueden verse expuestos mediante diversas vías: dérmica, por contacto directo con piel y mucosas; inhalatoria al encontrarse cerca o en los mismos sitios de pulverización y; digestiva al ingerir agua o alimentos contaminados, como semillas, pasturas, frutas y vegetales y presas envenenadas en el caso de la fauna silvestre que ocupa los escalones superiores

de la pirámide trófica (Ragnarsdottir, 2000). La última vía es más peligrosa en aves que las dos anteriores (Driver *et al.*, 1991; Prosser y Hart, 2005).

Los insecticidas anticolinesterásicos siguen ciertos patrones referidos a su toxicidad y disposición ambiental, de acuerdo a la revisión realizada por Ragnarsdottir (2000). Se los han encontrado presentes en suelos, aguas superficiales y subterráneas y en la atmósfera, lo que implica que pueden ser transportados por largas distancias debido a las corrientes de aire y agua. Químicamente, se puede considerar que son compuestos polares (factor K_{ow} intermedio) con una relativa alta solubilidad en agua y baja capacidad de bioacumulación, como así también de biomagnificación (Hoffman, 2003). Sin embargo, existen excepciones como es el caso del CPF, el cual presenta un comportamiento opuesto al planteado. Los procesos químicos ambientales pueden afectar la biodisponibilidad de los OF, entre ellos el CPF:

- Solubilidad: Suelen ser compuestos altamente solubles, lo que aumenta su disposición en aguas y escorrentías en suelos;
- Oxidación: los procesos de oxidación suelen ser importantes en la obtención de las formas “oxon”, con alto potencial tóxico, y las matrices ricas en microorganismos aumentan este tipo de transformaciones;
- Hidrólisis: suele ser la primera reacción que ocurre en OF y una de las más importantes, ya que implica su disolución en agua y facilita su transporte.
- Fotólisis: Suele ser un proceso importante que ocurre en aguas superficiales y la atmósfera. Este factor, junto con la temperatura y el pH pueden alterar las reacciones de disociación, oxidación o transformación de las moléculas de OF y CB, y condicionar su biodisponibilidad. En general se estima que, a mayor incidencia de luz solar, temperatura y pH la desnaturalización de los compuestos es elevada y su vida útil es menor.
- Biodegradación/ biotransformación: Es el principal y más importante proceso de inhabilitación de los insecticidas en suelo, donde los microorganismos utilizan estos compuestos como fuente de carbono. Si bien se espera una alta tasa de transformación en matrices ricas en bacterias y algas, ellas deben encontrarse “aclimatadas” al compuesto químico, es decir, contar con los mecanismos enzimáticos, bioquímicos, mutagénicos y de crecimiento adecuados para llevar a cabo la acción. De lo contrario, el proceso de biodegradación es lento.

En el presente estudio se profundizará sobre aspectos de dos insecticidas anticolinesterásicos en particular: CPF y CSF, dado que fueron los insecticidas utilizados en los sitios agrícolas donde se tomaron muestras biológicas para el análisis de biomarcadores.

Consideraciones toxicológicas del clorpirifos

El CPF [O, O-dietil-O-(3, 5, 6-tricloro-2piridinil) fosforotioato], CAS n° 2921 88-2, es un insecticida de amplio espectro destinado a insectos chupadores o masticadores y que actúa por contacto, ingestión o inhalación (Figura 2). Es ampliamente utilizado en actividades agrícolas, pecuarias y domésticas para el control de plagas.

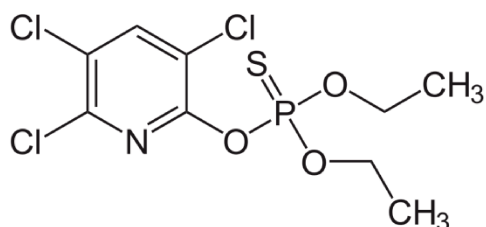


Figura 2. Estructura química de la molécula de clorpirifos (INCHEM, 2014)

El CPF es un sólido blanco de apariencia cristalina y de aroma fuerte. Es poco hidrosoluble, de manera que se mezcla con vehículos oleosos antes de ser aplicado a los cultivos o en los animales. También se puede aplicar a los cultivos en forma de microcápsulas. Se encuentra disponible como ingrediente activo en insecticidas comerciales, que presentan concentraciones variadas que rondan entre el 3 al 50%, ya sea como principio activo único o en mezclas (ATSDR, 2016). Presenta capacidad de adherirse firmemente a partículas del suelo y su principal manera de propagación es la volatilización. Dispuesto en el ambiente, puede sufrir procesos de biotransformación y descomposición. El CPF presenta una absorbancia en el espectro ultravioleta a 295 nm, lo que indica su alta susceptibilidad a la degradación por la luz solar. Además, en el agua, la hidrólisis abiótica y la oxidación fotosensible representan los procesos de biotransformación más importantes, donde el pH y las temperaturas elevadas facilitan estos procesos. Por otro lado, la degradación por hidrólisis abiótica es más efectiva en suelos estériles (reducida cantidad de materia orgánica) y a elevadas temperaturas. Si

bien su degradación en suelos es lenta, en aquellos que son ricos en microorganismos, la degradación microbiana suele ser la más importante, aunque el CPF podría llegar a ser resistente a la catabolización por parte de algunos organismos. Se estima que puede persistir en suelos entre 60 a 120 días (Testai *et al.*, 2010).

La incorporación del CPF al organismo puede ser mediante vía inhalatoria, oral o dérmica. Algunos estudios han demostrado que luego de su distribución por todo el cuerpo, el CPF presenta predilección por acumularse en tejido adiposo y desde allí es liberado lentamente. Gran parte del insecticida absorbido es metabolizado en el hígado por la vía de la citocromo P-450 monooxigenasa a su forma oxón, que presenta un potencial entre 300 a 400 veces más alto en la inhibición de las colinesterasas en comparación con su forma anterior (Sultatos y Murphy, 1983). A continuación, es hidrolizado a 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) por la A-esterasa, lo que representa la ruta más común en el proceso de detoxificación y en mamíferos su eficiencia puede variar de acuerdo al sexo, la edad y el estado de salud (Ames *et al.*, 1989). Sus metabolitos hidrosolubles en forma de dietiltiofosfato o dietilfosfato son eliminados en un 90% por vía urinaria y un 10% por vía fecal (Figura 3)

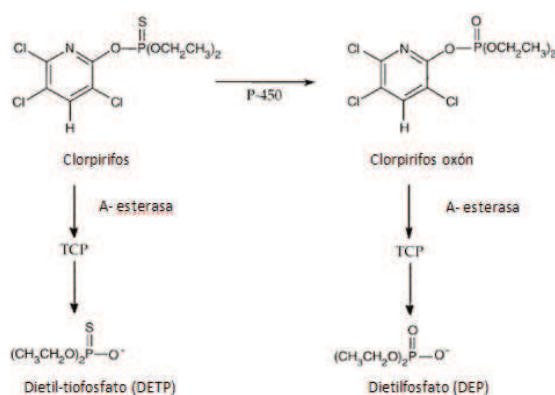


Figura 3. Rutas metabólicas y de transformación del clorpirifos en organismos vertebrados (Adaptado de Samet *et al.*, 2010)

Consideraciones toxicológicas del carbosulfán

El CSF [2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-benzofuranyl(dibutilaminotio) metilcarbamato], CAS N° 55285-14-8 es un insecticida- acaricida y nematicida con acción sistémica, destinado a controlar las formas adultas y estadios intermedios de estos artrópodos que atacan a los cultivos (Figura 4). Es aplicado exclusivamente sobre

suelos, semillas y excepcionalmente sobre la parte foliar de las plantas a fin de combatir artrópodos perforadores de maderas en cultivos forestales, frutales, algunas hortalizas pesadas, maíz y algodón (FAO, 2017).

El CSF presenta un aspecto líquido viscoso de color amarronado. Puede mantenerse estable durante un año a 22°C. Su presentación comercial puede ser en forma líquida (emulsionado), en polvo o granulada y sus formulaciones pueden contener este principio activo como único componente o mezclado con otros CBs, OFs o piretroides. Su solubilidad en agua es baja, por lo que debe estar disuelto en vehículos oleosos o solventes para su aplicación (INCHEM, 2003).

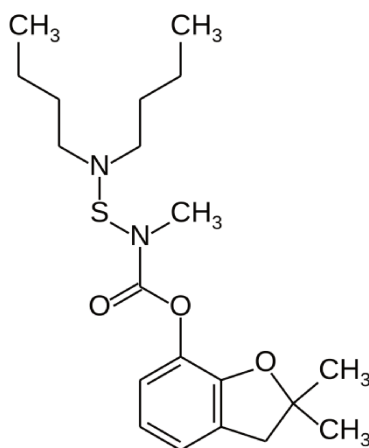


Figura 4. Estructura química de la molécula de carbosulfán (INCHEM, 2003)

El CSF reportado como un compuesto poco volátil, de moderada a baja persistencia en agua, y sus moléculas permanecen inmóviles adheridas a partículas de suelo. Los principales procesos de biodegradación ocurren rápido, donde la hidrólisis y la fotólisis presentan mayor eficiencia a temperaturas elevadas en suelos y agua. La persistencia del principio activo puede verse prolongada de acuerdo al vehículo utilizado para la fumigación (FAO, 2000).

Los estudios toxicodinámicos para CSF han sido realizados a partir de la administración en forma directa en ratas y cabras. Las principales rutas de ingreso al organismo son la vía oral y dérmica. Una vez incorporado en circulación, su biotransformación ocurre en el hígado a partir de múltiples procesos de hidrólisis, oxidaciones y conjugaciones, lo que implica que alrededor del 90% del CSF incorporado pueda ser transformado y eliminado en más de 10 metabolitos diferentes en

72 h (Figura 5). Hasta un 88% se excreta por orina en forma de metabolitos hidrosolubles, puntualmente dibutilamina (DBA); hasta un 22% en materia fecal y hasta un 10% por la espiración. Solo un 2% puede ser bioacumulado en el organismo (Fang y El Naggar, 1995; Curry y Weintraub, 1996).

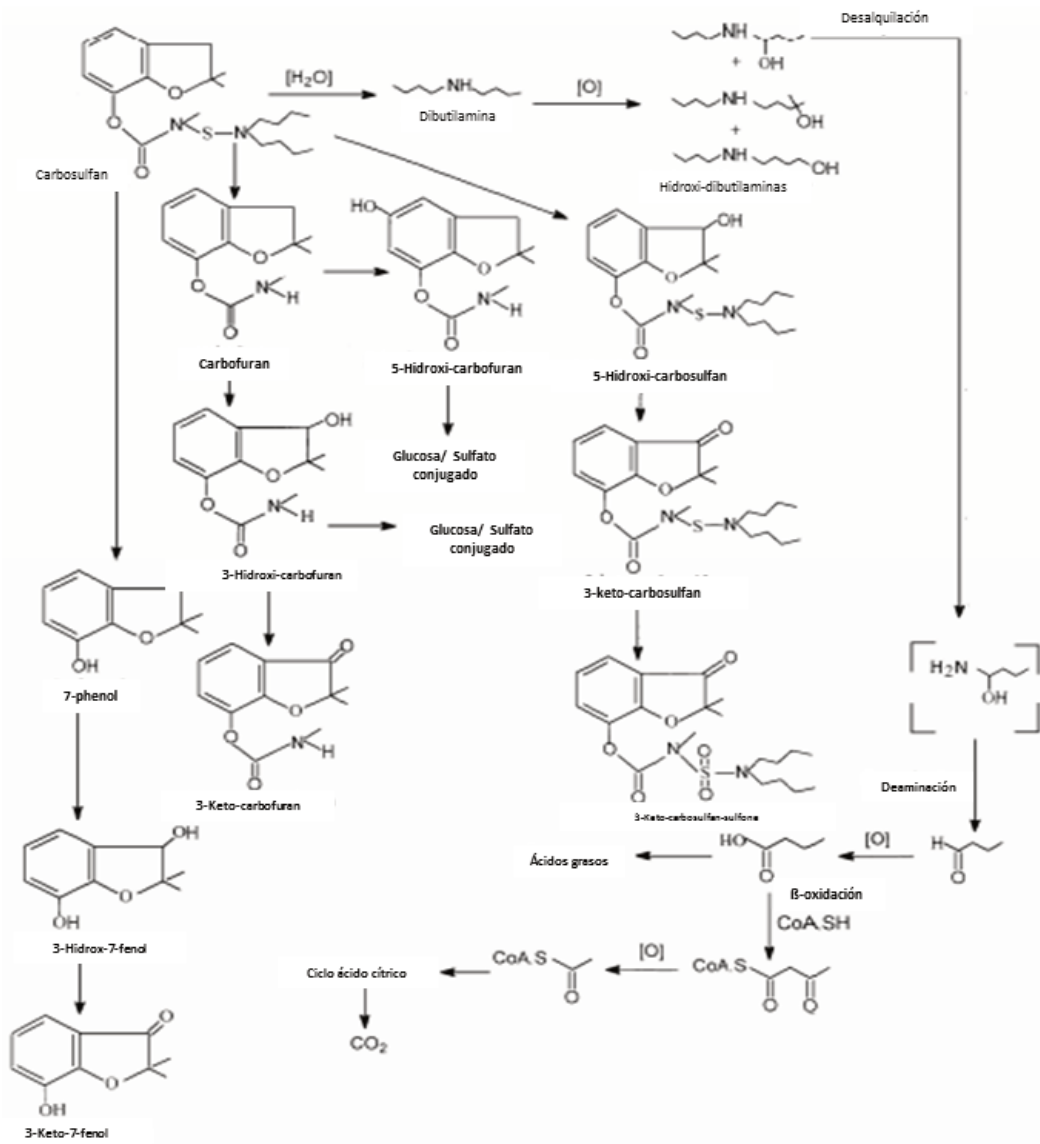


Figura 5. Rutas metabólicas y de transformación del carbosulfán en organismos vertebrados (adaptado de Fang y El Naggar, 1995).

Un informe de la FAO realizado en el 2003 detalla que, en el análisis de la toxicidad aguda, la DL50 probada en ratones y conejos es baja a comparación de otros CBs (FAO, 2003). En cuanto a la toxicidad crónica se ha reportado que el CSF no presenta efectos concluyentes en cuanto a genotoxicidad, carcinogénesis, teratogénesis o toxicidad reproductiva. Este insecticida dispuesto en el suelo a pH mayor a 7 suele ser estable, pero favorecido por condiciones de pH bajo, temperaturas de moderadas a

elevadas y suelos húmedos ricos en materia orgánica y microorganismos, tiende a transformarse rápidamente por procesos de hidrólisis en uno de sus metabolitos activos más persistentes y tóxicos: el carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7- benzofuranil n-metilcarbamato), el cual puede persistir entre 3 a 50 semanas en aquella matriz (Getzin, 1973; Sahoo *et al.*,1990). La actividad sistémica observada en los organismos no se debe al CSF *per sé*, sino a su metabolito tóxico obtenido a partir de los procesos de transformación (Figura 6).

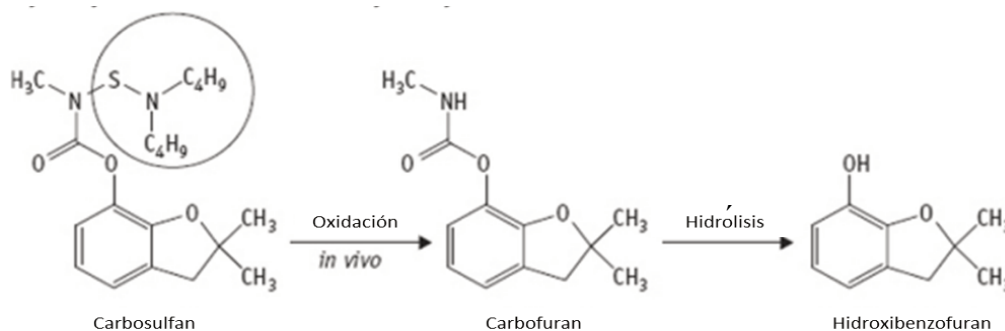


Figura 6. Degradación de carbosulfán a carbofurano, vía oxidativa, y su hidrólisis a hidroxibenzofuran.

El carbofurano (CBF) ha sido uno de los CB más utilizados en la agricultura y la actividad forestal, a pesar de su alta toxicidad para humanos y su gran facilidad para ingresar al organismo mediante la vía oral, inhalatoria y dérmica. Esto es respaldado por la elevada cantidad de reportes de intoxicación accidental de personas, animales domésticos y silvestres (Gupta, 1994). En cuanto a características ecotoxicológicas relevantes, el CBF presenta un formato de cristales sólidos blanquecinos que son estables en condiciones ambientales estándares y sus formulaciones comerciales pueden presentarse con el principio activo como componente único o asociado a CBs y OFs. En suelos y en condiciones a campo, puede ser biotransformado rápidamente por microorganismos en su metabolito 3-hidroxicarbofurano y se ha visto que los residuos de CBF pueden persistir hasta 3 meses luego de su fumigación (Isensee *et al.*, 1990). Cuando los suelos presentan riqueza en materia orgánica, pH, temperatura y humedad elevada, la persistencia de este insecticida se ve reducida (Sukop y Cogger, 1992). En agua, los principales procesos de biotransformación son la hidrólisis y la fotólisis, y su persistencia se ve afectada bajo las mismas condiciones que influyen en suelos.

El metabolismo del CBF se caracteriza por las reacciones de hidroxilación y/o oxidación que dan lugar a la formación de CBF-fenol, 3-hydroxicarbofurano, 3-hydroxicarbofurano-7-fenol, 3-ketofurán y 3-ketofuran-7-fenol, los cuales se pueden encontrar en estado libre o conjugados a diversos glucósidos (Dorough, 1968). Luego de las reacciones de conjugación, dadas en las vías de circulación enterohepáticas, el compuesto se transforma en metabolitos que son aptos para ser eliminados por la vía urinaria y biliar (Ferguson *et al.*, 1984). La toxicidad severa reportada para este compuesto comprende la presentación de la signología aguda típica de intoxicación por CBs, aunque con una manifestación en un rango de 15 min a 3 hs posteriores a su exposición. Según Gupta (1994), el CBF no solo inhibe específicamente la enzima AChE, sino otras enzimas “no blanco” como enzimas mitocondriales e isoenzimas como aquellas enzimas que contienen serinas, caboxilesterasa y butirilcolinesterasa (BChE) presentes en cerebro, plasma, hígado y músculo esquelético. Además, se pudo observar que las intoxicaciones con CBF provocaron cambios hematológicos en ratones, tales como la disminución de las concentraciones de hemoglobina, recuento total eritrocitario (RTE), hematocrito (Hto) y aumento del recuento total leucocitario (RTL), dado por un aumento de la línea neutrofilica y disminución del número de linfocitos (Gupta *et al.*, 1982).

Los efectos neurotóxicos generales y agudos mencionados para OFs y CBs, estudiados mayoritariamente en mamíferos, se reportan en las fichas técnicas tanto de CPF como el CSF, como así también su extrema toxicidad para organismos acuáticos y su alto riesgo y susceptibilidad para aves y abejas (INCHEM, 2003).

La avifauna ha sido uno de los focos de estudio utilizados para conocer y visualizar el efecto del uso de plaguicidas en las prácticas agrícolas habituales sobre la biodiversidad y la calidad de esos ecosistemas.

Biomarcadores y herramientas para la valoración de la exposición a plaguicidas en aves silvestres

Los biomarcadores son parámetros que reflejan cambios bioquímicos, histológicos, morfológicos, fisiológicos, etológicos, o de otra índole que puedan ser medibles o cuantificables, que se manifiestan en un sistema y que alteran algún aspecto

de la composición y el metabolismo, por causas espontáneas o naturales, o como reflejo de la exposición de un organismo a un agente xenobiótico, de origen físico, químico o biológico, inductor de alteraciones (Garte y Bonassi, 2005). Los marcadores biológicos pueden ser específicos, es decir que respondan a un contaminante en particular, y por lo tanto indica inequívocamente su presencia; o inespecíficos, que se modifiquen de igual manera por efecto de una amplia gama de contaminantes. En una situación intermedia, los biomarcadores relativamente específicos reflejan cambios ante un grupo de contaminantes con un mecanismo de acción similar. Poder advertir respuestas tempranas en base a biomarcadores es esencial para predecir riesgos y definir un sistema biológico de alerta eficiente (López González *et al.*, 2017).

Los biomarcadores se han podido categorizar en tres grupos (Fowler, 2012):

- *Biomarcadores de exposición*: indican la presencia inequívoca de un xenobiótico, sus metabolitos o el producto de su interacción con una célula o molécula blanco.
- *Biomarcadores de susceptibilidad*: indican la capacidad o limitación (adquirida o heredada) de un organismo para responder a la exposición de un xenobiótico.
- *Biomarcadores de efecto*: indican una alteración bioquímica, fisiológica o genética, en respuesta a la exposición a un xenobiótico. Son definidos como indicadores cuantitativos de eventos celulares y moleculares en los sistemas biológicos. Desde hace varios años, en consonancia con la creciente exposición ambiental a xenobióticos, ha ido en aumento el interés en el uso de estos biomarcadores para detectar el daño ocasionado a través de la variación de expresiones celulares. Estos biomarcadores han resultado buenos parámetros para analizar el riesgo potencial de una sustancia. Si se analiza una estructura celular o subcelular alterada, una función o variable biológica aumentada o disminuida y, si es posible asociar una enfermedad clínica a causa del contaminante, se está en presencia de un biomarcador de efecto (Hoffman *et al.*, 1993).

La variación en la frecuencia de biomarcadores entre las aves expuestas a diferentes gradientes de impacto antropogénico (incluida la ausencia de impacto) podría deberse a la influencia de las variables intrínsecas (especie, sexo, edad, dieta, estado y comportamiento migratorio) o extrínsecas, (hábitat, altitud, estación, tipo de alimento

disponible), aparte de contaminantes ambientales evidentes (Quero *et al.*, 2016). Los valores referenciales de biomarcadores, en especial en la fauna silvestre o sobre ejemplares con poca información disponible, surgen del estudio de grupos de organismos no expuestos a contaminantes y se utilizan como valor orientativo, a fin de estimar el daño o riesgo de un grupo expuesto ante la acción de un xenobiótico (Bosch *et al.*, 2011). Pueden ser utilizados como base imprescindible para comparaciones posteriores a la exposición a tóxicos en una amplia variedad de especies (Stončius, 2003).

Los biomarcadores también se definen como cualquier respuesta biológica a un químico ambiental a nivel individual o celular que demuestra una desviación del estado normal (Walker *et al.*, 2005). Son herramientas valiosas, dado que proveen, por un lado, evidencia de la exposición y/o del efecto de un tóxico, y por otro, la posibilidad de evaluar el riesgo potencial frente a diversas exposiciones ambientales. Los biomarcadores proporcionan herramientas importantes para la predicción de los posibles efectos a largo plazo de los xenobióticos en las especies silvestres, precisamente en poblaciones de animales residentes. Es esencial contar con biomarcadores confiables y relevantes, además de mínimamente invasivos, para mejorar la implementación del biomonitoreo, diagnóstico y tratamiento de las causas asociadas con su expresión y vinculados potencialmente al estado de salud de un individuo o una población. Por lo tanto, las respuestas biológicas que los animales pueden exhibir ante los efectos de los diversos tóxicos ambientales, pueden ser estudiadas, detectadas y monitoreadas. Si se dispone de biomarcadores confiables es posible instaurar programas de biomonitoreo y vigilancia de poblaciones silvestres (Gorla, 2016).

Biomarcadores de genotoxicidad

Los agentes genotóxicos son todos aquellos factores de índole químico, físico o biológico capaces de causar daño, de manera directa o indirecta, en el material genético o proteínas asociadas al ADN a dosis subletales o subtóxicas de exposición (Cuenca y Ramírez, 2004).

Para el estudio de genotóxicos ambientales, varios biomarcadores relacionados con el daño al material genético y la carcinogénesis han sido analizados en especies

silvestres. Entre ellos se destacan biomarcadores que denotan modificaciones a nivel químico y estructural de la molécula del ADN y sus niveles de organización o compactación (Bonassi y Au, 2002). Sin embargo, el estudio de marcadores de daño genético en las especies expuestas en el medio ambiente, no tiene por objeto evaluar el riesgo de cáncer, sino los potenciales efectos de inestabilidad genómica en células somáticas o germinales, que permitan valorar cómo ciertos agentes podrían tener impacto sobre la biodiversidad y la supervivencia de individuos y poblaciones ante eventos de contaminación del medio ambiente (Bickham y Smolen, 1994; Kleijnans y Van Schooten, 2002).

La estabilidad es una de las propiedades básicas del genoma y se encuentra influenciada por dos factores principales: la información genética individual y los factores ambientales. Por lo tanto, la estabilidad del material genético se puede utilizar como índice de la respuesta de un individuo al impacto ambiental y el estrés (Kursa y Bezrukov, 2008). La inestabilidad genética puede producirse por causas espontáneas y su conocimiento es esencial para evaluar el posible efecto que los mutágenos ambientales pueden causar y, al analizarla se da a conocer la existencia de un nivel referencial de daño genético en organismos no expuestos a agentes genotóxicos (Zúñiga-González *et al.*, 2000). Los valores espontáneos/basales podrían estar constituidos por una tasa innata y tasa ambiental, para un organismo de una especie en particular, en un sitio y tiempo determinado, pero sin el impacto de un agente potencialidad evidente para producir daño genético (Quero *et al.*, 2016).

Los biomarcadores también indican alteraciones como respuesta a la exposición de un organismo a un agente xenobiótico. La tasa de exposición se mide cuando un organismo está expuesto de manera evidente, intencional, accidental, o experimental a algún agente potencialmente peligroso (Quero *et al.*, 2016). Los organismos expuestos pueden evidenciar ciertos y determinados fenotipos individuales o celulares en respuesta al efecto del tóxico (Bosch *et al.*, 2011).

Los biomarcadores de genotoxicidad, especialmente de clastogenicidad (ruptura cromosómica) y aneugenicidad (alteración del número cromosómico), validados y frecuentemente utilizados en la actualidad son el test de aberraciones cromosómicas, el intercambio de cromáticas hermanas y el test de micronúcleos (MN) (Bernardi *et al.*, 2015). El presente estudio se centrará en la valoración de este último biomarcador

mencionado, junto con aquellas alteraciones en la morfología de los núcleos celulares (enfoque Citoma o ensayo de micronúcleos citoma), los cuales han sido utilizados cada vez con mayor frecuencia en la evaluación de los efectos de daño genético ante diferentes agentes (Pérez-Iglesias *et al.*, 2014).

Los MN son considerados un biomarcador de efecto, producido por el accionar de sustancias y procesos genotóxicos a nivel subcelular, visualizados como un cuerpo extra nuclear conformado por cromatina perteneciente a cromosomas enteros o restos de fragmentos cromosómicos que fallaron en la incorporación dentro del núcleo principal durante la división celular (Fenech, 2007). Por lo tanto, es un indicador indirecto de las aberraciones cromosómicas estructurales y/o numéricas que surgen en la mitosis. Durante la fase S de la interfase, el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente y da lugar a dos células hijas idénticas. Este proceso puede producirse de manera errónea debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas y al efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y reparto no equitativo del material genético (Figura 7).

El ensayo de MN es aplicable en diferentes tipos celulares. En mamíferos, incluido el hombre, lo más frecuente es que se realice en linfocitos de sangre periférica en cultivo celular, bajo el nombre de “ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis” (CBMN) o en células de descamación de la mucosa bucal (Bosch *et al.*, 2011). En este estudio se analiza la frecuencia de MN en eritrocitos de sangre periférica, tal como se ha preferido en muchos animales vertebrados con eritrocitos nucleados (no mamíferos), entre ellos una amplia diversidad de aves silvestres (Zúñiga-González *et al.*, 2000; 2001).

El ensayo Citoma se desarrolló originalmente como un sistema ideal para medir y cuantificar otras alteraciones nucleares (AN), además de los MNs, como puentes nucleoplásmicos (PN), brotes nucleares (BN), muerte celular (necrosis o apoptosis) y la tasa de división nuclear (Thomas y Fenech, 2011). Actualmente, en su modo integral, el ensayo de MN Citoma analiza todas las células, incluidas las células necróticas y apoptóticas, así como el número de núcleos por célula y su morfología, a fin de proporcionar una medida de citotoxicidad y actividad mitótica (Fenech, 2006).

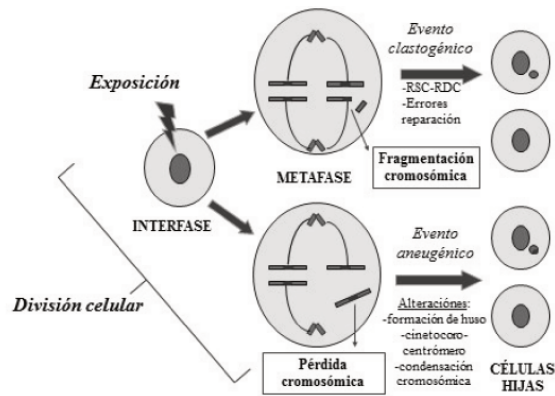


Figura 7. Formación de micronúcleos por evento clastogénico o aneugénico. RSC: Rotura de simple cadena; RDC: Rotura de doble cadena. Tomado de: Curso de posgrado Toxicología Genética (FBCB/UNL), presentación Dra. Poletta GL, Santa Fe 2012.

Los mecanismos de formación de muchas de estas ANs aún no han sido completamente estudiados, pero junto con los MN se las considera buenas indicadoras de eventos clastogénicos y/o aneugénicos producidos por agentes tóxicos (Fenech, 2002). Se consideran lesiones nucleares análogas a las MN, que pueden ser inducidas por compuestos genotóxicos incluso cuando no se inducen MN (Fenech *et al.*, 2011).

Las células con brotes nucleares contienen núcleos con una aparente constricción aguda en un extremo del núcleo que sugiere un proceso de brotación. Representan el proceso de eliminación de ADN amplificado. Complejos de reparación de ADN y posiblemente, cromosomas en exceso de células aneuploides. También podrían ser observados cuando se produce la separación defectuosa de las cromátidas hermanas en el anafase debido a una falla en la separación de las mismas (Fenech *et al.*, 2011). El brote nuclear tiene las mismas propiedades morfológicas y de tinción que el núcleo; sin embargo, su diámetro puede variar de una mitad a un cuarto del núcleo principal (Thomas y Fenech, 2011).

Los puentes nucleoplásmicos se originan debido a la reparación errónea de ADN inducidas químicamente. Esto causa la formación de cromosomas dicéntricos en los que los centrómeros son traccionados hacia polos opuestos de la célula en anafase y permite visualizar un puente o filamento de cromatina que une ambos núcleos, los que pueden romperse e iniciar ciclos recurrentes de rotura-fusión-puente e inestabilidad cromosómica. También pueden romperse para formar un MN (Fenech *et al.*, 2016).

Las colas nucleares están caracterizadas por un estrangulamiento paulatino y elongación en algún punto de la membrana nuclear. El origen en interfase indica la presencia de cromosomas dicéntricos observados en metafase. Cuando se dividen estos cromosomas forman puentes de cromatina entre los dos núcleos, en la ruptura puede conducir a la formación de un aspecto de "cola" (Kursa y Bezrukov, 2008). Pueden producirse puentes nucleoplásmicos y colas nucleares por el mismo mecanismo. Una constricción citoplasmática del puente nucleoplásmico podría resultar en una cola nuclear a través del ciclo de ruptura-puente de fusión (Anbumani y Mohankumar, 2015).

Los núcleos con muescas están representados por una clara invaginación en uno de los bordes del núcleo celular. Una de las explicaciones más aceptadas para esta AN respecto al aspecto del núcleo sugiere que cuando la célula detecta una región de ADN afectada, se inicia un proceso de reparación y eliminación de la zona dañada. La región alterada se mueve luego a la periferia del núcleo y se elimina por exocitosis. Antes de que el proceso se complete, la membrana nuclear presenta algunas imperfecciones como invaginaciones (López González *et al.*, 2017).

Las células binucleadas son células que contienen dos núcleos principales en lugar de uno. Los núcleos suelen estar muy cerca y pueden tocarse entre sí y por lo general tienen la misma morfología que la observada en las células normales (Thomas y Fenech, 2011). Puede ser la división amitótica de los núcleos interfásicos, lo que conduce a una distribución incorrecta de los cromosomas en las células hijas. Es la no disyunción de núcleos de células que no completan la citocinesis. Es por ello que indican errores en la citocinesis.

En las células con núcleo periférico o excéntrico se considera la presencia de un núcleo desplazado hacia la periferia, localizado en zonas alejadas de la región central o que esté en la región central de la célula, pero de forma transversal al eje longitudinal de la célula. Las células con núcleos excéntricos, se originarían de aquellas células que no habrían llegado a dividirse como producto de una interrupción en la división celular, al igual que para el caso de la formación de eritrocitos binucleados (López-González 2017).

Las células anucleadas (eritroplástidos) se caracterizan por la ausencia del núcleo. Se propone como hipótesis, una posible formación a través de un proceso de citocinesis en células con núcleos excéntricos. La pérdida de la forma elíptica típica de los eritrocitos enucleados, sugiere que también en este caso el componente de actina participa activamente. La presencia de eritroplástidos, es decir, formas anucleadas de glóbulos rojos circulantes puede representar un dispositivo especial para aumentar la eficiencia de transporte de oxígeno, particularmente en condiciones de contaminación del agua, al mejorar la relación superficie/ volumen celular (Barni *et al.*, 2007).

Muchas de estas alteraciones nucleares se proponen como manifestaciones primarias o que anteceden a la formación de MNs, por lo que es probable que en muchas situaciones las modificaciones en sus frecuencias de expresión pueden encontrarse asociadas (Fenech *et al.*, 2011).

Múltiples investigaciones se han realizado utilizando aves como bioindicadores a partir del uso de biomarcadores de genotoxicidad. Ilyinskikh *et al.* (1997) estimaron la frecuencia de MN, en poblaciones de palomas que habitan áreas con contaminación radioactiva. Los resultados obtenidos por Shepherd y Somers (2012) sugirieron, además, que el uso del ensayo citoma aplicado en palomas es un buen medio para identificar riesgos de daño genético que resultan de la exposición ambiental a contaminantes. La valoración de las frecuencias de MN también se ha aplicado a estudios vinculados a poblaciones de aves y su proximidad a ecosistemas urbanos y agrícolas que suponen de exposición a un conjunto de contaminantes ambientales, entre ellos plaguicidas de uso agrícola (Skarphedinsdottir *et al.*, 2010; Baesse *et al.*, 2015; Souto *et al.*, 2018; Baesse *et al.*, 2019).

Las técnicas mencionadas aplicadas en aves, tienen antecedentes que sustentan su utilidad como biomarcadores de genotoxicidad en la evaluación de ecosistemas potencialmente alterados por xenobióticos (Skarphedinsdottir *et al.*, 2010; Baesse *et al.*, 2015; Frixione y Rodríguez- Estrella, 2020; Rodrigues Silveira *et al.*, 2022). Muchos de los estudios citados fueron realizados en zonas urbanizadas o sitios donde las personas también se encuentran expuestas a los mismos factores que perjudicaron a estas aves. En este punto radica la importancia en la utilización de métodos aplicados a fauna

silvestre para la potencial valoración de las situaciones a las que los humanos también se encuentran expuestos.

Biomarcadores hematológicos

La hematología es la disciplina que estudia los diferentes tipos celulares que componen la sangre y los tejidos hematopoyéticos a partir de la cuantificación y análisis de características morfológicas (Schalm's *et al.*, 2010). Sus conocimientos permiten comprobar el estado de salud y de enfermedad de los individuos y contribuyen a identificar la respuesta y el monitoreo de un proceso patológico como también permite valorar la respuesta al tratamiento para ayudar a establecer el pronóstico de una situación clínica (Clark *et al.*, 2009). Es quizás la prueba individual más informativa y económica para monitorear estas situaciones (Maceda- Veiga *et al.*, 2015). En algunas aves muy pequeñas, en las que es difícil obtener grandes volúmenes de sangre, puede ser el único procedimiento posible de realizar con fines diagnósticos.

La sangre es un líquido viscoso de color rojo brillante a rojo oscuro. Su volumen varía en los distintos individuos, ya que representa entre el 7 y el 10% del peso corporal. Al igual que en los mamíferos, la sangre en las aves está compuesta por una fase líquida, denominada plasma, que constituye la sustancia intercelular, donde se encuentran en suspensión las células sanguíneas conformando la fase sólida (Barbeito *et al.*, 2014).

Los elementos formes de la sangre de las aves son células y se clasifican en tres grupos: los glóbulos rojos o eritrocitos, los glóbulos blancos o leucocitos y los trombocitos (Figura 8). En las aves, tal como ocurre en reptiles, anfibios y peces, los glóbulos rojos retienen el núcleo celular a lo largo de la vida celular. Los eritrocitos maduros o normocromáticos, tienen forma oval o elíptica, y de perfil tienen forma biconvexa, debido a la presencia del núcleo en el centro celular. La vida media de estas células es relativamente corta, estableciéndose entre los 28 y 45 días (Jones, 2015). En las aves, los eritrocitos son vertidos a la sangre en forma inmadura, también conocidos como reticulocitos o eritrocitos policromáticos, que tardan entre 48 a 72 hs para convertirse en células maduras (Schindler *et al.*, 1987).

El plasma, en la mayoría de las aves, es transparente o de color amarillo pálido. El color amarillo se debe a la presencia de carotenos, pigmentos vegetales abundantes en una gran variedad de plantas y en sus semillas. El plasma posee un 85% de agua y entre un 9 a 11% de proteínas, el resto del volumen sanguíneo lo constituyen diferentes solutos (Campbell *et al.*, 2015).

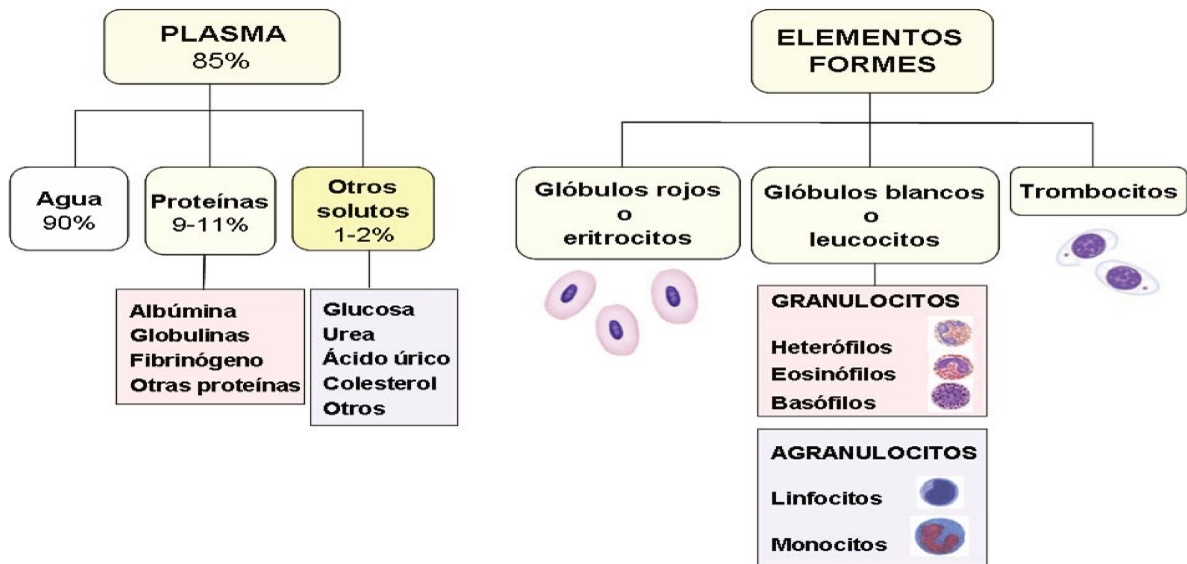


Figura 8. Componentes de la sangre en aves (Barbeito *et al.*, 2014).

El hematocrito se define como el porcentaje de volumen de sangre que ocupa la fracción de glóbulos rojos respecto al volumen total de sangre y se considera la medida más rápida y económica para valorar la serie roja (Agustí Montolío, 2015). Las aves presentan valores de hematocrito que oscilan generalmente entre el 35–55 % (Schalm's, *et al.*, 2010) y suelen relacionarse con su aptitud biológica o “fitness” (Villegas *et al.*, 2004). En general, las especies que presentan hábitos terrestres como la gallina (*Gallus gallus domesticus*) poseen un rango inferior, entre 22 a 35%, mientras que las especies voladoras establecen intervalos entre el 40–55% (Marshall y Heatley, 2020). El valor en rapaces se encuentra en un rango entre 39–44% siendo similar al descrito en otros grupos de aves (Smith y Bush, 1978). Dentro de una misma especie, el valor puede variar entre individuos en estado salvaje y aquellos mantenidos en condiciones de cautiverio donde encuentran reducida su capacidad de movimiento y/o presentan un mejor estado de hidratación (Hunter y Powers, 1980). El hematocrito se ha usado con frecuencia como un indicador del estado de salud de las aves silvestres (Ots *et al.*, 1998). Al igual que otros marcadores, se ha planteado la hipótesis de que factores como

la edad, el sexo, el estado reproductivo, la altitud, los requisitos de energía, la estación climática, la infestación parasitaria y el estado nutricional causan cambios en los valores de hematocrito de las aves silvestres (Fair *et al.*, 2007). Los niveles de hematocrito pueden aumentar por deshidratación, como consecuencia de una reducción en el volumen de plasma (Mazerolle y Hobson, 2002).

Los leucocitos, se pueden clasificar en dos grandes grupos de acuerdo a la presencia o ausencia de gránulos específicos o primarios en el citoplasma. Los leucocitos que presentan granulaciones específicas e inespecíficas o secundarias, se denominan granulocitos mientras que los leucocitos que solo poseen granulaciones inespecíficas reciben el nombre de agranulocitos (Barbeito *et al.*, 2014). Los granulocitos (heterófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos, están asociados con el sistema inmune innato, actúan como un mecanismo inicial de protección no específica de amplio espectro durante las primeras etapas de una infección. La protección específica es impulsada por la inmunidad adquirida (linfocitos), que proporciona al sistema inmunitario de vertebrados la capacidad de reconocer patógenos específicos. La leucopoyesis en aves es similar a la descrita en mamíferos, en la medida que los leucocitos sólo entran en circulación en la sangre periférica cuando están maduros (Campbell, 2015).

El recuento total de leucocitos se utiliza como índice para valorar el sistema de inmunológico y el estado general del individuo. Las características morfológicas de los leucocitos de las distintas especies de aves son muy variadas, por lo que es muy difícil describir una célula tipo. Asimismo, los porcentajes de los leucocitos también son fluctuantes, no solo entre diferentes aves, sino también dentro de la misma especie (Barbeito *et al.*, 2014). Su evaluación dentro de la clínica aviar se consigue a partir de tres parámetros esenciales del hemograma: el estudio de la morfología celular, el recuento total de leucocitos y finalmente con el recuento diferencial de cada tipo leucocitario (Campbell, 2015). El recuento diferencial de leucocitos (Figura 9) es parte de la base de datos mínimos imprescindibles para la evaluación clínica general y particular tanto de animales sanos como enfermos, e influye en el diagnóstico y el tratamiento a instaurar (Aroch *et al.*, 2013). Además, es uno de los parámetros más comúnmente evaluados para disponer de información sobre la respuesta inmune celular, la salud y el estrés fisiológico de las poblaciones animales (Davis *et al.*, 2008).

Diferentes patógenos y estímulos ambientales pueden conducir a patrones específicos de proliferación y activación de diferentes leucocitos (Campbell, 2015).

Los heterófilos son los equivalentes a los neutrófilos de la mayoría de los mamíferos. Son los leucocitos más abundantes en la sangre de la mayoría de las aves. Son células típicamente redondas y su diámetro oscila entre 10 y 15 μm . La denominación heterófilo en las aves está vinculada a la variabilidad de coloración que pueden manifestar los gránulos citoplasmáticos. Estos gránulos, no solo varían en sus propiedades de tinción, sino también en el tamaño y forma en las diferentes especies de aves, e inclusive dentro de la misma especie. Pueden presentar forma de varilla, de bastón o fusiformes, y se distribuyen ocupando todo el citoplasma. El núcleo normalmente es polimorfo con distintos grados de segmentación. La cantidad de lóbulos varía entre 2 y 5, aunque excepcionalmente el número puede ser mayor. Son indispensables para el sistema de defensa del organismo y sus funciones en las aves son similares a las que realizan los neutrófilos en los mamíferos. Pueden salir de los vasos sanguíneos para migrar a los sitios de infección, atacar y fagocitar materiales extraños y bacterias (Barbeito *et al.*, 2014).

Los eosinófilos son células que se encuentran a menudo en el hemograma de muchas aves y en otras pueden ser infrecuentes. Su porcentaje varía entre el 0 y el 2% del total de los leucocitos. En la mayoría de los casos, los eosinófilos se distinguen por su citoplasma cargado de granulaciones redondas y su tamaño pequeño, que en promedio varía entre 7 y 8 μm de diámetro. El núcleo del eosinófilo habitualmente está enmascarado por las granulaciones, y su cromatina por lo general condensada, se agrupa en la periferia del núcleo. El núcleo es lobulado, aunque presenta menos lóbulos que el del heterófilo. Los gránulos de los eosinófilos tienden a colorearse más intensamente en comparación con los gránulos de los heterófilos, y pueden variar en apariencia cuando se usa la tinción de Romanowsky (Campbell, 2015). Un número aumentado de estas células (eosinofilia) se asocia con infecciones parasitarias y lesión tisular por traumatismos.

Los basófilos son poco frecuentes en la sangre periférica aviar. Representan aproximadamente entre el 0 y el 2% del total de leucocitos en el pollo. Su tamaño es más pequeño que el del heterófilo, ya que su diámetro varía entre 7,5 y 9 μm . Entre las

especies, existe cierta variación en el tamaño, color, matiz y densidad de los gránulos. En algunos casos, todos o la mayoría de los gránulos citoplasmáticos pueden no colorearse. En estos casos, los basófilos exhiben vacuolas redondas y regulares en un citoplasma pálido con gránulos basófilos ocasionales (Clark *et al.*, 2009). Los basófilos aviares contienen gránulos profundamente metacromáticos que a menudo oscurecen el núcleo (Campbell, 2015). Las funciones exactas de los basófilos en aves no son bien conocidas, aunque su incremento se asocia con enfermedades crónicas y etapas tempranas de la inflamación (Barbeito *et al.*, 2014).

Los linfocitos en algunas especies de aves son los leucocitos que se encuentran en mayor cantidad; en otras, su número es menor que el de los heterófilos. Existen dos o tres tipos de linfocitos, tomando como criterio las diferencias de tamaño: pequeños, medianos y grandes. Los linfocitos pequeños predominan en la mayoría de las aves. El tamaño promedio de los linfocitos pequeños varía entre 7 y 8 μm de diámetro. Su forma es esférica o ligeramente irregular. La relación núcleo/citoplasma es variable dependiendo del tamaño del linfocito. El núcleo mide alrededor de 6,5 μm de diámetro. Es redondo y con abundante heterocromatina. Puede localizarse en el centro o estar levemente desplazado. El citoplasma es escaso en los linfocitos de pequeño tamaño y rodea al núcleo como un halo, mientras que en los linfocitos más grandes el citoplasma suele ser más abundante y forma una banda perinuclear más ancha. Es posible encontrar en el citoplasma pequeños gránulos basófilos que corresponden a complejos lisosomales. Los linfocitos pequeños tienen una morfología similar a los linfocitos medianos, con excepción del núcleo que, en la mayoría de las especies de aves, presenta un pleomorfismo considerable, con variaciones entre redondo, ovalado irregular o indentado (Barbeito *et al.*, 2014). Las características citoplásmicas son importantes cuando se diferencian los linfocitos pequeños de los trombocitos. Se observa linfocitosis (aumento del número de linfocitos) en el transcurso de algunas infecciones producidas por clamidias o virus (Barbeito *et al.*, 2014; Campbell, 2015).

Los monocitos son las células más grandes y su tamaño oscila, entre 11 y 16 μm en aves. El citoplasma es más abundante que el del linfocito y con las técnicas convencionales de tinción suele colorearse celeste grisáceo. La relación núcleo/citoplasma es mayor que en los linfocitos. El citoplasma suele variar en su estructura, en la mayoría de las células es de aspecto reticular o vacuolado,

especialmente en la región cercana al núcleo donde se encuentra una muesca o indentación. El núcleo suele estar ubicado excéntricamente y con frecuencia se observan núcleos con forma de riñón, redondos o bilobulados. Numerosos gránulos pequeños, irregulares y densos se encuentran distribuidos al azar por todo el citoplasma. Los monocitos son células móviles que pueden emigrar utilizando sus movimientos para diferenciarse en macrófagos y cumplir funciones que incluyen la fagocitosis y la secreción de numerosas sustancias que regulan la homeostasis tisular y la respuesta inmune. El aumento relativo o absoluto de los monocitos puede estar relacionado con infecciones o estrés crónico (Dieterien-Lievre, 1988; Barbeito *et al.*, 2014).

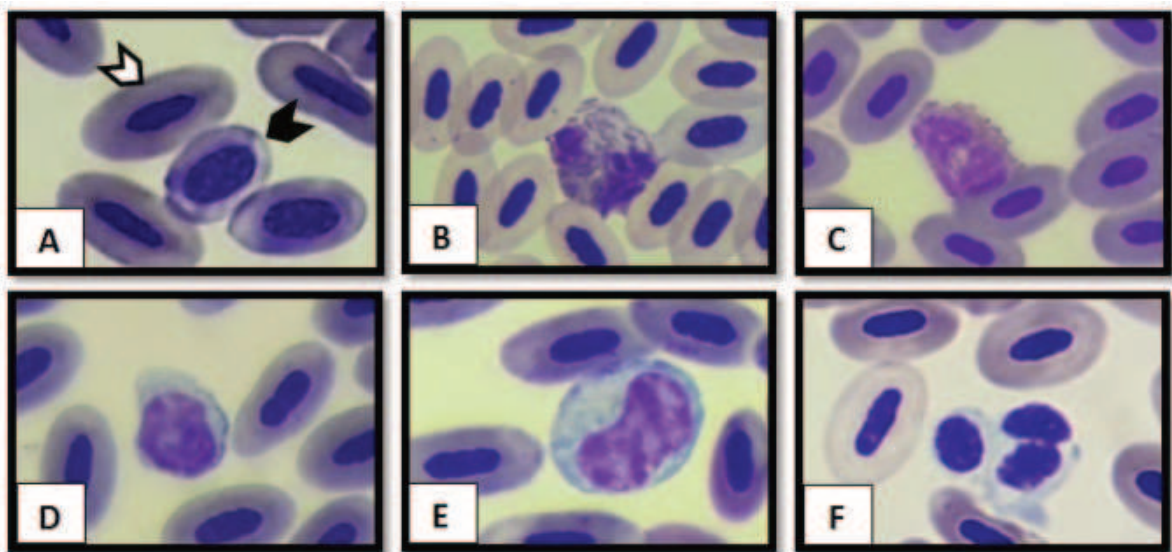


Figura 9. Células sanguíneas identificadas en aves silvestres. (A) Eritrocito Policromático (cabeza de flecha blanca) y Eritrocito Normocromático (cabeza de flecha negra); (B) Heterófilo; (C) Eosinófilo; (D) Linfocito; (E) Monocito; (F) Trombocitos.

Los trombocitos representan el equivalente a las plaquetas de los mamíferos. En las aves son células completas ya que presentan núcleo y organelas citoplásmicas. En los extendidos de sangre estas células suelen observarse en grupos formando masas. El tamaño de los trombocitos varía entre 7 a 10 μm en la gallina y presenta una forma típica oval o elíptica. El núcleo, también elíptico, presenta superficie irregular. El citoplasma, en los frotis coloreados con tinciones a base de Giemsa se observa de color azul pálido mate, aunque puede en algunos casos poseer un brillo más púrpura o ser incoloro. La apariencia del citoplasma es una característica importante que se usa para diferenciar los trombocitos de los linfocitos pequeños y maduros (Campbell, 2015).

Cumplen un rol activo en el control de la hemorragia frente a una lesión vascular constituyendo un elemento indispensable en la coagulación de sangre.

Las aves, en respuesta a factores de estrés aumentan la actividad del eje adrenal hipotálamo-hipófisis, dando lugar a concentraciones elevadas de glucocorticoides, lo que induce a su vez el aumento de la frecuencia de heterófilos, y disminución en los linfocitos, a esta circunstancia se la caracteriza como índice H/L elevado (van der Meer y van Oers, 2015). Los heterófilos son la primera resistencia natural contra infecciones bacterianas y otros agentes (Cīrule *et al.*, 2012), entonces este parámetro se correlaciona con los procesos de inmunosupresión, con bajas tasas de crecimiento y supervivencia, elevados niveles de glucocorticoides y estrés (Martínez Quintanilla *et al.*, 2017).

Colinesterasas plasmáticas como marcadores de exposición a OPs y CBs

Las colinesterasas (ChE) son un grupo de enzimas primordialmente responsables de la rápida eliminación de la acetilcolina en las terminales postsinápticas colinérgicas, a fin de producir la transmisión de un impulso nervioso preciso, temporal y controlado en el sistema nervioso central y periférico, y finalizar en la contracción muscular o secreción glandular. Han sido denominadas bajo el nombre de ChEs todas aquellas esterasas que presentan la capacidad de hidrolizar altas tasas de ésteres de colina de una forma acelerada, tan solo en centésimas de segundos (Trudeau y Sans Cartier, 2000).

Tal como fue mencionado en subtítulos anteriores, dado que las ChE son inhibidas específicamente por compuestos OPs y CBs, es que han sido utilizadas como marcadores bioquímicos de efecto y exposición a estos compuestos, y la valoración de su actividad ha resultado consistente ante casos de intoxicaciones agudas, sub agudas y letalidad para una amplia diversidad de organismos (Goldstein *et al.*, 1999; Strum *et al.*, 2010). Las aves en particular, presentan una alta sensibilidad a los compuestos OP y CBs, y la DL₅₀ suele ser entre 10 y 20 veces más bajas que para mamíferos, dado que las esterasas tienen una baja actividad en las aves (Brealey *et al.*, 1980; Kaneko *et al.*, 2008). Debido a esto, no es difícil alcanzar la inhibición del 50 al 70% de las colinesterasas plasmáticas o el 20% de las colinesterasas cerebrales, punto a partir del cual es probable la observación de signos de intoxicación aguda (Hill y Fleming, 1982; Mitra *et al.*, 2011).

Los vertebrados poseen una variedad de distintas formas moleculares para la enzima ChE. Trudeau y Sans Cartier (2000) exponen que existen 2 grandes grupos en virtud de la especificidad por un sustrato y la susceptibilidad a la inhibición. Es así que, por un lado, se referencia como acetilcolinesterasa (AChE), también conocida como colinesterasa verdadera, colinesterasa “tipo 1” o “específica”, a aquella forma que presenta alta preferencia por la hidrólisis del sustrato acetilcolina o acetiltiocolina, transformándolo en ácido acético y colina. Esta enzima puede estar presente en células nerviosas que están vinculadas a sinapsis colinérgicas, pero también pueden localizarse en una variedad de otras células neuronales y no nerviosas como glóbulos rojos, hígado y músculo, y en el caso particular de las aves se encuentran en el plasma y no en la membrana eritrocitaria como es descrito en mamíferos (Thompson *et al.*, 1991).

Por otro lado, se describe como butirilcolinesterasa (BChE), también conocida como pseudocolinesterasa colinesterasas plasmáticas, “tipo 2” o “no específica”, a aquella esterasa que presenta alta preferencia por la hidrólisis de butirilcolina o butiriltiocolina, degradándola en ácido butírico y colina. Sin embargo, esta enzima puede ejercer actividad sobre una variedad de ésteres de colina, entre ellos acetil, fenil y nitrofenilcolina (Thompson *et al.*, 1991). La BChE se encuentra ubicada principalmente en plasma, dado que es sintetizada en el hígado y secretada a la sangre, en donde su vida media se estima en aproximadamente 12 días (Santarpia *et al.*, 2013). La función exacta de esta enzima aún no es bien conocida, aunque presenta una importancia toxicológica al comportarse como uno de los principales mecanismos que salvaguardan el sistema de AChE del sistema nervioso ante la detoxificación e hidrólisis de compuestos anticolinesterásicos presentes en sangre (Legler y Kummerfeld, 2016). En aves, la medición de la actividad de BChE es el método más rápido, económico y confiable ante la sospecha de intoxicaciones con OPs o CBs.

Además de la acción catalítica y de detoxificación de estas enzimas, también se han descrito que ambas se encuentran involucradas en el desarrollo neuronal embrionario en animales, proliferación celular y en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas (Kutty, 1980; Robitzki *et al.*, 1997).

En estudios realizados en aves, también se ha tomado en cuenta un tercer tipo de esterasas no específicas, denominado carboxilesterasas, que además es susceptible de

ser inhibido por diversas sustancias y ha sido utilizado como marcador complementario ante la exposición a plaguicidas (Oropesa *et al.*, 2013; Nervaez *et al.*, 2016). Esta enzima también presenta inespecificidad por sustratos como la BChE.

La valoración de las colinesterasas como marcador puede ser realizada desde distintos puntos de vistas. Por un lado, es necesario destacar el tejido en donde será evaluada. En referencia al estudio con aves silvestres vivas, dadas ciertas razones éticas y de conservación, el uso de biomarcadores para investigar la exposición a contaminantes debe ser adecuado y adaptable a métodos no destructivos, poco invasivos y que permitan valorar efectos tóxicos de manera temprana (Oropesa *et al.*, 2013). Es por ello que la sangre es el tejido de principal elección para abordar estos análisis, que además de permitir la obtención de muestras por técnicas no letales, permite la valoración de un amplio conjunto de ChEs que actúan como primera barrera de respuesta en la exposición a insecticidas OF y CB (Fossi, 1994; Fildes *et al.*, 2006).

Por un lado, existen métodos aplicables en aves que permiten diferenciar las distintas formas de ChEs y su sensibilidad específica ante agentes anticolinesterásicos. Esta caracterización consiste en la utilización de sustratos diferentes y específicos, en conjunto con inhibidores selectivos para cada tipo de enzima (Nunes *et al.*, 2011). Como resultado, se permite obtener las tasas de acción de cada tipo de colinesterasa en plasma, aunque requiera de mayores costos, tiempo y complejidad en el instrumental de estudio (Oropesa *et al.*, 2017).

Por otro lado, la actividad de ChE puede ser medida mediante un método espectrofotométrico que permite asociar la tasa de hidrólisis de un sustrato específico con el viraje de color provocado por una sustancia cromógena en una matriz líquida (Ellman *et al.*, 1961). En las especies aviares, la actividad de ChE medida en cerebro responde en gran parte a la actividad generada por la AChE, a diferencia del plasma, en donde varias enzimas se encuentran involucradas y su proporción relativa puede variar en virtud de la especie. Entonces, este método no permite distinguir entre la actividad de las distintas ChEs plasmáticas, y la valoración es tomada como la acción conjunta de las enzimas AChE y BChE principalmente. Es por ello que ante la medición de la actividad de ChE en plasma es preferible la utilización de un sustrato que pueda ser igualmente hidrolizado por ambas enzimas, por ejemplo, la acetiltiocolina (Trudeau y San Cariter,

2000). En comparación con el método anterior, este resulta más económico, rápido, e igual de efectivo y útil como herramienta de análisis ante la interacción de aves con plaguicidas y contaminantes presentes en un ecosistema (Stuber *et al.*, 2018).

Existen factores ambientales que pueden provocar variaciones en los niveles de ChE encontrados (Tecles *et al.*, 2001), como así también, diferencias inter e intraespecíficas (Roy, 2005). A causa de esto, toma real importancia la determinación de valores e intervalos referenciales para cada una de las especies a analizar ante un escenario de no exposición evidente, tanto como en eventos de exposición comprobados, lo que evita una incorrecta traslación de datos entre especies y un mejor análisis del riesgo ante un evento de contaminación (Horowitz *et al.*, 2016; Quero *et al.*, 2019).

Efectos de embriotoxicidad y biomarcadores histopatológicos en pichones de aves

La embriotoxicidad es la capacidad que presenta una sustancia para producir efectos tóxicos en la progenie, con posibilidad de abarcar desde la fecundación hasta la finalización del período fetal. Los efectos pueden incluir defectos del nacimiento no hereditarios (teratogénesis), disfunciones, muerte prenatal, alteraciones del crecimiento y funciones posnatales alteradas (Hoffman, 2003).

Se ha planteado que los efectos tóxicos provocados en embriones en desarrollo en huevos de aves han surgido a partir de distintas vías de exposición. Una de ellas es la transferencia de compuestos químicos al huevo a partir de la exposición primaria de los padres, por ejemplo, en el caso de dioxinas y bifenilos policlorados (Mineau, 2005; Schoeters y Hoogenboom, 2006). Por otro lado, se plantea que puede existir una exposición directa del huevo al tóxico, dada por el contacto entre la cáscara y las plumas contaminadas de los padres durante la incubación, material del nido, o al recibir la aplicación directa del químico (Leighton, 1993). Los huevos de las aves son sensibles a la deposición externas de tóxicos en su superficie, y en ensayos que datan con más de 100 años de antigüedad se advirtió que la aplicación tópica de sustancias solventes sobre la cáscara, y otros químicos como la nicotina, fueron perjudiciales para los

pichones al interferir con el normal desarrollo embrionario (Hoffman y Albers, 1984). Desde este punto, han sido desarrolladas múltiples investigaciones, en aves y otras especies ovíparas, a fin de conocer los efectos mediante exposiciones directas sobre la cáscara de los huevos, a partir de diversos métodos como la topicación, inmersión o simulación de spray/ rociado con los contaminantes de interés, en ocasiones utilizando dosificaciones aplicadas realmente en el ambiente (Martin, 1990; Poletta *et al.*, 2011; López González *et al.*, 2017; Odetti *et al.*, 2020). También la inyección al interior del huevo es una práctica habitual para conocer los efectos embriotóxicos (Hoffman, 2003).

En referencia a los plaguicidas, en la mayoría de los casos, el momento de su fumigación se corresponde estrechamente con la temporada de nidificación de gran cantidad de especies aviares, y se considera que existe un potencial de exposición a través de las vías anteriormente descritas. Las especies de aves precociales, tales como las passeriformes, serían especialmente susceptibles a la aplicación externa sobre la cáscara del huevo (Martin, 1990). La especie, la dosis y el momento de la aplicación durante el desarrollo embrionario pueden tener particulares implicancias en el desarrollo del pichón según el contaminante (Hoffman y Albers, 1984; Burella *et al.*, 2016).

Los efectos tóxicos observados para plaguicidas han sido descriptos a diversos niveles y con implicancia de distintas estructuras y órganos. Por un lado, las tasas de supervivencia, mortalidad y éxito en la eclosión han sido tomadas como índices para valorar y proyectar el impacto de los contaminantes en poblaciones (Mineau, 2005; Gibbons *et al.*, 2015). Por otro lado, el fenómeno de adelgazamiento de la cáscara del huevo fue uno de los biomarcadores inicialmente usados que aún sigue vigente (Ratcliffe, 1970). Este biomarcador, junto con los cambios de coloración de la cáscara ha sido utilizado ante la exposición de insecticidas organoclorados y metales pesados, lo que ha permitido analizar las probabilidades de viabilidad de los huevos durante la incubación, dada su alta fragilidad (Holm *et al.*, 2006; Ceyca Contreras, 2015). La presencia y frecuencia de expresión de malformaciones anatómicas o teratogénesis en embriones ha sido otro marcador de utilidad, entre los que se han caracterizado para diversos insecticidas OPs y CBs, la presentación de bajo peso corporal al nacimiento, reducción en la osificación, alteración del eje de la columna vertebral y disminución del tamaño de vertebras, flexión digital, acortamiento de escápulas y humeros, anomalías en

los huesos del cráneo (parietales y frontal), entre otros (Martin, 1990; Taparia *et al.* 2014; Bhaskar *et al.*, 2016).

El contenido del huevo ha sido de utilidad para el estudio de contaminantes orgánicos. Las sustancias lipofílicas que son capaces de atravesar los poros de la cáscara e ingresar al medio interno del huevo, entre ellos muchos de los insecticidas actualmente usados en la agricultura, se acumulan en la yema y representan un factor de riesgo para las aves (Van Leeuwen *et al.*, 1990). A diferencia de los mamíferos, los organismos ovíparos expuestos a estos tóxicos durante su desarrollo embrionario son incapaces de metabolizar los productos para luego eliminarlos del huevo, por tanto, los efectos pueden verse potenciados (Fry, 1995). Ante estas situaciones, el hígado y el riñón cumplen funciones de detoxificación frente a diversos xenobióticos, pero los animales jóvenes, y en particular los embriones, serían más susceptibles a los efectos adversos dado el menor desarrollo y maduración, tanto de los tejidos, como de los procesos metabólicos y bioquímicos (Anwar y Shakoori, 2010). El estudio de estos dos órganos también puede aportar evidencia respecto a efectos de toxicidad.

La histopatología consiste en el examen microscópico de las células y los tejidos y la determinación cuali-cuantitativa de anomalías que pueden adoptar su estructura y organización ante un evento de lesión tisular (Peebua *et al.*, 2006; Costa y Costa, 2012). Poleksić *et al.* (2010) explican que las alteraciones histológicas en determinados órganos diana son biomarcadores sensibles a los efectos de exposición a xenobióticos y proporcionarían en muchas ocasiones, una mejor evaluación de los efectos de la contaminación antes que cualquier otro parámetro bioquímico. Por lo tanto, el análisis de las alteraciones histológicas en diferentes tejidos se ha utilizado ampliamente durante años como instrumento toxicológico para vigilar situaciones agudas y crónicas, y para proporcionar información adicional a los análisis fisicoquímicos, especialmente desarrollado en organismos acuáticos (Schwaiger *et al.*, 1997; Maurya *et al.*, 2019). La histología es un instrumento sensible para el diagnóstico de los efectos tóxicos directos e indirectos que afectan a los tejidos animales. Los métodos histológicos son relativamente laboriosos y requieren cierta experiencia, pero al fin y al cabo tienen la considerable ventaja de que las alteraciones patológicas en diferentes tejidos pueden observarse individualmente y permiten crear un vínculo directo con las funciones

fisiológicas como el crecimiento, la reproducción y la nutrición (Van der Oost *et al.*, 2003; Paithane *et al.*, 2012).

El hígado es un órgano de desintoxicación y es esencial para el metabolismo y la excreción de sustancias tóxicas (Van der Oost *et al.* 2003). También es uno de los principales órganos de interés en estudios toxicológicos debido al gran suministro de sangre que recibe, lo que causa una notable exposición a sustancias tóxicas. Además, se ha informado que el hígado es el órgano principal para la bioacumulación y, por lo tanto, se ha estudiado ampliamente en lo que respecta a los efectos tóxicos de diferentes xenobióticos (Yancheva, 2016). Es inapropiado describir al hígado de las aves considerando la organización lobulillar típica del hígado de los mamíferos, dado que en las aves la organización hepática es diferente. Sin embargo, sus células poseen funciones muy similares a la de los hepatocitos de los mamíferos e incluyen la producción de bilis, el almacenamiento de lípidos y glucógeno y la síntesis de proteínas plasmáticas.

Por otro lado, el riñón es el principal órgano involucrado en el mantenimiento de la homeostasis de los fluidos corporales. La morfología y la función del riñón se han modificado a través de la evolución para cumplir con diferentes requisitos fisiológicos de acuerdo a cada una de las clases de vertebrados. Los riñones actúan como ruta de excreción de productos de desecho que contienen nitrógeno, como el amoníaco y la creatinina y, desempeña una importante función relacionada con el equilibrio de los electrolitos, el agua y el mantenimiento de un entorno interno estable (Cengiz, 2006). Además, estos órganos se encargan de la eliminación de diversos metabolitos de xenobióticos a los que se encuentran potencialmente expuestos y susceptibles a la presentación de efectos adversos. Es de notarse la alta complejidad de la estructura histológica del riñón en comparación con la que presenta el hígado para su valoración.

A lo largo de este apartado, se ha podido observar solo una porción de la inmensa variedad de biomarcadores que permiten valorar los efectos tóxicos ante la exposición ambiental o experimental a sustancias químicas, en particular plaguicidas OF y CB. Los ecosistemas se encuentran ante una constante presión de los contaminantes antropogénicos. Existe una creciente necesidad de vigilarlos, lo que ha dado lugar a la exploración de aquellos organismos que puedan ser exitosos para el biomonitoreo, como así también la creciente variedad de biomarcadores que permitan su

compleja y completa valoración (Kapka-Skrzypczak *et al.*, 2011; Hamza-Chaffai, 2014). Los programas de biomonitorio probablemente produzcan poco a poco un aumento de la conciencia de las personas sobre la presencia de químicos en nuestra dieta, en nuestro ambiente y en nuestra vida cotidiana. Se puede esperar que la biomonitorización se convierta en el primer indicador de preocupación y ocupación de los riesgos ambientales, a los cuales nos enfrentamos los humanos y la biodiversidad en general (Paustenbach y Galbraith, 2006). En las últimas dos décadas un nuevo enfoque denominado “One Health” (Una Salud) ha direccionado las interpretaciones científicas y sociales respecto a la salud, donde se hace hincapié que los seres humanos, animales y el ambiente son inseparables. Cualquier alteración en alguno de los 3 componentes tendrá repercusiones para los otros 2, por lo que mantener el estado de equilibrio en esta triada es un trabajo diario que los seres humanos debemos promover para garantizar la salud y el bienestar de las generaciones futuras.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Sustentar el uso de aves silvestres en estudios ecotoxicológicos como bioindicadores de salud ambiental para la evaluación del efecto de insecticidas de uso masivo en agroecosistemas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar biomarcadores de efecto y de exposición en aves silvestres de 2 áreas de monte nativo, donde no se aplican plaguicidas agrícolas, y de áreas con actividad frutihortícola de Mendoza donde se aplican plaguicidas anticolinesterásicos.
- Evaluar efectos posibles de embriotoxicidad y teratogenicidad en huevos de codornices (*Coturnix coturnix*) topicados con el insecticida clorpirifos en ensayos experimentales en bioterio.
- Estudiar biomarcadores de efecto y de exposición en embriones de codornices obtenidos de huevos topicados con clorpirifos en ensayos concentración-respuesta.

HIPOTESIS

Los plaguicidas anticolinesterásicos promueven la expresión de biomarcadores de exposición y de efectos genotóxicos y embriotóxicos en aves silvestres, lo que las posiciona como potenciales bioindicadores de salud ambiental.

CAPÍTULO II

VALORACIÓN DE BIOMARCADORES EN AVES SILVESTRES DE ÁREAS NATURALES Y AGRÍCOLAS

INTRODUCCIÓN

En la obra “*Silent spring*” de Rachel Carson un verso reza: “[...] llega ahora la primavera sin ser anunciada, y los tempranos amaneceres están ahora extrañamente silenciosos allí donde antes se llenaban de la belleza del canto de las aves” (Carson, 2002). Rachel Carson era bióloga marina y mediante sus obras y reflexiones fue una de las referentes que inspiró las bases y lineamientos para la creación y fundación de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, 2016). Previo a la citada obra y en la que se plasman los eventos más representativos de esa época, existen antecedentes referidos al vasto uso de plaguicidas y su impacto sobre la avifauna, produciendo no solo la muerte de los animales, sino también su desplazamiento hacia otras regiones. Esto conlleva un empobrecimiento y desequilibrio de la biodiversidad del ecosistema. Dada la creciente actividad agrícola y la conversión del uso de los suelos desde pastizales y bosques naturales a sitios de cultivos, las aves se vieron forzadas a alimentarse y desplazarse hacia aquellas áreas que implican un riesgo para sus poblaciones (Iko *et al.*, 2003).

En los últimos 50 años se han desarrollado, principalmente en Europa y Norte América, varios programas de monitoreos de aves, tanto a escala local como continental, donde se las ha incluido en el análisis de contaminantes como indicadores ecológicos (Gómez-Ramírez *et al.*, 2014; Ahrestani *et al.*, 2017). Respecto de Sudamérica, el biomonitoreo de aves y contaminantes ha sido notoriamente más reducido y a escala local. Los grandes programas de monitoreo a escala internacional se han visto vinculados a aves migratorias y el uso de pesticidas. Uno de los eventos mundialmente conocidos refiere al de intoxicaciones y mortandad masivas de aguiluchos langosteros (*Buteo swainsoni*), alrededor de 20.000 ejemplares, a causa del consumo de alimentos contaminados con el insecticida monocrotofos (dimetil-(E)-1-

metil-2-(metilcarbamoil) vinil fosfato), lo que contribuyó a la implementación de diversos programas de monitoreo ecotoxicológicos y ecológicos en las aves afectadas (Zaccagnini, 2013). Este programa, obtuvo la participación de diversos países, entre ellos Argentina, Venezuela, México, Estados Unidos y Canadá, para aunar esfuerzos y concluir con acciones que permitieran la conservación de la especie y la reducción del uso del pesticida (Goldstein *et al.*, 1999). La importancia del monitoreo en aves ha tomado tal relevancia que en los últimos años se data de estudios implementados inclusive en avifauna de la Antártida, sitio donde también han llegado trazas de contaminantes ambientales, aunque conceptualmente era considerada como una de las regiones más prístinas frente a la ausencia de disturbios directos producidos por los humanos (Jerez *et al.*, 2013).

Se ha observado que los plaguicidas agrícolas han afectado al 87% de las especies de aves mundialmente amenazadas (BLI, 2008). Se considera que los OFs y CBs son algunos de los principales responsables de las reducciones en sus tamaños poblacionales (Stone, 1979). Se estimó que entre los años 1980 y 2000, se produjeron solo en Estados Unidos, 335 eventos de mortalidad que comprometieron a más de 9 mil aves a causa de insecticidas anticolinesterásicos (Fleischli *et al.*, 2004). Muchas especies han sufrido una disminución alarmante de su abundancia en agroecosistemas, debido en particular, a cambios en las prácticas y políticas de la producción agrícola (Chamberlain *et al.*, 2000). Se estima que las aves serían altamente sensibles a los efectos agudos de plaguicidas anticolinesterásicos, debido a su reducido nivel de enzimas desintoxicantes, lo que concluye muchas veces en la muerte del animal (Parker y Goldstein, 2000).

La interacción de los insecticidas clorpirifos y el carbosulfán con aves silvestres

Existe una amplia lista de antecedentes donde se vincula la fumigación de plaguicidas a campo con el detrimento de la avifauna accidentalmente expuesta, por lo que en el presente estudio se revisarán algunos aspectos de importancia sobre los dos insecticidas que nos competen.

Los insecticidas representan un elemento de potencial riesgo para la vida de las aves, debido al simple hecho de que las mismas se alimentan de semillas, frutos,

insectos y otras presas presentes en los cultivos fumigados, y se han observado efectos de la exposición a partir de dietas contaminadas con concentraciones ecológicamente relevantes en condiciones controladas (Moore *et al.*, 2014). La intoxicación secundaria dada la ingesta de alimento contaminado es un evento frecuente en la avifauna, tal como fue mencionado anteriormente. Las lombrices y gusanos son capaces de bioacumular estos pesticidas en sus organismos y alcanzan niveles similares a las concentraciones encontradas en el suelo posterior a su inmediata fumigación (Solomon *et al.*, 2001). El envenenamiento secundario fue comprobado por Hill y Mendenhall (1980) luego de observar signos en lechuzas del campanario (*Tyto alba*) alimentadas con codornices que fueron expuestas a OFs.

Basado en las características físicas y químicas, el CPF puede persistir entre 2 a 5 días en el follaje bajo condiciones de campo (Williams *et al.*, 2017), lo que supone una preocupación sobre la exposición aguda de las aves. Sin embargo, en las prácticas habituales, este pesticida puede aplicarse hasta 4 veces con intervalos de tiempo de hasta 10 días, por lo que la exposición crónica podría ser mucho más relevante (Moore *et al.*, 2014). De acuerdo con la especie, se han establecido diferentes DL₅₀ para este insecticida, comprendidas entre 5,6 mg/kg para el paseriforme zanate norteño (*Quicalus quiscula*), hasta los 145 mg/kg en el pato real (*Anas platy rhynchos*). Entre las especies más sensibles se encuentran la paloma doméstica (*Columba livia*) y la codorniz común (Richards, 2000).

Se ha visto que, el envenenamiento por CPF en aves puede ser detectado a partir de la asociación entre el evento de exposición y los niveles bioquímicos estimados por medición de la actividad de enzimas colinesterasas plasmáticas y cerebrales. Su reducción puede mantenerse al menos por 48 horas (Cairns *et al.*, 1991; Timchalk 2010).

Se han observado efectos variados y hasta discutidos respecto a la vinculación de las aves con el uso de CPF. Sin embargo, existen estudios que comprueban y determinan que este plaguicida ha sido capaz de ser incorporado y bioacumulado en diversos órganos, a partir del análisis de residuos en tejidos. Un ejemplo del poder de bioacumulación y persistencia se presenta en el estudio realizado por Alharbi *et al.* (2016), quienes lograron hallar niveles de CPF en patas de paseriformes pertenecientes a colecciones (estudios post-mortem), y que pertenecían a especies que mantienen rutas migratorias solapadas con áreas agrícolas que aplican históricamente este insecticida.

Otro ejemplo llamativo se centra en aves pelágicas, como petreles y albatros de la Patagonia Argentina, donde el CPF fue el contaminante orgánico persistente con mayores concentraciones encontradas en sus plumas (Quadri Adrogué *et al.*, 2019). Las vías de exposición a plaguicidas en las aves, presentadas de acuerdo a la secuencia natural de probabilidad de ingreso del tóxico al organismo son: mediante la ingesta de alimento contaminado, inhalación, acicalamiento, y contacto dérmico a través de los miembros posteriores con superficies.

A diferencia del CBF, el CSF como principio activo actuante no presenta estudios detallados sobre su efecto en aves. Se ha reportado que, la DL₅₀ estimada en virtud del grado de inhibición de actividad colinesterasa en aves es de 51 mg/kg, mientras que para CBF es de 1,65 mg/kg (Mineau *et al.*, 1993). Sin embargo, el metabolito más tóxico del CSF es el CBF y ha sido investigado en aves por su alto nivel de toxicidad demostrado. El CBF ha sido uno de los insecticidas que mayor impacto ha producido en la declinación de las poblaciones de diversas especies de aves, entre ellas Anseriformes, Paseriformes y Falconiformes, ya que fue el CB más frecuentemente encontrado en las carcasas de animales muertos a campo (Augspurger *et al.*, 1996; Fleischli *et al.*, 2004). Al parecer, las aves rapaces suelen ser uno de los grupos más afectados por los envenenamientos accidentales con este insecticida (Dietrich *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1996; Wobeser *et al.*, 2004; Otieno *et al.* 2010). Se han reportado intoxicaciones de rapaces y carroñeros en forma indirecta, debido a la ingesta de restos de animales que fueron envenenados hasta 6 meses previos al evento de la mortandad de aves, donde el CBF ha persistido en carnes y vísceras (Elliott *et al.*, 1997)

La dieta ha sido la principal ruta de exposición analizada tanto para las formulaciones líquidas como para las granuladas, aunque las vías inhalatorias y por contacto directo posterior a la pulverización, como así también el acicalamiento, podrían ser rutas subestimadas en la estimación de riesgos (Mineau *et al.*, 2011). Se ha descrito una extensa lista de signos por intoxicación aguda en ensayos de laboratorio con diversas especies de aves, donde se incluyen los signos generales ya mencionados para CB y OFs, además de diarreas, epistaxis, erección de plumas, polidipsia y convulsiones que preceden a una muerte por anoxia. Mineau *et al.*, (2011), mencionan que los hallazgos a campo de aves muertas presentan características que pueden diferenciar su correcto diagnóstico como, por ejemplo: los pastos cercanos a las carcasas suelen estar aplastados y las garras con tierra, típica evidencia de convulsiones,

los animales se encuentran en buen estado, el buche y la molleja suelen estar llenos de comida, y en ocasiones pueden encontrarse gránulos de este plaguicida, mientras que los pulmones suelen encontrarse húmedos y congestivos. Estos signos indicarían la velocidad y severidad de la intoxicación por CBF, donde algunos autores plantean tiempos de intoxicación por exposición dietaria entre los 9 a 18 minutos (Balcomb *et al.*, 1984).

Dada la frecuente casuística de intoxicaciones en aves por este CB es que, junto a otros pesticidas de la familia, entre ellos también el CSF, han sido prohibidos para su elaboración, uso y comercialización en varios países del mundo. Incluso en Argentina, esta resolución fue tomada por el Servicio Nacional de Calidad y Seguridad Agroalimentaria en el año 2018, posterior al evento de intoxicación masiva de cóndores andinos en la Patagonia - Res. SENASA 670/18 (Negri, 2018).

Los efectos agudos de OFs y CBs son bien conocidos para la vida silvestre, aunque no han sido descriptos acabadamente aquellos efectos de las exposiciones crónicas y subletales. Sin embargo, ciertas metodologías aceptables para valorar este tipo de exposición a largo plazo son aquellas que implementan biomarcadores de efecto y exposición y que evidencian cambios no visibles en los procesos de intoxicaciones agudas.

El destino ambiental de los OF y CB, la disponibilidad de éstos para la fauna silvestre y la toxicología en relación a los factores ambientales, son aspectos que promueven y motivan el desarrollo del presente estudio. Planteamos que los insecticidas CPF y CSF promueven la modificación de biomarcadores de exposición y de efecto en aquellas poblaciones de aves silvestres que se encuentran expuestas en ecosistemas agrícolas en comparación con aquellos que habitan ecosistemas naturales. La valoración de estos biomarcadores nos permitiría postular a ciertas especies autóctonas como potenciales centinelas de salud ambiental frente a la contaminación por plaguicidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción de los sitios de estudio

Para el presente estudio fueron seleccionadas 4 áreas de estudio ubicadas dentro de la región biogeográfica del Monte central en la provincia de Mendoza (Figura 10). Esta fitoregión es una de las más amplias de Argentina, se extiende a lo largo de 2.000 Km de norte (provincia de Jujuy) a sur del país (provincia de Chubut) (Karlin *et al.*, 2017). Ocupa aproximadamente 46 millones de hectáreas comprendidas entre los pies de los Andes y el océano Atlántico, compuestas por Bósques nativos caracterizados por la presencia de *Prosopis flexuosa* (Algarrobo) y *Larrea* spp. (Jarilla) como especies principales (Boshoven *et al.*, 2001). Este ecosistema se distingue por su clima árido, con altas y variadas tasas de evaporación y rangos de temperaturas, menores a 0 °C en invierno y mayores a 40 °C en verano. Las precipitaciones se encuentran en el rango de los 200 a 400 mm/año, concentradas la mayoría en verano (Abraham *et al.*, 2009).

Dos de los sitios escogidos para el presente estudio fueron áreas naturales protegidas a nivel provincial. Estas fueron tomadas como “sitios controles”, dado que, en su interior y alrededores próximos, no se efectúa la fumigación con plaguicidas agrícolas. Ha de considerarse que por reglamentación provincial se encuentran permitidas algunas actividades de explotación pecuaria dentro y/o en su periferia. Ambos sitios, se encuentran comprendidos entre las 6 reservas provinciales categorizadas como “Áreas de Importancia para la Conservación de las Aves” (AICAs), dada su relevancia para el hábitat, reproducción y migración de una amplia diversidad ornitológica (Di Giacomo y Abril, 2005).

La Reserva Natural y Cultural Bósques Telteca (RNT) fue declarada como tal por la Ley Provincial 5.061 en el año 1985 y actualmente cuenta con 38.507 ha. Se encuentra ubicada en el departamento de Lavalle (Figura 11-A). El objetivo primordial de la creación de la Reserva lo constituye la conservación de un relictos del bosque de algarrobo dulce (*Prosopis flexuosa*), que tiene interés genético, paisajístico, turístico, didáctico y antropológico. De acuerdo a la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) se la considera como Categoría V: Paisaje protegido. La Reserva cuenta con un puesto de guardaparques y un centro de interpretación. Dentro de la Reserva, hay alrededor de 35 puestos de pobladores con ascendencia Huarpe,

constituyéndose en una importante Reserva Cultural. Un área protegida donde la interacción de las personas y la naturaleza a lo largo del tiempo han producido una zona de carácter distintivo con un valor ecológico, biológico, cultural y paisajístico. Posee poca acción antrópica, entre ellas, la cría de ganado caprino en puestos ubicados en el interior y periferia de la misma.

La Reserva de Biosfera de Ñacuñán (RBÑ) fue declarada como tal a nivel internacional en 1986 por la UNESCO y actualmente cuenta con una extensión de 12.600 ha. Se encuentra ubicada en el departamento de Santa Rosa (Figura 11-B). El objetivo primordial de su creación ha sido la protección y conservación de la biodiversidad que forman los Bósques abiertos de algarrobos y chañares. De acuerdo a la UICN se la considera categoría Ia: Reserva natural estricta, por lo que en su interior se encuentra prohibida toda actividad humana, salvo actividades de investigación bajo estricto permiso ante la Dirección de Recursos Naturales Renovables de la Provincia de Mendoza. En su periferia, se encuentran puestos con actividad de cría de caprinos y bovinos. La reserva cuenta con un centro de guardaparques y una unidad experimental gestionada por el Centro Científico y Tecnológico de Mendoza-CONICET.

Otros dos sitios de estudio escogidos para el presente estudio consistieron en tierras destinadas a ser utilizadas como “fincas” o campos de actividad agrícola, con especial producción en fruticultura. Ambos campos implementaban estrategias tradicionales de manejo agrícola con la consecuente fumigación con plaguicidas. Estos sitios fueron tomados como áreas de exposición de las aves a insecticidas anticolinesterásicos. Los dos sitios agrícolas se encuentran incluidos dentro de los oasis productivos de la provincia de Mendoza, los cuales abarcan territorios también comprendidos dentro de la región biogeográfica del Monte central.

Una de las fincas frutícolas fue denominada como “Finca Maipú” (FM), dado el nombre de la localidad en donde se encuentra ubicada. Este sitio es parte del oasis productivo Norte de la provincia. Su actividad se centra en producción de frutales de carozo: duraznos, ciruelos, damascos y olivos caracterizan el cultivo distribuido a lo largo de las tierras que forman parte de la propiedad (Figura 11-C). Entre las estrategias agrícolas implementadas se destacan la fumigación con un amplio grupo de plaguicidas

que comprenden insecticidas, funguicidas y herbicidas. Cuatro días previos al muestreo se realizó la fumigación con el insecticida carbámico CSF.

Otra de las fincas frutícolas fue denominada como “Finca Santa Rosa” (FSR) dada la localidad donde se encuentra ubicada. Este sitio es parte del oasis productivo Este de la provincia. Su actividad se centra en el cultivo de vid, membrillos y duraznos que ocupan el total del área cultivada (Figura 11-D). Entre las estrategias agrícolas aplicadas se encuentra la utilización de una variedad de insecticidas y herbicidas. Nueve días previos al muestreo se realizó la fumigación del insecticida CPF.

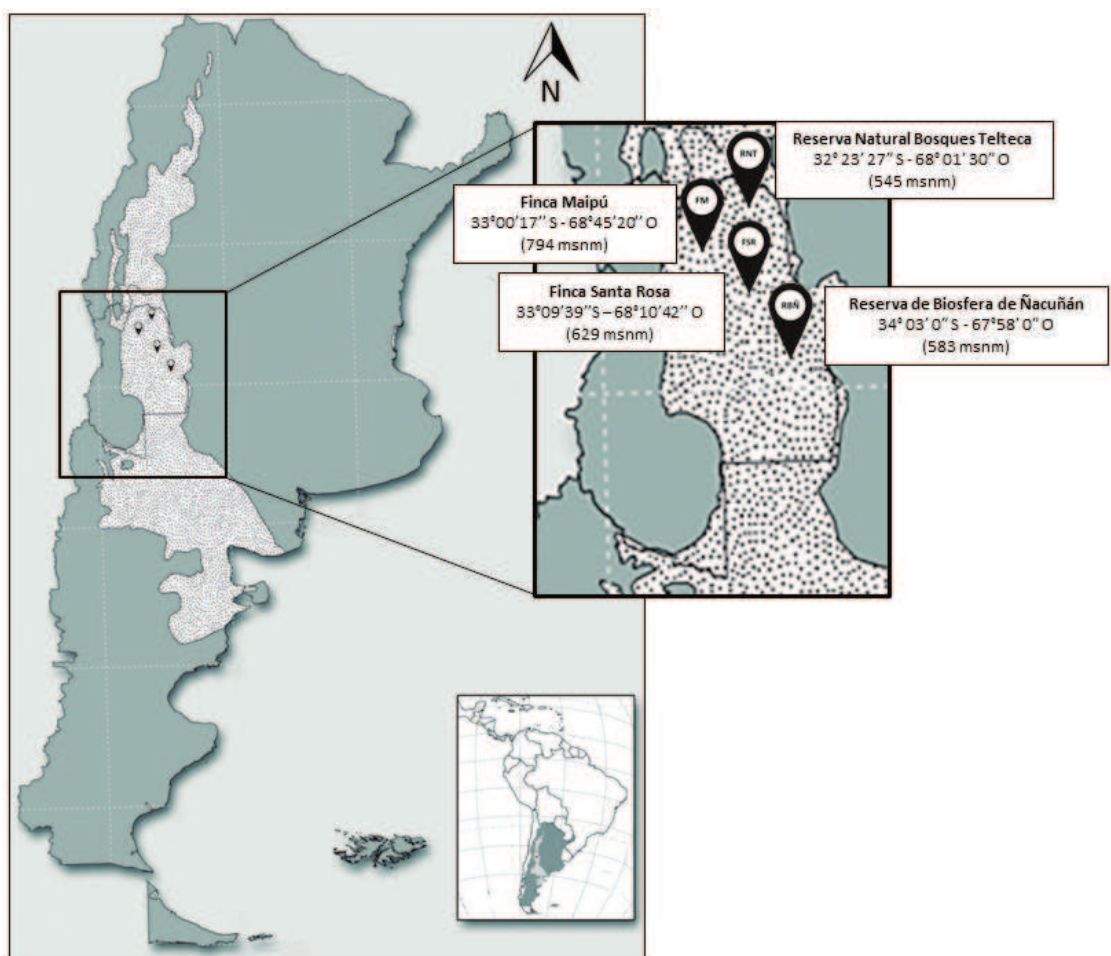


Figura 10. Extensión de la región biogeográfica del Desierto del Monte Central Argentino. Se detalla ubicación de las áreas naturales y agrícolas donde se tomaron muestras de sangre en aves en de la Provincia de Mendoza.

Cada sitio fue caracterizado mediante teledetección en virtud de su cubierta terrestre, que refleja de forma indirecta (refracción de la luz) y a través de una interpretación de polígonos y áreas, la distribución y el uso que se le asigna al suelo.

Para cada área de estudio, la descripción de la cubierta terrestre fue realizada en una extensión circular de 5 Km de diámetro alrededor del punto de muestreo donde fueron realizadas las capturas de aves silvestres. Esta superficie a analizar fue establecida en base al rango de vuelo o desplazamiento promedio descrito para *Passer domesticus* (gorrión común) como especie de referencia, estatus de “especie residente/no migrante” y presente en todos los sitios del estudio (Summer-Smith, 2003). La caracterización de cada sitio se realizó utilizando una imagen satelital Landsat 8 OLI/TIRS, procesada con los softwares QGIS versión 3.12.0, Earth Explore y Google Earth.

Captura, identificación y muestreo de aves silvestres

Los muestreos de aves silvestres fueron realizados durante el año 2017 en las áreas naturales protegidas, mientras que durante el año 2018 se realizaron en las fincas frutícolas. Los muestreos se llevaron a cabo entre los meses de octubre y diciembre, dado que durante la estación de primavera coinciden las épocas reproductivas y de nidificación de las aves silvestres, la reactivación de plagas que afectan a cultivos agrícolas y, la temporada de mayor uso de plaguicidas para la producción frutícola (Martin 1990; Boatman *et al.*, 2004). En el sitio agrícola Finca Maipú fue utilizada la fumigación con el insecticida carbosulfán 25% (Posse 25®) a dilución sugerida por el prospecto de 30 cm³/hl. La captura de aves se realizó entre los 7 a 9 días previo a la fumigación con CSF (FM-preCSF) y entre los 4 a 6 días posteriores a su uso (FM-postCSF). El sitio agrícola Finca Santa Rosa, fue fumigado con el insecticida clorpirifos 48% (Lorsban 48®) a concentración sugerida por prospecto de 120 ml/ hl. El muestreo de aves se realizó entre los días 9 a 12 posterior a su implementación (FSR-postCPF). En ambos sitios, la aplicación fue realizada mediante máquinas atomizadoras hidroneumáticas con turbina durante horas de la madrugada en ausencia de precipitaciones y viento. Los datos de la fumigación, principio activo, concentración y método utilizados, fueron recabados a partir del diálogo directo con el personal de cada finca bajo estudio.

En cada sitio, la captura de aves fue realizada mediante el uso de 4 redes de niebla (tamaño: 12 m x 3 m- diámetro de malla: 34 mm) que se mantuvieron abiertas al menos durante 12 h/ día promedio, iniciando a las 6 am y fueron revisadas cada 10 a 15

minutos (Figura 11). Cada ave capturada fue extraída de la red utilizando el procedimiento sistematizado y adaptado por Ralph *et al.* (1996). Los ejemplares fueron mantenidos individualmente en bolsas de tela hasta el momento de la toma de muestra. La mesada de muestreo a campo fue instalada en cada sitio de estudio al resguardo del sol directo, potenciales predadores y sonidos fuertes que pudiesen alterar los animales. La permanencia de cada ejemplar en la red y su manipulación no superó un tiempo total de 30 min.

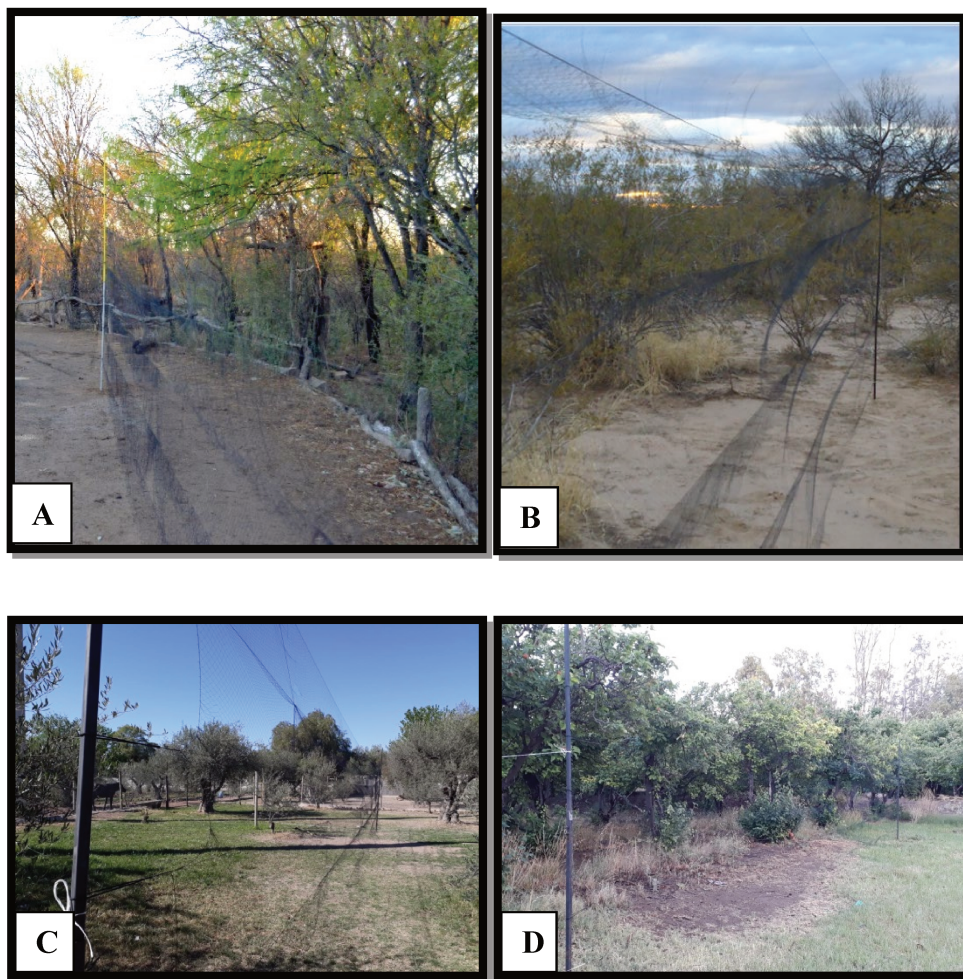


Figura 11. Imágenes que refieren al ambiente típico o predominante de cada sitio de muestreo. (A) Red de niebla instalada frente a vegetación compuesta por árboles de chañar y algarrobo en la Reserva Natural Bósques Telteca; (B) Red de niebla instalada en arbustal compuesto principalmente por jarilla en la Reserva de Biosfera de Ñacuñán; (C) Red de niebla instalada entre hileras de olivos en Finca Maipú; (D) Red de niebla instalada frente a un membrillar en Finca Santa Rosa.

Todas las aves fueron identificadas a campo y en primera instancia siguiendo la guía de identificación elaborada por Narosky *et al.* (2010), y luego su taxonomía fue confirmada siguiendo las especificaciones de la *South American Classification*

Committee (SACC) de la American Ornithologists' Union (Remsen, 2015). En aquellas especies que presentaban dimorfismo sexual externo, fue posible la distinción entre machos y hembras. La diferenciación entre ejemplares adultos y juveniles fue realizada mediante la identificación y visualización de la comisura labial presente en estos últimos. Los ejemplares fueron marcados en una de sus patas mediante la colocación de un anillo metálico con código alfanumérico.

A cada ejemplar capturado, se le extrajo sangre siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Se extrae el ejemplar de la bolsa. Con el individuo sujetado se procede a extender una de sus alas. Por el lado interno, próximo a la zona de la axila, se procede a separar las plumas con un hisopo embebido en vaselina, a fin de despejar y visualizar la vena braquial.
2. Con algodón embebido en alcohol étílico se desinfecta la zona a punzar. Esto también permite que la vena se ingurgite.
3. Con aguja 25G/ 30G en ángulo de 90° se realiza una punción sobre la vena.
4. Mediante un capilar heparinizado, se recolectan las gotas de sangre que emanen de la punción (Figura 12). El volumen extraído de sangre fue en todos los casos inferior o igual al 1% del peso del animal (Fair *et al.*, 2010). El volumen promedio de muestra a obtener en passeriformes es de aproximadamente el representado por 2 capilares.
5. Se tapa un extremo del capilar con plastilina, se rotula según código alfanumérico de anillo y son transportados y mantenidos hasta su procesamiento envueltos en papel absorbente dentro de heladeras de telgopor con refrigerantes. El procesamiento de los capilares fue realizado, en todos los casos, dentro de las siguientes 12h.
6. Con algodón embebido con yodo povidona se vuelve a desinfectar la zona de la punción y se realiza hemostasia mediante una leve presión.
7. Se administra a cada ejemplar, con gotero, unas gotas de agua azucarada sobre una de las fosas nasales y posteriormente se procede a su liberación en el mismo sitio donde fue capturado.



Figura 12. Técnica de recolección de sangre por punción de vena braquial en ejemplar de gorrión común (*Passer domesticus*).

Análisis hematológico

Para el análisis hematológico se utilizó al menos 1 capilar de los obtenidos en la toma de muestra. Es necesario considerar, que los procedimientos hematológicos fueron realizados en su mayoría en un laboratorio montado a campo, dado que debía priorizarse la viabilidad de las muestras. Aquellos pasos que permitieron mantener la muestra en estado de conservación, por ejemplo, los referidos a los frotis sanguíneos luego de su fijación, fueron procesados en el Laboratorio de Genética, Ambiente y Reproducción (GenAR) perteneciente a la Universidad Juan Agustín Maza.

Para cada individuo se realizó el siguiente procedimiento:

- Extracción de la muestra de sangre desde el capilar: inmediatamente obtenida la muestra de sangre de uno de los capilares, se remueve la plastilina que taponaba uno de los extremos. El volumen de sangre contenido en el interior se descarga en un tubo eppendorf de 0,5ml haciendo propulsión con una micropipeta con tip por uno de los extremos del capilar.
- Confección de frotis sanguíneo (2 por individuo):
 1. Se toman 2 μ l de sangre entera con micropipeta y se deposita sobre uno de los extremos del portaobjetos completamente limpio.
 2. Se mantiene el portaobjetos en posición horizontal. Se escoge otro portaobjetos con el fin de ser utilizado como extensor, el cual debe tener el filo de sus bordes completamente liso y limpio. Esto último se corrobora pasando la uña sobre el

borde extensor en búsqueda de grietas o fisuras. Se ubica el borde del extensor en ángulo de 45° por delante de la gota de sangre. Con un movimiento hacia atrás, se toma contacto con la gota de sangre, la cual por capilaridad se extiende a lo ancho del extensor. Con un movimiento rápido y constante se extiende la gota a lo largo de la superficie del portaobjetos y se obtiene una distribución de la muestra en monocapa.

3. Se deja secar al aire.
 4. Antes de transcurridas las 24 h cada muestra se fija con metanol absoluto por 1 - 5 minutos.
 5. Se conserva en estuche cerrado, oscuro, a temperatura ambiente o refrigerado.
 6. Cada muestra es coloreada con la tinción rápida tipo Romanowsky COLORFAST (Biopur®):
 - a. 30'' de inmersión en eosina ácida (colorante A)
 - b. Lavado por inmersión en agua bidestilada
 - c. 15'' de inmersión en azul de metileno (Colorante B)
 - d. Lavado mediante flujo con agua bidestilada
 - e. Dejar secar
- Hematocrito: Al menos 1 capilar por individuo muestreado fue centrifugado durante 5 min a 10.000 rpm para separar los glóbulos rojos del plasma. El hematocrito se obtuvo a partir de la lectura realizada con ábaco de hematocrito (Gelec®) (Figura 13- A y B). Todos los capilares centrifugados fueron partidos en el límite de ambas fases y el contenido de plasma fue trasvasado a tubos eppendorf e inmediatamente conservados a -4°C en los sitios de muestreos. Se contaba con sistema de refrigeración tanto en las centrales de guardaparque de las áreas naturales, como en las casas particulares de los propietarios de las fincas. Una vez en laboratorio, las muestras de plasma, rotuladas, fueron conservadas en ultrafreezer a -80°C hasta realizarse la medición de la actividad ChE.
 - Recuento total de glóbulos rojos (Lucas y Jamroz, 1961):
 1. Se diluye la muestra (1:50): Tomar 2 µl de sangre con la micropipeta y 98 µl de solución diluyente/colorante (Rees Ecker) en tubo eppendorf de 0,5 ml. Mezclar con Vortex.

2. Se diluye la muestra (1:500): Extraer 50 μl de la solución anterior y adicionarle 50 μl de diluyente/colorante Rees Ecker. Mezclar con vórtex
 3. Se toman 10 μl de la solución con micropipeta y se carga uno de los lados de la cámara de Neubauer modificada hasta saturar. Dejar reposar por 5 minutos con cámara montada en microscopio óptico.
 4. Conteo de eritrocitos: Sobre el cuadrado primario central se cuentan todos los eritrocitos que ocupan 5 cuadrados secundarios (los 4 vértices y el central) a un aumento de 400X (Figura 13-C).
 5. Registrar la cantidad de glóbulos rojos por cuadrante contado y sumar el total
 6. Calcular el recuento total de eritrocitos (RTE): $Cel./\mu l = n^{\circ} \text{ total eritrocitos} * 5000$
- Recuento total de leucocitos (Aroch *et al.*, 2013):
 1. Reconstituir una solución de eosina bufferada COLORFAST (Biopur®): en agua destilada en proporciones 1:10.
 2. Se diluye la muestra (1:100): En tubo eppendorf de 1,5ml, agregar 990 μl de la solución de eosina y 10 μl de sangre entera. Mezclar mediante agitación suave con micropipeta
 3. Esperar 15 min a que la tinción coloree los heterófilos (H) y eosinófilos (E).
 4. Se carga uno de los lados de la cámara de Neubauer modificada con muestra diluida hasta saturación.
 5. Se deja reposar 5 min con hemocitómetro montado en microscopio óptico.
 6. Con el condensador cerrado, se cuentan todas las células refringentes en los 9 cuadrantes totales de la cámara de Neubauer a un aumento de 100X (Figura 13-D).
 7. A partir de la siguiente fórmula, se calcula el número total de H y E (NTHE).

$$NTHE (cel/\mu l) = 100 * (n^{\circ} \text{ total de cel. anaranjadas en cámara de Neubauer} * 1.1)$$
 8. Se colorea un extendido con tinción tipo Romanowky (COLORFAST- Biopur®)
 9. Se realiza el conteo diferencial de leucocitos por discriminación de su morfología en un total de 100 glóbulos blancos sobre el frotis, a un aumento de 1000X bajo aceite de inmersión.

10. Se realiza el cálculo total de leucocitos (CTL) mediante la siguiente formula:

$$CTL \text{ (cel}/\mu\text{l)} = NTHE / (\%heterófilos + \%eosinófilos) * 100$$

11. Por regla de tres simple se realiza el recuento del número relativo de cada línea leucocitaria utilizando el porcentaje relativo de leucocitos y el CTL.

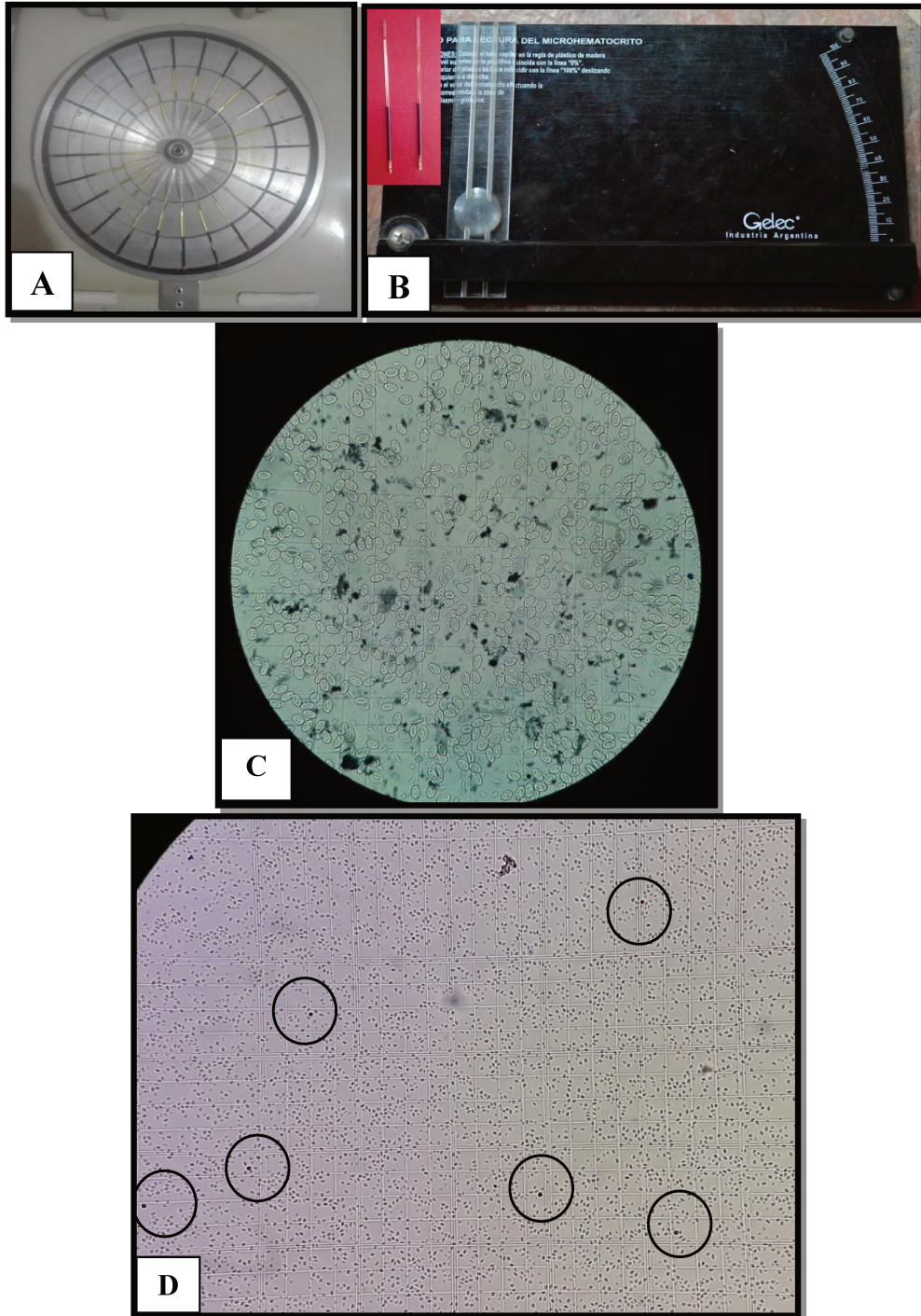


Figura 13. Análisis hematológico. (A) Microcentrifuga de capilares. (B) Ábaco para medición de hematocrito. (C) Recuento eritrocitario en hemocitómetro. Las figuras ovaladas refringentes refieren a hematíes (Aumento 400x). (D) Recuento leucocitario en hemocitómetro (Aumento 100x). Los puntos refringentes oscuros señalados en círculos refieren a heterófilos y eosinófilos.

Análisis de genotoxicidad: Ensayo de Micronúcleos - Citoma en eritrocitos

Para el análisis de MN-Citoma se utilizaron los frotis sanguíneos coloreados con tinción tipo Romanowsky implementados en el recuento diferencial de leucocitos. Se analizaron por microscopía óptica, a un aumento de 1000X bajo aceite de inmersión, un total 10.000 eritrocitos maduros por individuo. Las regiones donde se focalizó el conteo fueron la cabeza o la cola del frotis, dependiendo donde se encontraba la mejor calidad de la disposición del monocapa celular y, siguiendo un recorrido en “guarda griega” a fin de evitar el conteo repetido de una misma célula. El resultado se expresa como frecuencia de cada alteración nuclear/1000 eritrocitos.

Los criterios de inclusión que debieron presentar las células aptas para ser incluidas en el análisis fueron:

1. Citoplasma intacto y plano.
2. Ausencia o poca superposición con células adyacentes.
3. Ausencia de detritus intracitoplasmático.
4. Núcleo intacto, con perímetro suave y distintivo.
5. Coloración homogénea de todas las células analizadas y sus núcleos (Figura 14- A).

Los criterios de identificación de las distintas alteraciones nucleares deben tener las siguientes características según el tipo de alteración hallada (Carrasco *et al.*, 1990; Tolbert *et al.*, 1992; Kursá y Bezrukov, 2008; Clark *et al.*, 2009; Thomas y Fenech, 2011):

- Micronúcleos (MN) (Figura 14- B):
 1. Estructura redondeada u oval con perímetro liso, sugestivo de membrana.
 2. Tamaño entre 1/3 a 1/16 del núcleo principal, de manera tal que pueda distinguirse color y forma redondeada.
 3. Intensidad de coloración similar a la del núcleo principal.
 4. Textura similar a la del núcleo principal.
 5. Mismo plano focal que el núcleo principal.
 6. Ausencia de puentes de cromatina o de solapamiento con el núcleo principal.

Las células que cumplen con todos los criterios son consideradas positivas “con alta certeza”. Aquellas que no cumplan con algunos de los criterios 4, 5 o 6, fueron

consideradas positivas de “certeza intermedia”. Ambas consideraciones permiten distinguir como “positivas” aquellas células que presentan estructuras sugestivas de MN durante el análisis celular al microscopio óptico.

- Células Binucleadas (Bin) (Figura 14- C):
 1. Células que tienen 2 núcleos principales del mismo tamaño.
 2. Ambos núcleos pueden estar separados por una luz o en contacto entre sí.
 3. Ambos núcleos presentan la misma morfología e intensidad de coloración.
- Yema o brote nuclear (Y) (Figura 14- D):
 1. Aparente constricción aguda en un extremo del núcleo, sugerente de un proceso de gemación.
 2. El brote nuclear y el núcleo deben estar muy cercanos y unidos entre sí.
 3. El brote nuclear y el núcleo principal deben tener las mismas propiedades de coloración y textura.
 4. El brote nuclear puede tener un diámetro variable entre $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ del núcleo principal.
- Puente nucleoplásmico (Pn) (Figura 14- E):
 1. Dos núcleos de igual o diferente tamaño, unidos por un hilo estrecho de cromatina.
 2. Coloración similar entre los núcleos y el hilo de unión.
- Colas nucleares (Cn) (Figura 14- F):
 1. Caracterizadas por la reducción, estrechamiento y alargamiento de uno de los bordes del núcleo celular.
- Hendidura Nuclear (Hn) (Figura 14- G):
 1. Invaginación definida de la membrana nuclear con ancho uniforme y extensión hasta una profundidad fácilmente apreciable.
- Célula anucleada o eritroplástido (E) (Figura 14- H): Célula con ausencia total de núcleo y/o material genético visible.
- Núcleo periférico (Per) (Figura 14- I, J): Presencia del núcleo celular fuera del eje central de la célula o con su eje longitudinal rotado

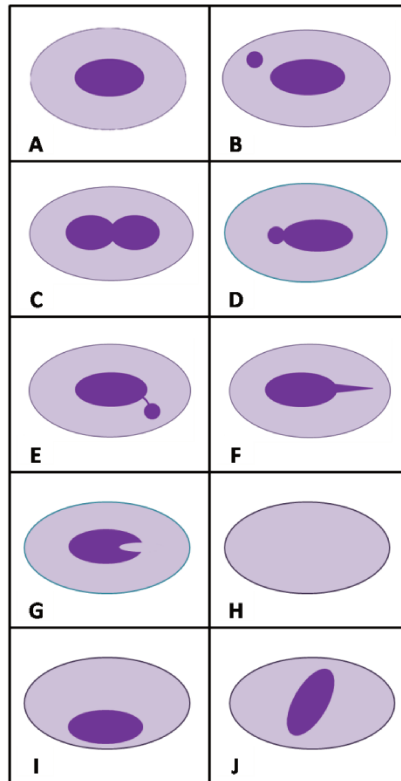


Figura 14. Representación esquemática de eritrocitos normales y con potenciales alteraciones nucleares reconocidas en el ensayo Micronúcleos- Citoma. (A) Eritrocito con morfología normal. (B) Eritrocito con Micronúcleo. (C) Eritrocito Binucleado. (D) Eritrocito con yema o brote nuclear. (E) Eritrocito con puente nucleoplásmico. (F) Eritrocito con cola nuclear. (G) Eritrocito con hendidura nuclear. (H) Eritroplástido. (I – J) Eritrocito con núcleos periféricos.

Análisis de la actividad de colinesterasas plasmáticas

El análisis de las colinesterasas plasmáticas fue realizado en base al método colorimétrico establecido por Ellman *et al.* (1961) y se aplicaron las adaptaciones para estimaciones realizadas en aves por Trudeau y Sans Cartier (2000):

1. Encendido del espectrofotómetro (Varian Cary Ultraviolet-visible; Agilent®) 1 hora antes de la realización de mediciones.
2. Calibración del espectrofotómetro:
 - Modo: Kinetic
 - Accesorio control de temperatura: 25°C
 - Circulación de agua por bomba automática
 - Lectura: a 405 nm
 - Tiempos de realización de las lecturas: 0 seg, 30 seg, 60 seg, 90 seg.

3. Descongelamiento de muestras de plasma: Las muestras de plasmas fueron trasladadas desde ultrafreezer (-80°C) a heladera (4°C) al momento de la realización del análisis. Las muestras fueron extraídas de heladera en el momento inmediato de la realización del procedimiento.
4. Análisis:
 - 4.1 Colocar cubeta limpia en espectrofotómetro
 - 4.2 Patrón negativo 1 (Blanco de muestra): Se realiza lectura espectrofotométrica para evaluar la reacción entre el cromóforo y el glutatión presente en la muestra (actividad no enzimática).
 - 4.3 Patrón negativo 2 (Blanco de reactivo): Se realiza lectura para evaluar hidrólisis no enzimática del sustrato en presencia del cromóforo.
 - 4.4 Se realiza el lavado de la cubeta utilizada con 3 o más enjuagues con agua destilada.
 - 4.5 Colocar cubeta limpia y seca en el espectrofotómetro.
 - 4.6 Se incorpora 1,5 ml de ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) como solución cromógena (concentración: $2,5 \times 10^{-4}M$ / pH: 7.4; Sigma-Aldrich).
 - 4.7 Se incorpora 50 μ l de yoduro de acetiltiocolina como sustrato (concentración: 0,156 M / pH: 7.4; Sigma-Aldrich®). Se deja incubar durante 1,5 min a fin de alcanzar una temperatura estable de 25°C.
 - 4.8 Lectura cero iniciales.
 - 4.9 Se incorpora 10 μ l de muestra de plasma.
 - 4.10 Homogeneizar durante 30 seg.
 - 4.11 Inicio de lectura a 405nm. Las lecturas se realizan automáticamente en 4 tiempos: 0'', 30'', 60'' y 90''. La incorporación de la muestra de plasma que contiene enzimas ChE provoca la hidrólisis del sustrato en ácido acético y tiocolina. El ácido acético reacciona con el cromógeno DTNB provocando un viraje de coloración transparente a tonos amarillentos, lo cual determina las variaciones en las absorbancias (Figura 15).
 - 4.12 Se registran las absorbancias para los 4 tiempos establecidos. Se determinan las diferencias entre las absorbancias del momento anterior e inmediatamente posterior y se promedian los valores obtenidos ($\Delta A/30\text{seg}$).

4.13 Para el cálculo de la actividad enzimática se emplea la siguiente fórmula:

$\bar{X} \Delta Abs * 11470$. El valor final de actividad ChE se expresa en UI/L ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$).

5. Para validar la linealidad del método: Se utilizó una muestra (20 μl) de plasma de un individuo de la especie *Molothrus bonariensis* procedente de la Reserva de Biosfera de Ñacuñán. Fue escogida esta muestra dado que el volumen obtenido permitió realizar las determinaciones por triplicado. A partir de esta muestra (100%) se realizaron cuatro diluciones al 50,00%; 25,00%; 12,50% y 6,25%, empleando solución isotónica de cloruro de sodio. Se obtuvo el valor medio \pm desvío estándar (DE) por dilución y el coeficiente de variación.



Figura 15. Cubeta de espectrofotómetro. Producto generado como resultado de la reacción del ácido acético obtenido por desdoblamiento de acetiltiocolina con el cromógeno ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico.

Análisis estadístico

En base a cada mapa de los sitios de muestreo, se obtuvieron los porcentajes de extensión de cada categoría de uso del suelo.

Para cada parámetro hematológico, biomarcador citogenético y actividad ChE plasmática, se obtuvieron los valores medio y sus respectivos valores de error estándar, respecto a la media por cada especie de cada uno de los sitios muestreados. A partir de la aplicación del test de Kolmogórov-Smirnov y de acuerdo con la distribución no paramétrica de los datos, se aplicó el test de Kruskal-Wallis para valorar diferencias

estadísticas ($p \leq 0,05$). Las comparaciones mediante ANOVA fueron realizadas sólo en las especies que se encuentran presentes en todos los sitios estudiados y con $n > 3$ individuos. Se realizaron comparaciones múltiples y de a pares (Mann-Whitney) entre todos los sitios de estudios, incluyendo en tal análisis ambas áreas naturales protegidas y las fincas agrícolas post aplicación de sus respectivos insecticidas. También fueron comparadas las medias entre los dos momentos muestreados en Finca Maipú: pre y post aplicación de CSF.

A los resultados obtenidos en el ensayo MN-Citoma, se le aplicó el análisis de componentes principales con el fin de determinar una potencial asociación entre las frecuencias de cada alteración nuclear observada y su presentación en los sitios estudiados, sin y con aplicación de plaguicidas anticolinesterásicos.

Consideraciones éticas

Los muestreos se realizaron previa autorización de la Secretaría de Fauna perteneciente a la Dirección de Recursos Naturales Renovables de la Provincia de Mendoza (Resolución N°1170). La metodología empleada se llevó siempre en presencia de un veterinario y ha sido evaluada y aprobada por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, Investigación y Docencia (CICUALID- UMaza) (Protocolo N°119/ Año: 2016).

RESULTADOS

En cada mapa satelital y de acuerdo con el área estudiada fue caracterizado en promedio una superficie de suelo que abarca un total de 1950 ha. De acuerdo a lo analizado en cada sitio se pudieron identificar 4 tipos de componentes o coberturas: cubierta vegetal que corresponde a monte nativo, cubierta vegetal que corresponde a cultivos agrícolas, suelo desnudo o sin cubierta vegetal y suelo con cobertura urbanizada (superficie sin vegetación y con estructuras de asentamientos humanos). Es posible observar que en ambas áreas protegidas sólo se encuentran presentes las coberturas que refieren a bosque nativo y suelo desnudo, propio de la ecorregión del Desierto del Monte Central (Figura 16- A y B). Por otro lado, en los sitios agrícolas se encuentran presentes los 4 tipos de coberturas, y existe un aumento del porcentaje de componente urbano en virtud de una reducción del componente de cobertura vegetal referida al monte nativo (Figura 16- C y D).

En las áreas presentadas pudieron ser capturados y muestreados un total de 297 aves silvestres, perteneciente a 37 especies diferentes (Tabla 1). La mayoría de las especies se agrupan dentro de la familia taxonómica de los passeriformes. Es necesario tener en consideración que, dado el volumen o calidad de conservación de cada muestra, no pudieron ser desarrollados la totalidad de los análisis y la valoración de los biomarcadores en absolutamente todos los individuos. Por ello, de acuerdo al biomarcador estudiado, se reporta para cada especie el número de individuos que permitieron aplicar el análisis preestablecido.

En la Reserva de Biosfera de Ñacuñán se lograron muestrear un total de 98 ejemplares pertenecientes a 19 especies diferentes. En la Reserva Natural Bósques Telteca se lograron muestrear un total de 88 individuos pertenecientes a 17 especies diferentes.

En finca Santa Rosa se logró muestrear un total de 43 individuos pertenecientes a 14 especies distintas. En el caso de Finca Maipú, previo a la aplicación de plaguicidas se pudieron muestrear un total de 41 individuos pertenecientes a 7 especies diferentes. En el segundo muestreo, posterior a la aplicación de CSF, se pudieron muestrear un total de 27 individuos pertenecientes a 7 especies diferentes.

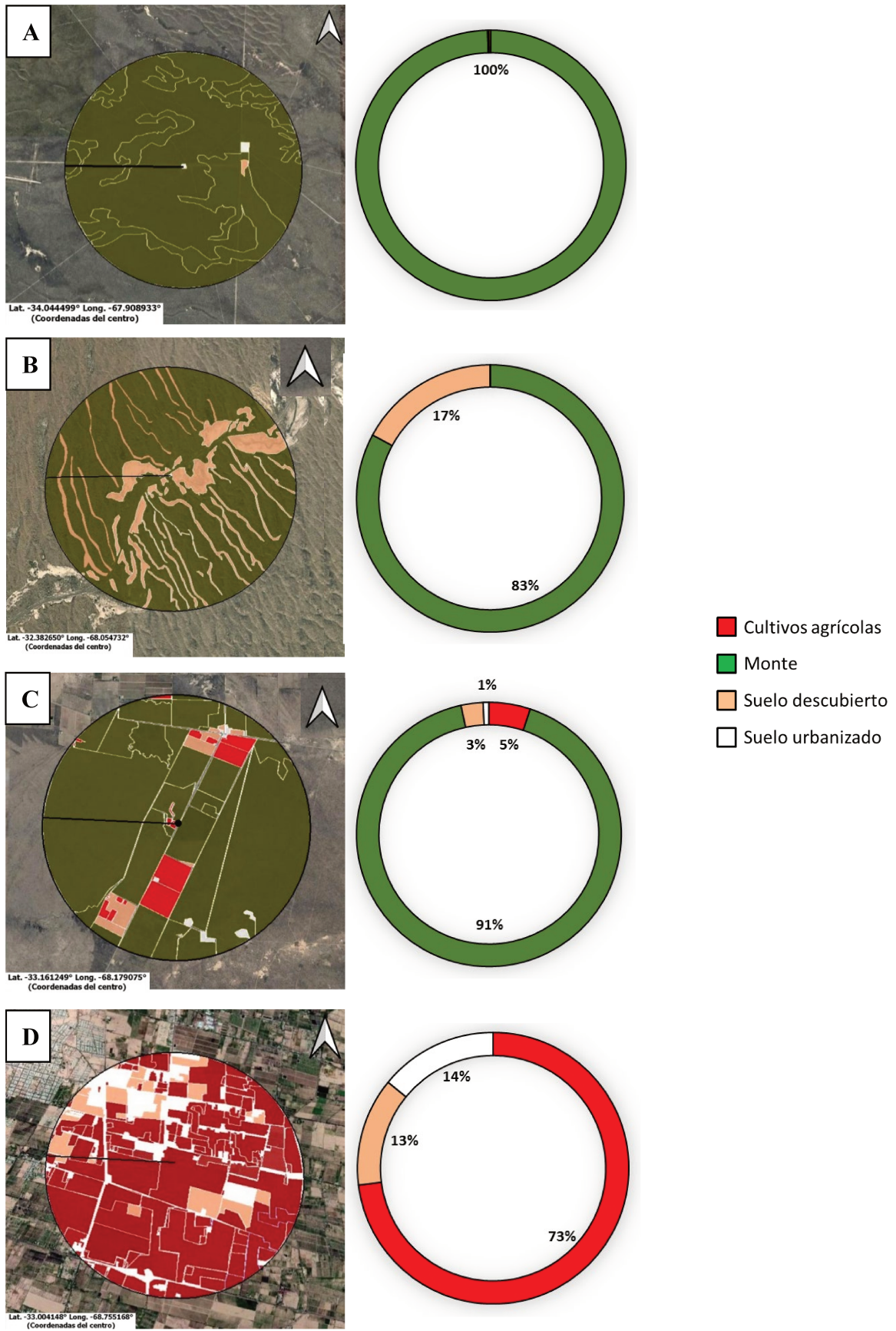


Figura 16. Caracterización sobre superficie de 5 km de diámetro mediante mapa de polígonos y proporción de la cobertura terrestre en áreas naturales y agrícolas del desierto del Monte,

Argentina. (A) Área natural Reserva de Biosfera de Ñacuñán; (B) Área natural Reserva Natural Bósques Telteca; (C) Área agrícola Finca Santa Rosa; (D) Área agrícola Finca Maipú.

Passer domesticus (gorrión doméstico) y *Columbina picui* (torcacita común) fueron las 2 especies comunes para todos los sitios de estudios (Figura 17) y las que presentaron abundancias relativas elevadas respecto a otras especies en la comunidad aviar muestreada de cada sitio (Tabla 1). Por esta razón y dado que en todas las áreas presentaron un $n \geq 3$ individuos por sitio, fueron escogidos para llevar adelante los análisis estadísticos comparativos de biomarcadores.

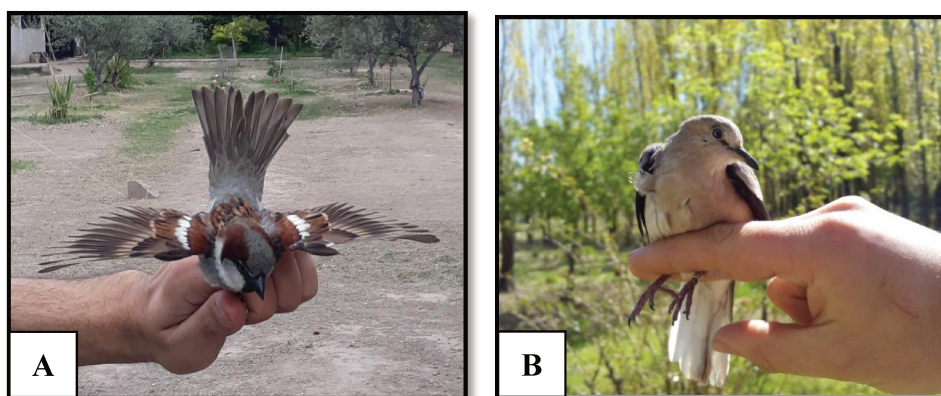


Figura 17. Ejemplar de gorrión doméstico macho (A) y torcacita común (B) muestreados en sitios agrícolas de la Provincia de Mendoza.

Respecto a los parámetros hematológicos, el Hto, RTE, RTL, recuento diferencial leucocitario e índice H/L se pudieron reportar por especie y por sitio (Tabla 2). Solo se incluyen en el reporte aquellos individuos donde los parámetros pudieron ser obtenidos en su totalidad, mientras que aquellos en donde uno o más de los parámetros no pudieron ser calculados, las muestras fueron desestimadas.

De acuerdo a la comparación entre los 4 sitios realizada en base a la especie *P. domesticus*, se pudo observar que sólo se estableció diferencia estadísticamente significativa en el RTE entre las poblaciones de las reservas naturales y las fincas agrícolas ($p=0,0190$) (Figura 18). Centrados en la especie *Columbina picui*, también se observó diferencia entre los sitios agrícolas en el RTE ($p=0,0004$) y, el RTL fue mayor especialmente en las instancias post-fumigación con sus respectivos plaguicidas anticolinesterásicos ($p=0,0002$) (Figura 19).

Al analizar los 2 momentos de muestreos en Finca Maipú, previo y posterior a la aplicación de CSF y, centrados en la especie *P. domesticus*, no se observaron diferencias estadísticas para los parámetros hematológicos. Para la especie *C. picui*, no se observaron diferencias estadísticas concluyentes en el RTE ($p= 0,0179$) pero sí para el RTL ($p= 0,0022$) y el índice H/L ($0,0047$) (Figura 19).

Tabla 1. Especies de aves silvestres muestreadas en áreas naturales y agrícolas que habitan el desierto del Monte, Argentina.

Nombre Científico	Nombre común	Número de individuos por sitio					Total
		RBÑ	RNT	FSR- PostCPF	FM- PreCFS	FM- PostCSF	
Columbiformes							
<i>Columba livia</i>	Paloma doméstica	-	-	-	1	-	1
<i>Columbina picui</i>	Torcacita común	8	5	10	16	11	50
<i>Patagioenas maculosa</i>	Paloma manchada	3	-	-	-	-	3
<i>Zenaida auriculata</i>	Torcaza	-	-	1	-	-	1
Paseriformes							
<i>Agelaioides badius</i>	Tordo músico	1	-	3	-	-	4
<i>Diuca diuca</i>	Diuca común	-	31	-	-	-	31
<i>Elaenia albiceps</i>	Fío fío silbón	-	1	-	-	1	2
<i>Furnarius rufus</i>	Hornero	-	2	1	2	-	5
<i>Geothlypis aequinoctialis</i>	Arañero cara negra	-	-	-	-	1	1
<i>Griseotyrannus aurantioatrocristatus</i>	Tuquito gris	8	-	-	-	-	8
<i>Machetornis rixosa</i>	Picabuey	-	-	1	-	1	2

Nombre Científico	Nombre común	Número de individuos por sitio					Total
		RBÑ	RNT	FSR- PostCPF	FM- PreCFS	FM- PostCSF	
<i>Mimus saturninus</i>	Calandria común	2	-	-	-	-	2
<i>Mimus triurus</i>	Calandria real	3	-	-	-	-	3
<i>Molothrus bonariensis</i>	Tordo renegrido	15	5	-	-	-	20
<i>Myarchus swainsoni</i>	Burlisto pico canela	1	-	1	-	-	2
<i>Myarchus tyrannulus</i>	Atrapamoscas crestipardo	1	-	-	-	-	1
<i>Myiodinastes maculatus</i>	Benteveo rayado	2	-	-	-	-	2
<i>Paroaria coronata</i>	Cardenal copete rojo	1	-	-	-	-	1
<i>Passer domesticus</i>	Gorrión	7	3	15	15	10	50
<i>Phrygilus gayi</i>	Comesebo andino	-	3	-	-	-	3
<i>Phytotoma rutila</i>	Cortarramas	-	-	-	2	2	4
<i>Pipraeidea bonariensis</i>	Naranjero	-	1	-	-	-	1
<i>Pitangus sulphuratus</i>	Benteveo común	-	-	1	1	-	2
<i>Poospiza ornata</i>	Monterita canela	8	-	-	-	-	8

Nombre Científico	Nombre común	Número de individuos por sitio					Total
		RBÑ	RNT	FSR- PostCPF	FM- PreCFS	FM- PostCSF	
<i>Pseudoseisura lophotes</i>	Cacholote castaño	1	1	1	-	-	3
<i>Pyrocephalus rubinus</i>	Churrinche	-	1	-	-	-	1
<i>Saltator aurantiirostris</i>	Pepitero de collar	1	11	2	-	-	14
<i>Sicalis luteola</i>	Misto	-	-	1	-	-	1
<i>Tarphonomus certhioides</i>	Bandurrita chaqueña	-	1	-	-	-	1
<i>Turdus amaurochalinus</i>	Zorzal chalchalero	1	1	3	4	-	9
<i>Turdus rufiventris</i>	Zorzal colorado	-	-	-	-	1	1
<i>Tyrannus melancholicus</i>	Suirirí real	4	-	-	-	-	4
<i>Tyrannus savana</i>	Tijereta	3	-	1	-	-	4
<i>Xolmis coronatus</i>	Monjita coronada	-	1	-	-	-	1
<i>Zonotrichia capensis</i>	Chingolo	25	10	2	-	-	37
Piciformes							
<i>Melanerpes cactorum</i>	Carpintero del cardón	-	1	-	-	-	1

Nombre Científico	Nombre común	Número de individuos por sitio					Total
		RBÑ	RNT	FSR- PostCPF	FM- PreCFS	FM- PostCSF	
Pscitaciformes							
<i>Myiopsitta monachus</i>	Cotorra común	-	4	-	-	-	4

RBÑ: Reserva de Biosfera de Ñacuñán; RNT: Reserva Natural Bósques Telteca; FSR-PostCPF: Finca Santa Rosa (post aplicación de clorpirifos); FM-PreCSF: Finca Maipú (pre-aplicación de carbosulfán); FM-PreCSF: Finca Maipú (pre-aplicación de carbosulfán). FM-PostCFS: Finca Maipú (post- aplicación de carbosulfán). Las hileras sombreadas resaltan las 2 especies incluidas en los estudios comparativos entre sitios.

Tabla 2. Parámetros hematológicos de especies de aves silvestres que habitan áreas naturales y agrícolas del desierto del Monte, Argentina

Especie	Parámetros hematológicos- Media ± Error Estándar (Valor mínimo – Valor máximo)								
	N	Hto	RTE	RTL	H (%)	E (%)	L (%)	M (%)	H/L
RESERVA DE BIOSFERA DE ÑACUÑÁN									
<i>Agelaioides badius</i>	1	50	3685	4889	8	1	89	2	0,09
<i>Columbina picui</i>	8	53 ± 1 (46 – 57)	3775 ± 166 ^a (2920 – 4295)	4110 ± 591 ^a (2750 – 7051)	40 ± 5 (22 – 56)	0	59 ± 5 (44 – 77)	1 ± 0 (0 – 2)	0,75 ± 0,14 ^a (0,29- 1,27)
<i>Griseotyrannus aurantioatrocristatus</i>	8	53 ± 1 (48 – 60)	4961 ± 273 (3590 – 5900)	4831 ± 993 (1467 – 8937)	37 ± 6 (15 – 62)	1 ± 0 (0 – 4)	60 ± 6 (38 – 80)	1 ± 0 (0 – 3)	0,74 ± 0,18 (0,19 – 1,63)
<i>Mimus saturninus</i>	2	51 ± 5 (46 – 55)	4140 ± 110 (4030 – 4250)	9434 ± 3767 (5667 – 13200)	23 ± 8 (15 – 30)	1 ± 1 (0 – 1)	76 ± 9 (67 – 85)	2 ± 1 (0 – 2)	0,32 ± 0,14 (0,18 – 0,45)
<i>Mimus triurus</i>	3	47 ± 1 (45 – 49)	4188 ± 4 (4180 – 4195)	3750 ± 291 (3177 – 4125)	47 ± 5 (39 – 56)	0	53 ± 5 (44 – 61)	0	0,91 ± 0,18 (0,64 – 1,27)
<i>Molothrus bonariensis</i>	15	49 ± 1 (42 – 55)	4059 ± 103 (3570 – 4985)	4803 ± 634 (1941 – 9625)	34 ± 3 (19 – 75)	1 ± 0 (0 – 2)	65 ± 3 (25 – 78)	1 ± 0 (0 – 3)	0,64 ± 0,17 (0,24 – 3,00)
<i>Myiarchus swainsoni</i>	1	55	5495	1760	25	0	75	0	0,33
<i>Myiarchus tyrannulus</i>	1	55	4530	2667	33	0	66	1	0,50
<i>Myiodynaste smaculatus</i>	2	51 ± 4 (47 – 55)	5423 ± 1568 (3855 – 6990)	3847 ± 2876 (791 – 6722)	52 ± 16 (36 – 68)	0	48 ± 16 (32 – 64)	0	1,35 ± 0,79 (0,56 – 2,13)

Especie	Parámetros hematológicos- Media ± Error Estándar (Valor mínimo – Valor máximo)								
	N	Hto	RTE	RTL	H (%)	E (%)	L (%)	M (%)	H/L
<i>Paroaria coronata</i>	1	49	4875	10153	13	0	86	0	0,15
<i>Passer domesticus</i>	7	52 ± 1 (47 – 56)	4526 ± 164 ^a (4055 – 5210)	8736 ± 1933 (3069 – 18775)	31 ± 7 (13 – 58)	0	67 ± 7 (40 – 87)	1 ± 0 (0 – 2)	0,55 ± 0,18 (0,15 – 1,45)
<i>Patagioenas maculosa</i>	3	57 ± 2 (54 – 60)	2482 ± 666 (1610 – 3790)	6209 ± 1089 (4976 – 8381)	44 ± 2 (42 – 48)	0	55 ± 2 (52 – 78)	1 ± 1 (0 – 3)	0,8 ± 0,06 (0,72 – 0,92)
<i>Poospiza ornata</i>	8	50 ± 1 (46 – 55)	4931 ± 201 (4140 – 5660)	2846 ± 590 (1434 – 5689)	17 ± 3 (4 – 27)	1 ± 0 (0 – 3)	82 ± 3 (71 – 96)	0	0,22 ± 0,03 (0,04 – 0,38)
<i>Pseudoseisura lophotes</i>	1	49	2090	2500	22	0	78	0	0,28
<i>Saltator aurantiirostris</i>	1	50	3175	2933	28	2	69	0	0,41
<i>Turdus amaurochalinus</i>	1	53	2255	7302	36	0	60	4	0,60
<i>Tyrannus melancholicus</i>	4	55 ± 1 (53 – 56)	4614 ± 261 (3985 – 5220)	4234 ± 1297 (2043 – 7906)	61 ± 10 (32 – 72)	1 ± 1 (0 – 2)	38 ± 10 (26 – 68)	0	2,03 ± 2,52 (0,47 – 2,73)
<i>Tyrannus savana</i>	3	56 ± 1 (55 – 58)	5880 ± 686 (5135 – 7250)	1845 ± 511 (1047 – 2797)	47 ± 6 (39 – 59)	0	53 ± 6 (41 – 61)	0	0,93 ± 0,25 (0,64 – 1,44)
<i>Zonotrichia capensis</i>	25	49 ± 1 (43 – 56)	4820 – 146 (3695 – 6110)	2345 ± 309 (407 – 70402)	32 ± 3 (11 – 60)	0	64 ± 1 (40 – 89)	0	0,56 ± 0,07 (0,12 -1,50)

Especie	Parámetros hematológicos- Media ± Error Estándar (Valor mínimo – Valor máximo)								
	N	Hto	RTE	RTL	H (%)	E (%)	L (%)	M (%)	H/L
RESERVA NATURAL BÓSQUES TELTECA									
<i>Columbina picui</i>	5	54 ± 1 (52 – 57)	3601 ± 570 ^a (1885 – 4180)	5788 ± 1226 ^a (3667 – 8473)	30 ± 7 (13 – 70)	4 ± 1 (2 – 9)	65 ± 8 (26 – 85)	0	0,53 ± 0,16 ^a (0,15 – 0,88)
<i>Diuca diuca</i>	14	55 ± 2 (42 – 67)	4093 ± 209 (2550 – 4995)	2932 ± 554 (815 – 8038)	48 ± 4 (14 – 74)	4 ± 1 (0 – 8)	48 ± 4 (26 – 85)	0	1,17 ± 0,18 (0,16 – 2,85)
<i>Furnarius rufus</i>	1	45	2450	3080	47	3	49	1	0,96
<i>Melanerpes cactorum</i>	1	54	2405	1570	26	2	72	0	0,36
<i>Molothrus bonariensis</i>	5	54 ± 1 (51 – 56)	4815 ± 264 (4160 – 5520)	7446 ± 4341 (1333 – 15840)	38 ± 6 (24 – 50)	3 ± 1 (1 – 7)	58 ± 5 (48 – 73)	1 ± 0 (0 – 2)	0,71 ± 0,15 (0,33 – 1,04)
<i>Myiopsitta monachus</i>	4	60 ± 2 (57 – 66)	4188 ± 692 (2860 – 5850)	2934 ± 509 (1610 – 4053)	34 ± 3 (26 – 42)	6 ± 1 (5 – 9)	60 ± 4 (49 – 69)	0	0,60 ± 0,10 (0,38 – 0,86)
<i>Passer domesticus</i>	3	56 ± 1 (55 – 59)	4082 ± 209 ^a (3680 – 4380)	6537 ± 2414 (1719 – 9250)	27 ± 9 (14 – 44)	0	73 ± 9 (56 – 86)	0	0,42 ± 0,19 (0,16 – 0,79)
<i>Phrygilus gayi</i>	3	47 ± 1 (44 – 49)	4428 ± 533 (3520 – 5365)	2200 ± 833 (1179 – 3850)	31 ± 9 (18 – 48)	1 ± 1 (0 – 2)	68 ± 9 (51 – 80)	0	0,52 ± 0,22 (0,23 – 0,94)
<i>Saltator aurantiirostris</i>	9	52 ± 1 (48 – 58)	3690 ± 235 (2280 – 4465)	4462 ± 765 (1375 – 8250)	30 ± 4 (8 – 55)	2 ± 1 (0 – 4)	68 ± 5 (44 – 92)	0	0,50 ± 0,11 (0,09 – 1,25)

Especie	Parámetros hematológicos- Media ± Error Estándar (Valor mínimo – Valor máximo)								
	N	Hto	RTE	RTL	H (%)	E (%)	L (%)	M (%)	H/L
<i>Turdus amaurochalinus</i>	1	43	500	2640	24	1	75	0	0,32
<i>Xolmis coronatus</i>	1	49	4450	2521	46	2	51	1	0,90
<i>Zonotrichia capensis</i>	9	52 ± 2 (44 -62)	4434 ± 378 (2580 – 5460)	3689 ± 532 (1667 – 6135)	33 ± 4 (12 – 50)	2 ± 1 (0 – 7)	63 ± 4 (47 – 84)	0	0,58 ± 0,10 (0,14 – 1,06)

ÁREA AGRÍCOLA- FINCA SANTA ROSA POST APLICACIÓN DE CLORPIRIFOS

<i>Agelaioides badius</i>	3	54 ± 1 (53 – 55)	6524 ± 821 (5395 – 8120)	10906 ± 2651 (5789 – 14666)	23 ± 7 (14 – 36)	1 ± 1 (0 – 2)	68 ± 8 (51 – 76)	8 ± 2 (5 – 11)	0,38 ± 0,17 (0,18 – 0,71)
<i>Columbina picui</i>	10	54 ± 1 (45 – 59)	4380 ± 153 ^b (3410 – 5145)	9937 ± 1180 ^b (5280 – 16000)	41 ± 5 (22 – 72)	2 ± 0 (0 – 4)	53 ± 5 (17 – 71)	4 ± 4 (0 – 8)	1,08 ± 0,37 ^{a,b} (0,31 – 4,24)
<i>Furnarius rufus</i>	1	60	5590	13750	8	0	89	3	0,09
<i>Machetornis rixosa</i>	1	55	5920	2344	61	0	37	2	1,65
<i>Myiarchus swainsoni</i>	1	53	8625	14166	7	2	83	8	0,08
<i>Passer domesticus</i>	15	52 ± 1 (47 – 58)	5201 ± 202 ^b (4215 – 6465)	6669 ± 733 (1736 – 10000)	26 ± 4 (9 – 59)	0	70 ± 4 (40 – 88)	3 ± 1 (0 – 12)	0,44 ± 0,09 (0,10 – 1,48)
<i>Pseudoseisura lophotes</i>	1	49	3695	6061	49	0	51	0	0,96

Especie	Parámetros hematológicos- Media ± Error Estándar (Valor mínimo – Valor máximo)								
	N	Hto	RTE	RTL	H (%)	E (%)	L (%)	M (%)	H/L
<i>Satator aurantiirostris</i>	2	51 ± 0 (51 – 51)	5020 ± 275 (4745 – 5295)	7150 ± 1650 (5500 – 8800)	9 ± 2 (7 – 10)	0	90 ± 2 (88 – 91)	2 ± 0 (2 – 2)	0,10 ± 0,02 (0,08 – 0,11)
<i>Sicalis luteola</i>	1	56	6545	5923	13	0	84	3	0,15
<i>Turdus amaurochalinus</i>	3	52 ± 2 (47 – 55)	4378 ± 196 (4085 – 4750)	3733 ± 588 (2750 – 4782)	20 ± 4 (12 – 26)	5 ± 3 (1 – 10)	70 ± 6 (59 – 78)	5 ± 1 (4 – 7)	0,30 ± 0,08 (0,15 – 0,44)
<i>Tyrannus savana</i>	1	50	8440	1890	64	0	33	3	1,94
<i>Zenaida auriculata</i>	1	52	5880	16000	9	0	90	1	0,10
<i>Zonotrichia capensis</i>	2	48 ± 3 (45 – 50)	6448 ± 1153 (5295 – 7600)	4135 ± 648 (3487 – 4782)	32 ± 9 (23 – 41)	0	65 ± 9 (56 – 74)	3 ± 0 (3 – 3)	0,52 ± 0,21 (0,31 – 0,73)

ÁREA AGRICOLA- FINCA MAIPÚ PRE APLICACIÓN DE CARBOSULFÁN

<i>Columbina picui</i>	16	52 ± 1 (48 – 56)	4764 ± 187 ^{b,c} (3490 – 6275)	7507 ± 1146 ^{a,b} (1833 – 20121)	60 ± 3 (30 – 91)	0	39 ± 3 (18 – 68)	2 ± 2 (0 – 4)	1,85 ± 0,25 ^b (0,44 – 4,50)
<i>Furnarius rufus</i>	2	50 ± 1 (49 – 51)	3948 ± 493 (3455 – 4440)	11086 ± 516 (10570 – 11602)	49 ± 25 (24 – 73)	1 ± 1 (0 – 2)	50 ± 23 (27 – 72)	1 ± 1 (0 – 2)	1,52 ± 0,19 (0,33 – 2,70)
<i>Patagioenas maculosa</i>	1	50	2715	36718	71	0	21	2	3,38
<i>Passer domesticus</i>	14	56 ± 2 (50 – 62)	6005 ± 169 ^b (4940 – 7145)	4977 ± 604 (2372 – 9428)	34 ± 4 (7 – 75)	0	65 ± 4 (25 – 91)	1 ± 0 (0 – 4)	0,66 ± 0,19 (0,08 – 3,00)

Especie	Parámetros hematológicos- Media ± Error Estándar (Valor mínimo – Valor máximo)								
	N	Hto	RTE	RTL	H (%)	E (%)	L (%)	M (%)	H/L
<i>Phytotoma rutila</i>	1	55	5910	3666	24	0	73	3	0,33
<i>Pitangus sulphuratus</i>	1	54	3360	7403	44	8	45	3	0,98

ÁREA AGRÍCOLA- FINCA MAIPÚ POST APLICACIÓN DE CARBOSULFÁN

<i>Columbina picui</i>	11	54 ± 1 (48 - 60)	5509 ± 267 ^c (3440 - 6685)	15160 ± 2290 ^b (6290 - 33650)	31 ± 7 (13 - 44)	4 ± 1 (1 - 11)	65 ± 8 (50 - 85)	4 ± 1 (1 - 10)	0,68 ± 0,27 ^a (0,48 - 4,81)
<i>Elaenia albiceps</i>	1	53	5365	7920	25	0	71	4	0,35
<i>Geothlypis aequinoctialis</i>	1	53	7485	7485	53	1	42	4	1,26
<i>Machetornis rixosa</i>	1	58	4655	7480	25	0	72	3	0,35
<i>Passer domesticus</i>	10	54 ± 1 (48 - 57)	5404 ± 284 ^b (3855 - 7055)	8086 ± 1563 (2000 - 18615)	28 ± 3 (15 - 42)	1 ± 0 (0 - 3)	69 ± 4 (54 - 84)	3 ± 1 (1 - 4)	0,44 ± 0,07 (0,18 - 0,78)
<i>Phytotoma rutila</i>	2	52 ± 2 (50 - 54)	5140 ± 330 (4810 - 5470)	13814 ± 8187 (5627 - 22000)	21 ± 17 (4 - 38)	3 ± 3 (0 - 5)	75 ± 21 (54 - 96)	1 ± 1 (0 - 2)	0,37 ± 0,33 (0,04 - 0,70)

Hto: Hematocrito (%); RTE: Recuento total eritrocitario (n° de eritrocitos/ μl x 10^3); RTL: Recuento total leucocitario (n° Leucocitos/ μl); H: proporción de heterófilos; L: Proporción de linfocitos; E: Proporción de eosinófilos; M: proporción de monocitos; H/L: Proporción Heterófilos/Linfocitos. Las hileras sombreadas resaltan las 2 especies incluidas en los estudios comparativos entre sitios. (a/b/c) Letras diferentes en una misma columna/variable para una misma especie refiere diferencias estadísticas entre sitios de muestreo distintos ($p < 0,05$).

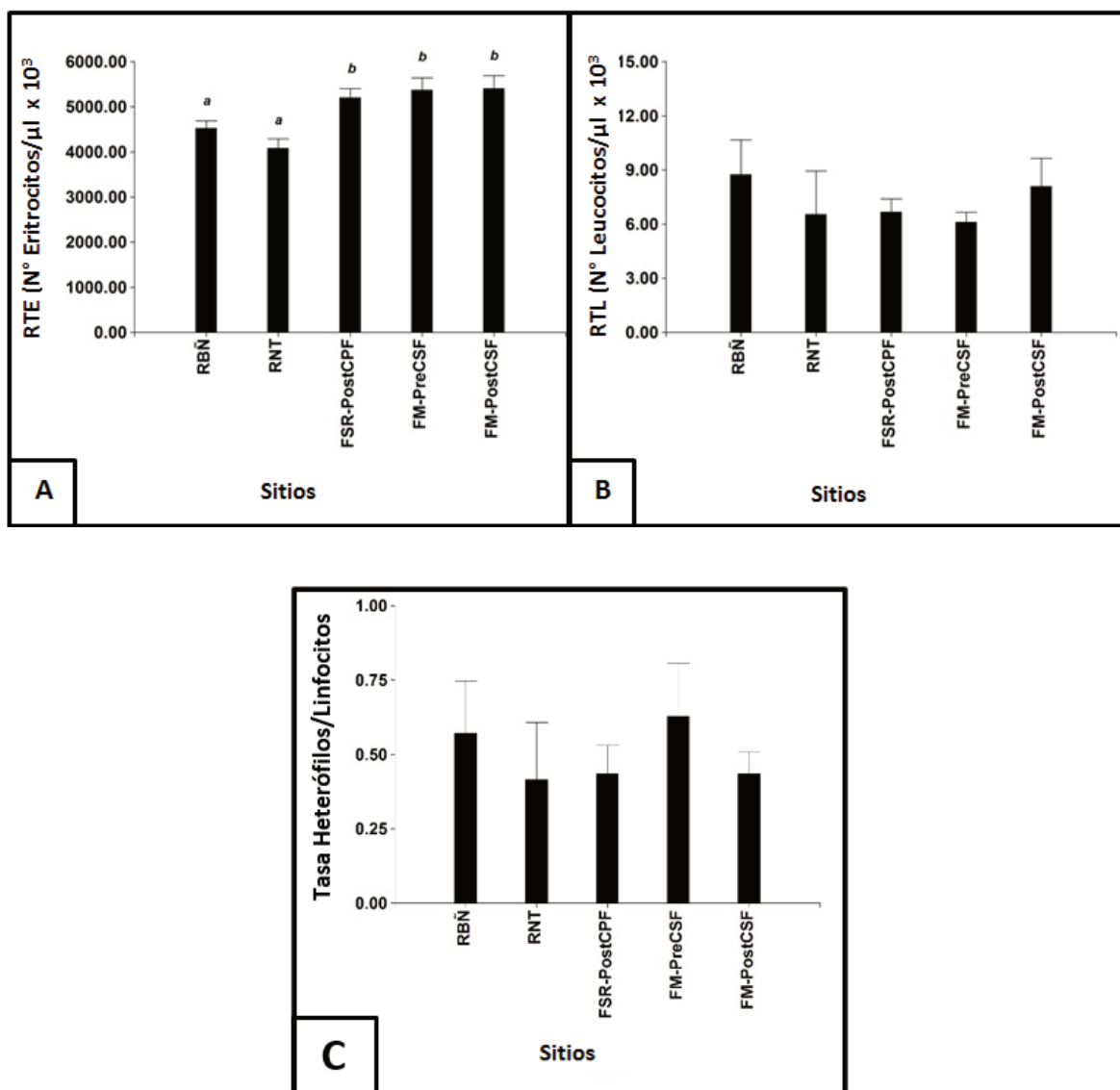


Figura 18. Valores de recuentos celulares en las poblaciones de *Passer domesticus* de las áreas naturales protegidas y agrícolas del desierto del Monte, Argentina. (A) Valores de recuento total eritrocitario (RTE); (B) Valores de recuento total leucocitario (RTL). Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). RBÑ: Reserva de Biosfera de Ñacuñán; RNT: Reserva Natural Bósques Telteca; FSR-PostCPF: Finca Santa Rosa post aplicación de clorpirifos; FM-PostCSF: Finca Maipú post aplicación de carbosulfán.

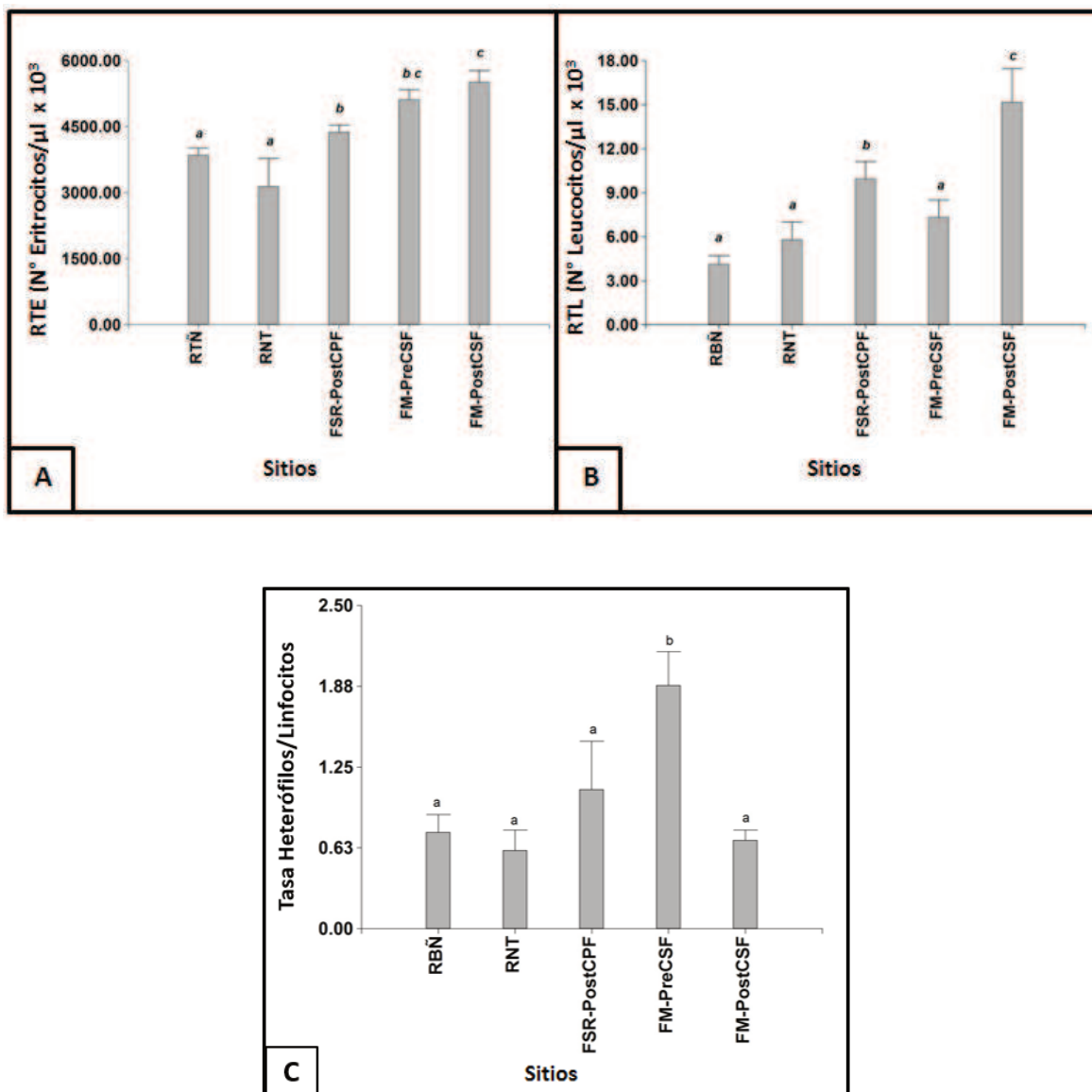
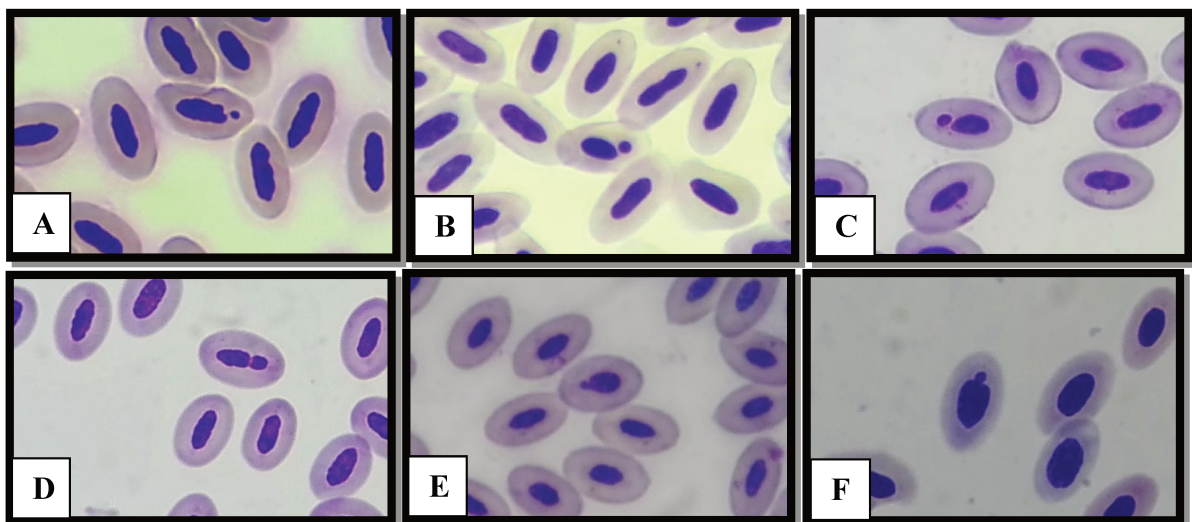


Figura 19. Valores de recuentos celulares en las poblaciones de *Columbina picui* de las áreas naturales protegidas y agrícolas del desierto del Monte, Argentina. (A) Valores de recuento total eritrocitario (RTE); (B) Valores de recuento total leucocitario (RTL). Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$). RBÑ: Reserva de Biosfera de Ñacuñán; RNT: Reserva Natural Bósques Telteca; FSR-PostCPF: Finca Santa Rosa post aplicación de clorpirifos; FM-PostCSF: Finca Maipú post aplicación de carbosulfán.

Respecto al análisis MN-Citoma realizado en eritrocitos maduros de sangre periférica, pudieron ser caracterizadas e identificados 8 tipos de alteraciones del núcleo celular, referidos a presencia, modificaciones en la morfología nuclear, o posición dentro de la célula. Las alteraciones encontradas fueron micronúcleos, brotes nucleares, células binucleadas, puentes nucleoplásmicos, colas nucleares, hendiduras nucleares, eritroplástidos o células sin núcleo y núcleos periféricos (Figura 20).

En cada sitio y para las respectivas especies muestreadas en cada uno, se obtuvieron las frecuencias de cada alteración nuclear (Tabla 3). Dada la baja frecuencia de colas nucleares y puentes nucleoplásmicos, estas no fueron consideradas en los análisis de comparaciones entre sitios ni entre distintos momentos para FM.

Centrados en la especie *P. domesticus* pudieron observarse diferencias estadísticas respecto a las frecuencias de MN ($p=0,0436$), donde únicamente se diferenciaron entre áreas naturales, pero sin diferencias entre los sitios agrícolas con las áreas naturales (Figura 21-A). Por otro lado, se observó una disminución significativa de las frecuencias de Hn ($p= 0,0171$) y aumento de NP ($p= 0,0204$) de los individuos de sitios agrícolas, respecto de los individuos de áreas naturales (Tabla 3- Figura 21 B y C). Centrados en la especie *C. picui* no se observaron diferencias estadísticas concluyentes entre los individuos de los sitios evaluados para ninguna de las frecuencias de alteraciones nucleares analizadas (Tabla 3- Figura 22).



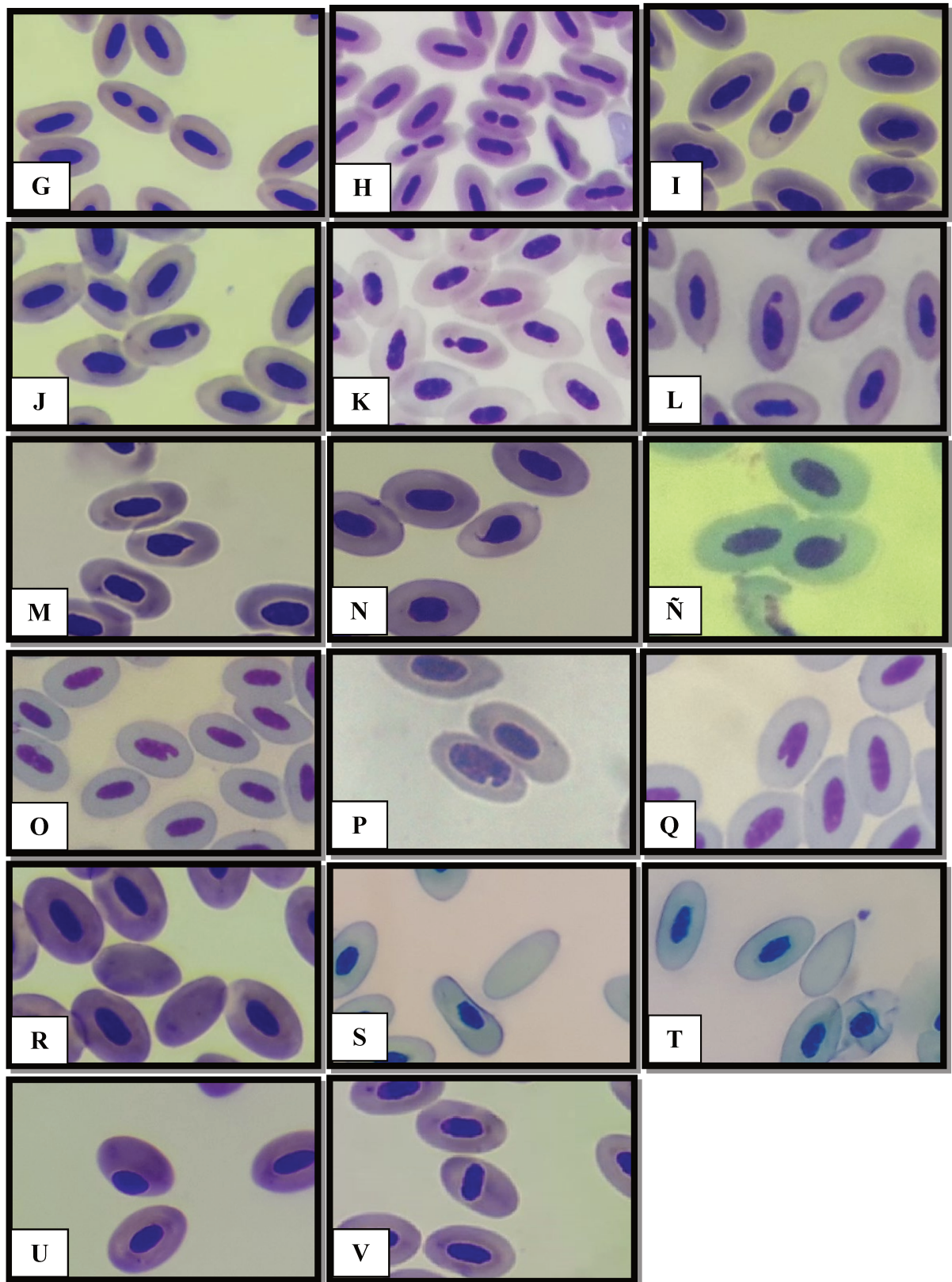


Figura 20. Alteraciones nucleares en eritrocitos maduros de sangre periférica de aves silvestres. (A-C) Micronúcleo; (D-F) Brote nuclear; (G-I) Célula binucleada; (J-L) Puente nucleoplásmico; (M-Ñ) Cola nuclear; (O-Q) Hendidura nuclear; (R-T) Eritroplástido; (U-V) Núcleo periférico.

Tabla 3. Frecuencia de alteraciones nucleares en eritrocitos maduros de aves silvestres que habitan en áreas naturales y agrícolas del desierto del Monte, Argentina.

Especie	N	Tipo de alteración nuclear/ 1000 eritrocitos/ animal- Media ± Error Estándar								
		MN	Y	Bin	Pn	Cn	Hn	E	Per	ANT
RESERVA DE BIOSFERA DE ÑACUÑÁN										
<i>Columbina picui</i>	8	0,38 ± 0,18	0,81 ± 0,28	0,43 ± 0,21	0,25 ± 0,18	0,00	6,68 ± 2,77	0,26 ± 0,08	0,58 ± 0,24	9,38 ± 3,25
<i>Griseotyrannus aurantioatrocristatus</i>	8	0,11 ± 0,07	0,21 ± 0,15	0,53 ± 0,21	0,01 ± 0,01	0,00	1,44 ± 0,49	0,14 ± 0,07	0,29 ± 0,08	2,73 ± 0,78
<i>Molothrus bonariensis</i>	15	0,08 ± 0,04	0,08 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,00	0,42 ± 0,10	0,15 ± 0,06	0,29 ± 0,09	1,10 ± 0,20
<i>Myiarchus swainsoni</i>	1	0,20	0,20	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,60
<i>Passer domesticus</i>	7	0,00	1,71 ± 0,28	0,11 ± 0,07	0,03 ± 0,03	0,00	1,54 ± 0,28 ^a	0,00	1,17 ± 0,37 ^c	4,57 ± 0,56
<i>Poospiza ornata</i>	9	0,19 ± 0,11	0,02 ± 0,02	0,00	0,00	0,01 ± 0,01	0,36 ± 0,16	0,13 ± 0,07	0,48 ± 0,16	1,19 ± 0,33
<i>Pseudoseisura lophotes</i>	1	0,10	0,30	0,00	0,00	0,10	0,00	3,00	0,80	4,30
<i>Satator aurantirostris</i>	1	0,60	0,00	0,20	0,00	0,00	0,40	0,20	1,20	2,60
<i>Tyrannus melancholicus</i>	4	0,23 ± 0,14	0,23 ± 0,13	0,40 ± 0,40	0,03 ± 0,03	0,00	1,60 ± 0,66	0,20 ± 0,08	0,15 ± 0,05	2,83 ± 1,28

Especie	N	Tipo de alteración nuclear/ 1000 eritrocitos/ animal- Media ± Error Estándar								
		MN	Y	Bin	Pn	Cn	Hn	E	Per	ANT
<i>Tyrannus savana</i>	3	1,30 ± 1,06	0,60 ± 0,42	7,63 ± 6,29	0,00	0,00	0,93 ± 0,55	0,07 ± 0,07	0,93 ± 0,55	11,47 ± 8,29
<i>Zonotrichia capensis</i>	27	0,13 ± 0,03	0,22 ± 0,05	0,46 ± 0,11	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	1,41 ± 0,26	0,10 ± 0,04	0,57 ± 0,10	2,95 ± 0,38
RESERVA NATURAL BÓSQUES TELTECA										
<i>Columbina picui</i>	4	0,10 ± 0,07	0,15 ± 0,12	0,00	0,23 ± 0,23	0,43 ± 0,16	3,78 ± 1,15	0,03 ± 0,03	0,33 ± 0,19	5,03 ± 1,51
<i>Diuca diuca</i>	24	0,24 ± 0,05	0,11 ± 0,04	0,58 ± 0,14	0,00	0,12 ± 0,05	0,68 ± 0,19	0,13 ± 0,03	1,60 ± 0,28	3,46 ± 0,48
<i>Elaenia albiceps</i>	1	0,00	0,00	0,80	0,00	0,00	0,30	0,10	1,00	2,20
<i>Furnarius rufus</i>	1	0,20	0,20	0,00	0,00	0,20	0,10	0,00	1,00	1,60
<i>Melanerpes cactorum</i>	1	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	1,40	2,00
<i>Molothrus bonariensis</i>	5	0,12 ± 0,06	0,08 ± 0,04	0,10 ± 0,05	0,06 ± 0,04	0,10 ± 0,04	0,66 ± 0,17	0,02 ± 0,02	0,48 ± 0,19	1,62 ± 0,16
<i>Myiopsitta monachus</i>	4	0,05 ± 0,05	0,03 ± 0,03	0,15 ± 0,10	0,00	0,00	0,08 ± 0,08	0,08 ± 0,03	0,33 ± 0,12	0,70 ± 0,33
<i>Passer domesticus</i>	3	0,20 ± 0,06	0,33 ± 0,12	0,70 ± 0,31	0,03 ± 0,03	0,17 ± 0,17	1,57 ± 0,62 ^a	0,07 ± 0,07	1,33 ± 0,03 ^c	4,40 ± 0,79

Especie	N	Tipo de alteración nuclear/ 1000 eritrocitos/ animal- Media ± Error Estándar								
		MN	Y	Bin	Pn	Cn	Hn	E	Per	ANT
<i>Phrygilus gayi</i>	3	0,13 ± 0,13	0,10 ± 0,00	0,57 ± 0,03	0,00	0,00	0,40 ± 0,10	0,17 ± 0,07	0,40 ± 0,06	1,77 ± 0,17
<i>Pseudoseisura lophotes</i>	1	0,30	0,30	0,50	0,60	0,30	5,80	0,00	0,50	8,30
<i>Pyrocephalus rubinus</i>	1	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,30	1,20	1,60
<i>Satator aurantirostris</i>	11	0,20 ± 0,05	0,21 ± 0,08	0,22 ± 0,09	0,15 ± 0,07	0,34 ± 0,14	6,42 ± 1,88	0,09 ± 0,05	1,32 ± 0,33	8,95 ± 2,13
<i>Tarphonomus certhioides</i>	1	0,50	0,10	0,90	0,00	0,20	1,20	0,00	0,60	3,50
<i>Turdus amaurochalinus</i>	1	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,30	2,40	3,20	6,00
<i>Xolmis coronatus</i>	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	1,00
<i>Zonotrichia capensis</i>	10	0,06 ± 0,03	0,09 ± 0,04	0,37 ± 0,18	0,00	0,03 ± 0,03	0,60 ± 0,16	0,06 ± 0,02	0,81 ± 0,42	2,02 ± 0,44
ÁREA AGRÍCOLA- FINCA SANTA ROSA POST APLICACIÓN DE CLORPIRIFOS										
<i>Columbina picui</i>	10	0,32 ± 0,11	0,66 ± 0,10	0,12 ± 0,04	0,00	0,00	4,02 ± 1,06	0,02 ± 0,02	0,26 ± 0,07	5,40 ± 1,26
<i>Furnarius rufus</i>	1	0,20	0,20	0,20	0,00	0,40	2,00	0,20	0,20	3,40

Especie	N	Tipo de alteración nuclear/ 1000 eritrocitos/ animal- Media ± Error Estándar								
		MN	Y	Bin	Pn	Cn	Hn	E	Per	ANT
<i>Passer domesticus</i>	15	0,13 ± 0,05	0,89 ± 0,36	0,63 ± 0,32	0,00	0,09 ± 0,04	0,55 ± 0,26 ^b	0,20 ± 0,07	2,76 ± 0,49 ^d	5,21 ± 0,96
ÁREA AGRÍCOLA- FINCA MAIPÚ PRE APLICACIÓN DE CARBOSULFÁN										
<i>Columbina picui</i>	15	0,21 ± 0,05	0,27 ± 0,07	0,27 ± 0,14	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	2,20 ± 0,47	0,13 ± 0,05	0,64 ± 0,11	3,77 ± 0,63
<i>Furnarius rufus</i>	2	0,00	0,20 ± 0,00	0,05 ± 0,05	0,00	0,00	0,95 ± 0,05	0,00	1,10 ± 0,10	2,30 ± 0,10
<i>Passer domesticus</i>	15	0,09 ± 0,03	1,04 ± 0,37	0,80 ± 0,43	0,00	0,00	0,31 ± 0,14 ^b	0,19 ± 0,07	3,85 ± 0,43 ^d	6,28 ± 1,23
<i>Phytotoma rutila</i>	2	0,20 ± 0,00	0,20 ± 0,20	0,10 ± 0,10	0,00	0,05 ± 0,05	0,30 ± 0,30	0,00	1,60 ± 1,40	2,45 ± 2,05
<i>Pitangus sulphuratus</i>	1	0,20	0,20	0,00	0,00	0,40	3,80	0,00	1,00	5,60
<i>Turdus amaurochalinus</i>	4	0,20 ± 0,14	0,20 ± 0,14	0,10 ± 0,06	0,00	0,00	1,40 ± 0,89	0,05 ± 0,05	0,85 ± 0,28	1,90 ± 0,33
ÁREA AGRÍCOLA- FINCA MAIPÚ POST APLICACIÓN DE CARBOSULFÁN										
<i>Columbina picui</i>	11	0,24 ± 0,11	0,56 ± 0,28	0,20 ± 0,25	0,05 ± 0,03	0,00	3,96 ± 1,36	0,20 ± 0,06	0,58 ± 0,20	5,85 ± 1,60
<i>Elaenia albiceps</i>	1	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,80	0,00	0,60	1,60
<i>Geothlypis aequinoctialis</i>	1	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,20	1,80

Especie	N	Tipo de alteración nuclear/ 1000 eritrocitos/ animal- Media ± Error Estándar								
		MN	Y	Bin	Pn	Cn	Hn	E	Per	ANT
<i>Machetornis rixosa</i>	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,60	0,00	2,20	2,90
<i>Passer domesticus</i>	10	0,08 ± 0,04	1,42 ± 0,36	0,62 ± 0,21	0,00	0,02 ± 0,02	0,44 ± 0,15 ^b	0,18 ± 0,10	2,92 ± 0,35 ^d	5,68 ± 0,85
<i>Phytotoma rutila</i>	1	0,00	0,00	0,80	0,00	0,00	0,60	0,00	0,20	0,80

MN: Micronúcleos; Y: Brotes nucleares; Bin: Células binucleadas; Pn: Puentes nucleoplásmicos; Cn: Colas nucleares; Hn: Hendiduras nucleares; An: Eritroplástidos; Per: Núcleos periféricos; ANT: Alteraciones nucleares totales. Las filas sombreadas destacan las 2 especies incluidas en los estudios comparativos entre sitios.

Letras diferentes (a-b/c-d) en columna de Hn y Per para la especie *P. domesticus* refiere diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

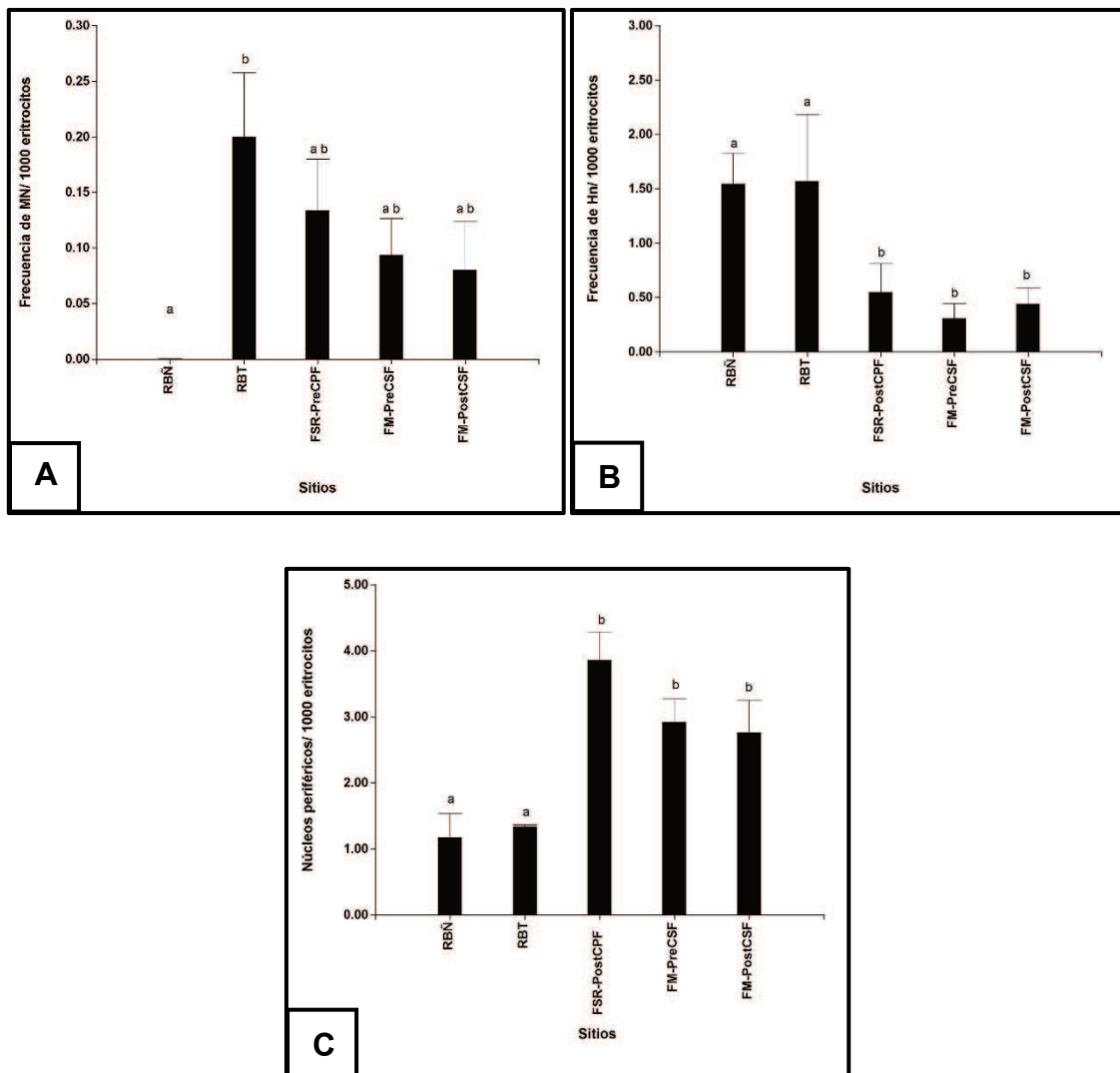


Figura 21. Frecuencias de diversas alteraciones nucleares en las poblaciones de *Passer domesticus* de las áreas naturales protegidas y agrícolas del desierto del Monte, Argentina. (A) Frecuencia de Micronucleos por cada 1000 eritrocitos maduros; (B) Frecuencia de Hendiduras nucleares por cada 1000 eritrocitos maduros; (C) Frecuencia de Núcleos periféricos por cada 1000 eritrocitos maduros. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$). RBÑ: Reserva de Biosfera de Ñacuñán; RNT: Reserva Natural Bóscques Telteca; FSR-PostCPF: Finca Santa Rosa post aplicación de clorpirifos; FM-PostCSF: Finca Maipú post aplicación de carbosulfán.

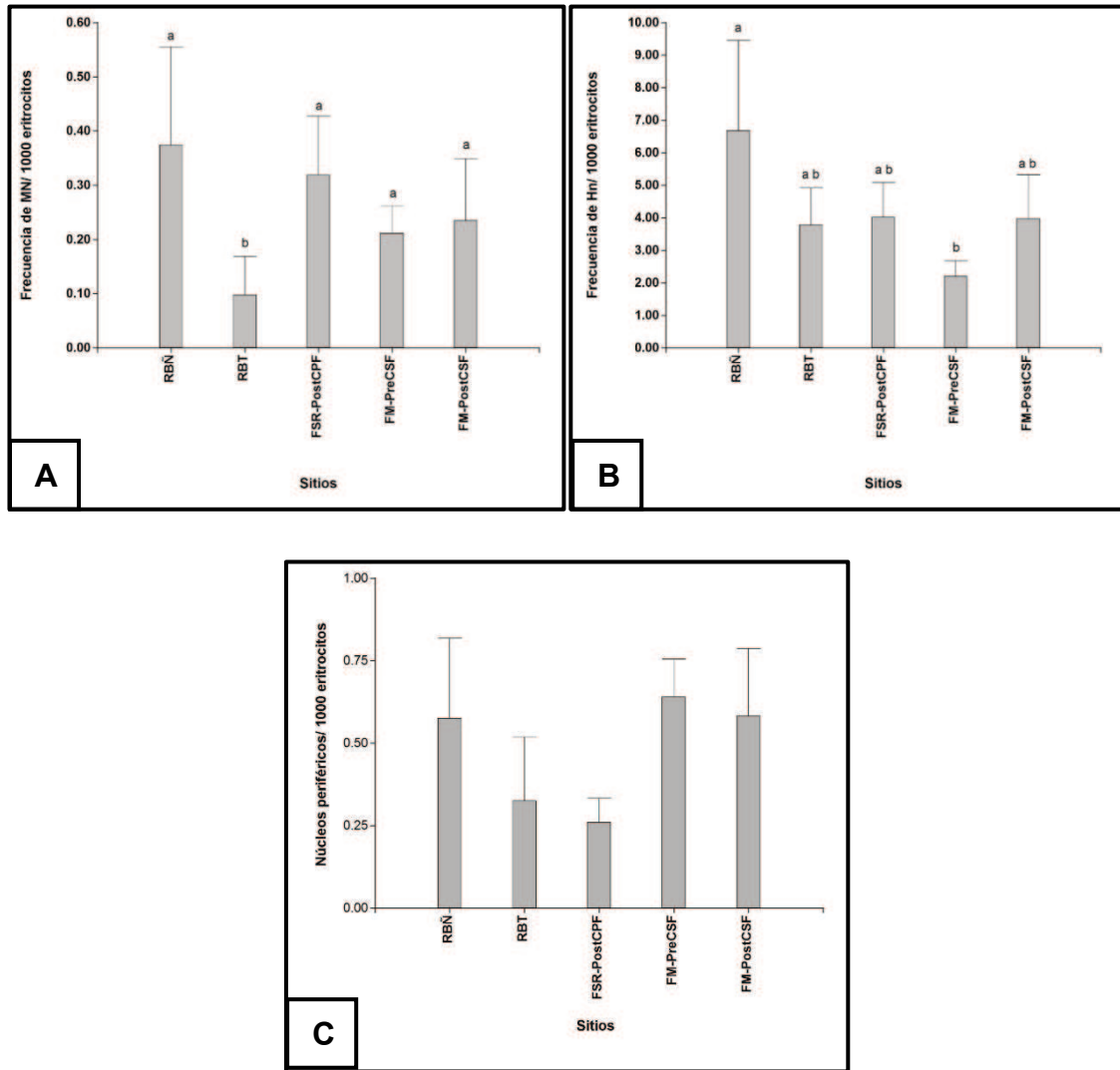


Figura 22. Frecuencias de diversas alteraciones nucleares en las poblaciones de *Columbina picui* de las áreas naturales protegidas y agrícolas del desierto del Monte, Argentina. (A) Frecuencia de Micronucleos por cada 1000 eritrocitos maduros; (B) Frecuencia de Hendiduras nucleares por cada 1000 eritrocitos maduros; (C) Frecuencia de Núcleos periféricos por cada 1000 eritrocitos maduros. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$). RBÑ: Reserva de Biosfera de Ñacuñán; RNT: Reserva Natural Bósques Telteca; FSR-PostCPF: Finca Santa Rosa post aplicación de clorpirifos; FM-PostCSF: Finca Maipú post aplicación de carbosulfán.

En cuanto a la comparación en FM entre los distintos momentos respecto al momento de aplicación de CFS, pudo observarse que tanto para *P. domesticus* como para la especie *C. picui* no existieron diferencias estadísticas en las frecuencias de las anomalías nucleares analizadas.

El análisis de componentes principales permite una interpretación aceptable mediante 2 componentes para las especies en estudio (correlación cofenética > 0,99) cuando se pretende establecer asociación entre la frecuencia de las distintas alteraciones nucleares y los sitios de estudios. De acuerdo a lo demostrado por la especie *P. domesticus* podría existir una potencial asociación entre una tendencia a presentar mayores frecuencias de NP y E en los sitios agrícolas posterior a la aplicación de plaguicidas (Figura 23).

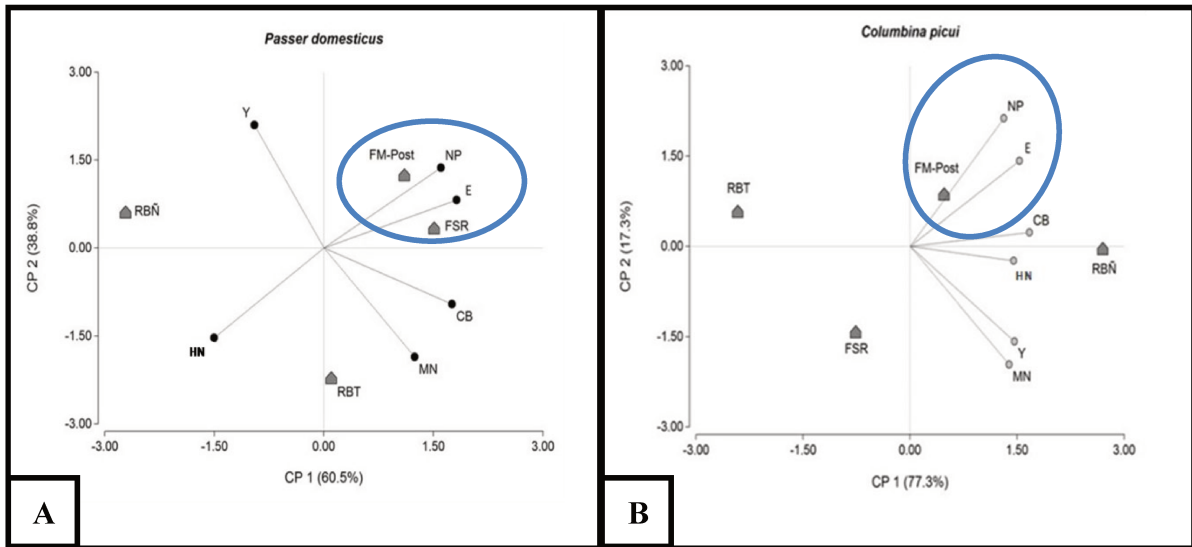


Figura 23. Análisis de Componentes Principales entre las frecuencias de distintas alteraciones nucleares y los sitios de muestreos. CP: Componente principal. MN: Micronúcleos; Y: Brotes nucleares; Bin: Células binucleadas; Hn: Hendiduras nucleares; E: Eritroplástidos; NP: Núcleos periféricos. RBÑ: Reserva de Biosfera de Ñacuñán; RNT: Reserva Natural Bósques Telteca; FSR-Post: Finca Santa Rosa post aplicación de clorpirifos; FM-Pre: Finca Maipú (Pre-aplicación de carbosulfán); FM-Post: Finca Maipú (Post-aplicación de carbosulfán). Los círculos en ambos gráficos representan potencial asociación entre las variables para las especies *Passer domesticus* (A) y *Columbina picui* (B).

Respecto al análisis de actividad ChE plasmática, se pudieron obtener los valores por cada especie muestreada en los distintos sitios de estudio (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad de colinesterasa plasmática en aves silvestres de áreas naturales y agrícolas del desierto del Monte, Argentina.

Especie	Actividad de ChE plasmática (µmol/min/L)				
	Media ± Desvío Estándar (n)				
	Sitios				
	RBÑ	RNT	FSR-PostCPF	FM-PreCSF	FM-PostCSF
<i>Agelaioides badius</i>	2847,0 (1)	-	2275,6 ± 816,7 (3)	-	-
<i>Columbina picui</i>	877,94 ± 262,8 ^a (8)	1048,8 ± 353,4 ^a (5)	578,6 ± 264,3 ^b (10)	1190,5 ± 405,8 ^a (16)	555,7 ± 92,3 ^b (11)
<i>Diuca diuca</i>	-	1182,3 ± 311,4 (24)	-	-	-
<i>Furnarius rufus</i>	-	2478,5 ± 1290,9 (2)	2657,5 (1)	3007,8 ± 419,3 (2)	-
<i>Griseotyrannus aurantioatrocristatus</i>	2654,5 ± 693,1 (8)	-	-	-	-
<i>Machetornis rixosa</i>	-	-	1017,9 (1)	-	1189,8 (1)
<i>Melanerpes cactorum</i>	-	5318,8 (1)	-	-	-
<i>Mimus saturninus</i>	1530,4 ± 420,8 (2)	-	-	-	-
<i>Mimus triurus</i>	890,5 ± 244,6 (3)	-	-	-	-
<i>Molothrus bonariensis</i>	1534,7 ± 415,89 (15)	2161,3 ± 673,3 (3)	-	-	-

Especie	Actividad de ChE plasmática (μmol/min/L)				
	Media ± Desvío Estándar (n)				
	Sitios				
	RBÑ	RNT	FSR-PostCPF	FM-PreCSF	FM-PostCSF
<i>Myiopsitta monachus</i>	-	1222,6 ± 450,0 (4)	-	-	-
<i>Myiarchus swainsoni</i>	832,3 (1)	-	530,8 ± (1)	-	-
<i>Myiodynastes maculatus</i>	2160,0 ± 648,3 (2)	-	-	-	-
<i>Myiarchus tyrannulus</i>	617,4 (1)	-	-	-	-
<i>Paroaria coronata</i>	1907,1 (1)	-	-	-	-
<i>Passer domesticus</i>	505,5 ± 92,9 ^a (8)	532,48 ± 25,8 ^a (3)	707,8 ± 334,1 ^a (10)	786,0 ± 231,9 ^b (15)	541,7 ± 123,4 ^a (10)
<i>Patagioenas maculosa</i>	1225,9 ± 154,5 (3)	-	-	916,9 (1)	-
<i>Phrygilus gayi</i>	-	1701,3 ± 684,0 (3)	-	-	-
<i>Phytotoma rutila</i>	-	-	-	950,4 ± 80,1 (2)	1337,8 ± 139,1 (2)
<i>Pipraeidea bonariensis</i>	-	2517,5 (1)	-	-	-

Especie	Actividad de ChE plasmática (μmol/min/L)				
	Media ± Desvío Estándar (n)				
	Sitios				
	RBÑ	RNT	FSR-PostCPF	FM-PreCSF	FM-PostCSF
<i>Pitangus sulphuratus</i>	-	-	-	1165,3 (1)	-
<i>Poospiza ornata</i>	1828,5 ± 870,3 (8)	-	-	-	-
<i>Pseudoseisura lophotes</i>	1187,8 (1)	-	434,9 (1)	-	-
<i>Saltator aurantiirostris</i>	1667,3 (1)	1792,7 ± 497,4 (10)	1290,5 ± 355,2 (2)	-	-
<i>Tarphonomus certhioides</i>	-	2553,3 (1)	-	-	-
<i>Turdus amaurochalinus</i>	2310,8 (1)	1055,7 (1)	629,2 ± 247,0 (3)	1217,1 ± 515,7 (3)	-
<i>Turdus rufiventris</i>	-	-	-	-	1222,7 (1)
<i>Tyrannus melancholicus</i>	3439,9 ± 347,8 (4)	-	-	-	-
<i>Tyrannus savana</i>	1925,2 ± 1064,7 (3)	-	667,7 (1)	-	-
<i>Xolmis coronatus</i>	-	813,2 (1)	-	-	-

Especie	Actividad de ChE plasmática (μmol/min/L)				
	Media ± Desvío Estándar (n)				
	Sitios				
	RBÑ	RNT	FSR-PostCPF	FM-PreCSF	FM-PostCSF
<i>Zenaida auriculata</i>	-	-	305,8 (1)	-	-
<i>Zonotrichia capensis</i>	2127,6 ± 558,6 (25)	1985,4 ± 458,7 (10)	1822,7 ± 1560,0 (2)	-	-

RBÑ: Reserva de Biosfera de Ñacuñán; RNT: Reserva Natural Bósques Telteca; FSR-PostCPF: Finca Santa Rosa post aplicación de clorpirifos; FM-PreCSF: Finca Maipú (Pre-aplicación de carbosulfán); FM-PostCSF: Finca Maipú (Post-aplicación de CSF). Las filas sombreadas destacan las 2 especies incluidas en los estudios comparativos entre sitios.

Letras diferentes (a-b) refiere a diferencias estadísticas entre los valores de ChE plasmática en aves de la misma especie para sitios de muestreo diferentes ($p < 0,05$).

En el estudio de linealidad para actividad ChE plasmática en muestra de *M. bonariensis*, el rango de diluciones utilizados mostró una alta relación directa entre el nivel de actividad enzimática y la dilución aplicada ($r^2 = 0,98$; $p \leq 0,001$) (Figura 24). La actividad enzimática promedio (media \pm desvío estándar) de una muestra inicial de plasma no diluido fue de $1832,15 \pm 41,15 \mu\text{mol min}^{-1} \text{L}^{-1}$ (coeficiente de variación 3,96%); y la misma actividad para las muestras diluidas fue la siguiente: Dilución 1:2, $722,67 \pm 1,19 \mu\text{mol min}^{-1} \text{L}^{-1}$ (coeficiente de variación (CV) 0,29%); dilución 1:4, $351,42 \pm 0,59 \mu\text{mol min}^{-1} \text{L}^{-1}$ (CV 0,29%); dilución 1:8, $212,20 \pm 1,73 \mu\text{mol min}^{-1} \text{L}^{-1}$ (CV 1,41); y dilución 1:16, $130,95 \pm 1,24 \mu\text{mol min}^{-1} \text{L}^{-1}$ (CV 1,64%) (Figura 24).

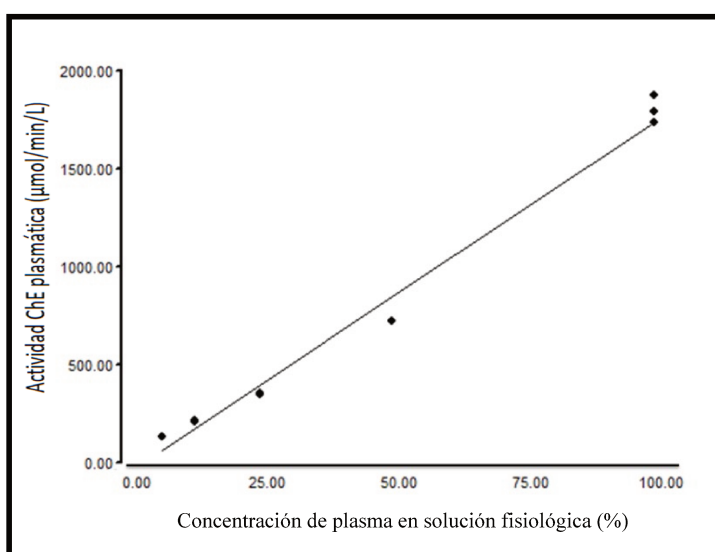


Figura 24. Linealidad en la actividad de la enzima ChE: acetilcolinesterasa en plasma de *M. bonariensis*.

En el análisis comparativo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones de ambas áreas naturales para ninguna de las dos especies. Cuando se analizaron los valores obtenidos para la especie *P. domesticus* entre reservas y sitios agrícolas tampoco se observaron diferencias. Sin embargo, para la especie *C. picui* se observó una menor actividad enzimática en ejemplares de las fincas agrícolas luego de la aplicación del plaguicida ($p < 0,001$), alcanzando una diferencia mayor al 34%, respecto de los sitios sin aplicación (Figura 25).

Al comparar los valores obtenidos en Finca Maipú respecto a la aplicación de CSF, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los valores de actividad ChE para ambas especies analizadas entre los días previos y posteriores a la fumigación. En referencia a la especie *P. domesticus* existió una reducción promedio del

53,3% en el grupo muestreado posterior a la aplicación del plaguicida ($p= 0,0047$). Respecto a la especie *C. picui* se produjo una reducción promedio del 41,2% en los individuos muestreados en la fase posterior a la fumigación ($p<0,0001$) (Figura 25).

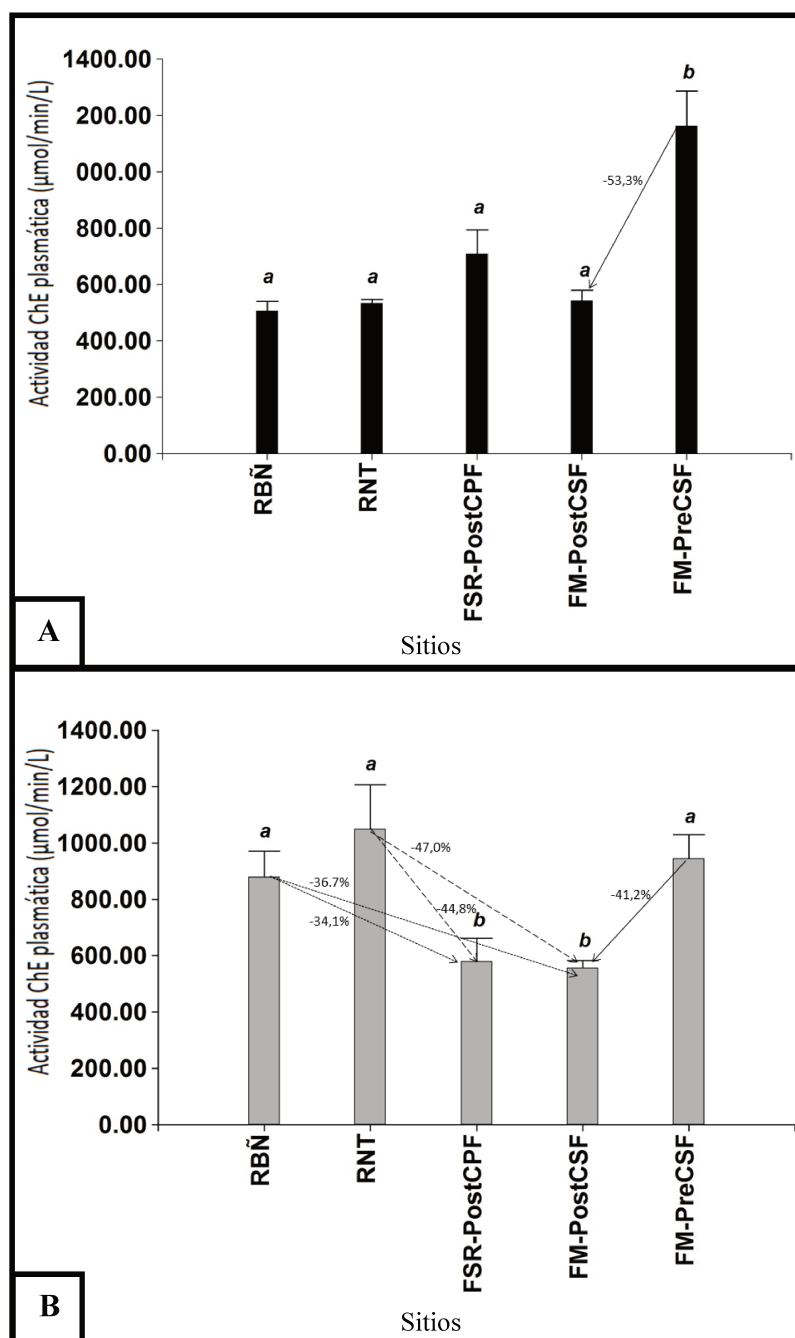


Figura 25. Valores de actividad colinesterasa plasmática (ChE) para la especie *Passer domesticus* (A) y *Columbina picui* (B) en áreas naturales y agrícolas del desierto del Monte, Argentina. RBÑ: Reserva de Biosfera de Ñacuñán; RNT: Reserva Natural Bósques Telteca; FSR-PostCPF: Finca Santa Rosa post aplicación de clorpirifos; FM-PostCSF: Finca Maipú post aplicación de carbosulfán. Las letras diferentes asignadas a las barras denotan diferencias estadísticas entre sitios ($p<0,05$). Las flechas de trazo punteado expresan los porcentajes de reducción de actividad enzimática de las aves de sitios agrícolas respecto a las aves de RBÑ. Las flechas de trazo con líneas discontinua expresan los porcentajes de reducción de actividad enzimática de las aves de

sitios agrícolas respecto a las aves de RNT. La flecha de trazo continuo expresa el porcentaje de reducción de actividad enzimática en el mismo sitio agrícola entre dos momentos de muestreos: de 7 a 9 días previo a la fumigación con CSF respecto a 4 a 6 días posteriores a su aplicación. Se ha colocado la barra de FM-PreCSF a la derecha de la gráfica a fin de ser solamente comparada respecto con el momento post aplicación de CSF en el mismo sitio de estudio.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio permiten realizar comparaciones entre diversos biomarcadores ecotoxicológicos para 4 sitios, los cuales comprenden 2 áreas naturales protegidas compuestas por características fitogeográficas similares, las que refieren al desierto del Monte y, 2 áreas agrícolas comprendidas dentro de la misma biorregión, pero con modificaciones antrópicas diversas. La comparación entre biomarcadores se ha centrado en 2 de las 37 especies de aves silvestres muestreadas (*P. domesticus* y *C. picui*), escogidas como potenciales bioindicadores por el hecho de habitar en todos los sitios estudiados; presentar una abundancia elevada respecto de las demás especies, y contar con suficiente volumen de muestra para realizar múltiples determinaciones de biomarcadores. Es necesario aclarar que estas especies también pudieron ser muestreadas para el sitio agrícola FM, donde se pudo concretar la recaptura de 2 ejemplares de gorrión común y 3 ejemplares de torcacita común, días previos y posteriores a la aplicación de CSF. Con estos eventos solo se puede suponer que las especies muestreadas en esos momentos presentarían un desplazamiento reducido en el área que comprende el sitio de muestreo, a pesar de la aplicación de agroquímicos, lo que aumenta las posibilidades de que ocurran eventos de exposición repetida. La distancia lineal entre RBÑ y FSR fue la menor entre los sitios estudiados (61 km) y no se concretaron eventos de recaptura de ejemplares entre los distintos sitios estudiados.

La selección de imágenes satelitales Landsat 8 permite caracterizar los componentes bióticos y abióticos de los sitios de muestreo a través de la clasificación de los usos del suelo y coberturas terrestres presentes, dado que este satélite se utiliza en diversos estudios de cartografía referidos a este fin y también para monitoreos ecológicos. De ahí deriva la importancia de establecer una relación con los resultados del muestreo biológico (Chuvieco, 2015; Cano-Salinas *et al.*, 2017; Rodríguez-Valero y Alonso-Sarria, 2019). La superficie de área a caracterizar en cada lugar de muestreo se estableció en base a datos bibliográficos que establecen el rango de desplazamiento de una de las especies residentes escogidas como bioindicador, el gorrión común, el cual es de aproximadamente 5km² (Summers-Smith, 2003). Además, cabe destacar que, con anterioridad, se realizaron relevamientos a campo, visuales y de entrevistas, en cada sitio de muestreo, en los que se obtuvieron conocimientos sobre los tipos de cultivos, su manejo, los componentes de actividades antrópicas y/o grado de conservación del

ambiente. Por dicho motivo, en el análisis visual, se determinaron 4 diferentes usos del suelo. Pensamos que las actividades antrópicas que aquí se desarrollan, sin proyección ni gestión amigable con el medio, podrían inducir al deterioro y degradación de los suelos, así como las modificaciones en los nichos ecológicos y en la resiliencia y adaptabilidad de los componentes ambientales y bióticos en relación a la salud ambiental.

Las características ambientales en los sitios de estudio fueron variadas, en donde se pudo observar que para ambos sitios silvestres la vegetación natural, clasificada bajo la denominación de Monte, fue el componente que mayor presencia denotó (mayor al 70% del área analizada sin incluir las porciones de suelo desnudo de vegetación conocidos como “peladales”). Los pequeños fragmentos de color blanco indican “suelo urbano”, que en estos casos corresponden a edificaciones vinculadas con el puesto y actividad de guardaparques y caminos de origen antrópico (Figura 16- A y B). El porcentaje de componente urbano cercano al 0% valida que ambas reservas naturales han presentado nula o leves modificaciones estructurales en remplazo por elementos antrópicos, donde la densidad de infraestructura habitacional humana es baja. Esto refiere a un alto grado de conservación de dichas reservas, razón que permite establecer estos ambientes como relativamente prístinos (Abraham *et al.*, 2009). Fundamentados en lo anterior, consideraremos los resultados de biomarcadores en aves silvestres que residen en estos lugares como representante de valores referenciales para comparaciones con ambientes modificados por el ser humano.

El área analizada que refiere al sitio agrícola “Finca Santa Rosa”, presentó un alto porcentaje de componente vinculado con vegetación del Monte nativo (91%), y tan solo un 5% que refiere a modificaciones estructurales de la vegetación en reemplazo por cultivos agrícolas caracterizados por vid, eucaliptos, perales y membrillares. Durante los muestreos fue posible observar cómo las aves silvestres se movilizan entre el monte nativo y las áreas cultivadas, y ejecutan acciones relacionadas con la alimentación, ingestión de agua, reparo y nidificación dentro del sitio agrícola. Obtuvimos conocimiento sobre la aplicación de clorpirifos 48% (Lorsban 48®) 9 días previos al inicio del muestreo en este sitio. Las características que posee este organofosforado, tales como una alta persistencia en el medio ambiente, dispersión en el aire y gran capacidad de fijación al suelo y superficies, debido a su estructura y composición fisicoquímica (John y Shaik, 2015; INCHEM, 2014) implicarían un riesgo de

exposición para las aves. Si bien el porcentaje de cultivos agrícolas es bajo comparado a la presencia de vegetación nativa, es evidente que las aves atraviesan momentos de exposición a agroquímicos por establecer parte de su nicho ecológico en el interior de las áreas cultivadas y sin barreras físicas que generen una distancia prudente.

El sitio agrícola “Finca Maipú” se destaca por presentar una estructura de suelo completamente antropizada, donde el mayor componente refiere a cultivos agrícolas (71% sin incluir áreas de suelo desnudo), seguido de un componente urbano que comprende el 14% de la superficie analizada. Si bien en el sitio de muestreo se realizó la aplicación de CSF 4 días previos al muestro, cabe destacar que las fincas aledañas podrían contribuir con la exposición a diversos plaguicidas dependiendo de las variadas estrategias agrícolas que utilizan sus propietarios particulares (Ferré *et al.*, 2018a). Además, el componente urbano que refiere a calles, casas e industrias contribuye con fuentes fijas y móviles de emisión de contaminantes que tienen impacto especialmente a nivel atmosférico. Se han identificado compuestos de azufre (SO_x y SH₂), óxidos de nitrógeno (NO_x, NO₂, NO), material particulado (PM), ozono (O₃) y también hidrocarburos (HC), monóxido de carbono (CO), bifenilos policlorados (PCB), polibromodifenil éteres (PBDE), dicloro difenil tricloroetano (DDT), dioxinas y furanos (PCDD) (Puliafito *et al.*, 2000; Allende *et al.*, 2016) como parte de los contaminantes que se encuentran en este sitio urbanizado. En base a esta evidencia, es que consideramos correcto realizar una valoración para cada sitio de estudio, y no solo centrarse en un único contaminante cuando los análisis de biomarcadores ecotoxicológicos se realizan *ex-situ* con poblaciones de fauna silvestre.

Pensamos que especies residentes y con un bajo rango de desplazamiento como el gorrión conviven gran parte de su vida con los plaguicidas utilizados en ambientes agrícolas, además de presentar hábitos peridomésticos que refuerzan su cercanía al ser humano (Summers-Smith, 2003). Tal como ocurrió en las fincas agrícolas estudiadas, se observa un patrón general de aumento de densidad poblacional de especies con hábitos peridomésticos, como el gorrión y la torcacita común, motivo por el cual también se consideró oportuno la elección de estas especies como potenciales bioindicadores ante contaminación generada por fuentes antrópicas (Anderson, 2006; Cid *et al.*, 2018). Por ejemplo, la abundancia relativa según el número de ejemplares capturados para el gorrión común y la torcacita común fue menor al 7% y el 8% respectivamente en áreas

naturales protegidas, y del 23% para ambas especies en FSR y del 55% y 48% respectivamente para FM.

La mayor diversidad de especie y abundancia de individuos capturados bajo un mismo método de muestreo, se presentó en las 2 áreas naturales protegidas, primero en RBÑ y luego en RNT. El sitio agrícola FM fue en el que menor riqueza de especies y abundancia de individuos pudo capturarse. Según el análisis realizado sobre el uso del suelo en los sitios de estudios, pareciera que a mayor concentración de componentes antropizados (suelo para uso agrícola y urbanizado) se reduce la diversidad y cantidad de individuos capturados, tal como también fue observado en el estudio realizado por Rodrigues Silveira *et al.* (2021). Las modificaciones que realiza el ser humano en los ambientes, potencia las posibilidades de desplazamiento de diversas especies que no se adaptan a las condiciones generadas, y en otros casos, las que sí lo hacen deben promover cambios en sus nichos ecológicos que pueden resultar en una menor posibilidad de muestreo y captura para determinadas especies (Daszak *et al.*, 2001; Isacksson, 2018). Para este estudio en particular, pudo observarse que especies como el chingolo común (*Z. capensis*) tienen una elevada abundancia relativa en áreas de monte nativo donde es más probable su captura y muestreo, dado que realiza sus desplazamientos protegidos por arboledas y arbustales. Sin embargo, en áreas agrícolas sus posibilidades de captura fueron casi nulas, y si bien es posible observarlos y oír su canto, desarrollan desplazamientos largos entre parches de arboledas intercalados con grandes áreas de espacios abiertos, lo que hace que el método de captura mediante redes de niebla se vuelva poco efectivo para esta especie. Situaciones similares ocurren con especies como *Saltator aurantirostris* y *Molothrus bonariensis*, los cuales han tenido mayor éxito de captura en áreas naturales. Por otro lado, encontramos que otras especies con abundancias relativas elevadas como *Diuca diuca* en RNT, fueron inexistentes en áreas agrícolas, posiblemente porque es una especie vinculada a zonas de médanos, pastizales áridos y arbustos bajos, con poca adaptabilidad a ecosistemas agrarios (Marin, 2011).

Referido a los parámetros hematológicos, en primer lugar, se destaca que hemos obtenido valores que en la actualidad son desconocidos e inexistentes para la mayoría de las especies que conforman comunidades de aves del desierto, en especial para passeriformes. El hecho de determinar valores referenciales nos permite considerarlos como biomarcadores de efecto útiles para el análisis de diversos escenarios con

implicancias clínicas, para la conservación y el biomonitoreo ambiental (Pinto *et al.*, 2016; Quero *et al.*, 2019).

El hematocrito es una de las variables hematológicas más sensibles a los efectos ambientales, aunque algunos autores también sostienen que la flexibilidad de respuesta o adaptación de este parámetro tiene un componente genético propio de cada especie y es heredable (Simon *et al.*, 2005; Potti, 2007). En el corto plazo, las variaciones en el Hto suelen estar relacionadas a alteraciones en el estado de hidratación y cambios en el volumen plasmático (Takei *et al.* 1988). A largo plazo, otras variables pueden influenciar el Hto, como la masa corporal del individuo, la edad, el sexo, estatus migratorio, y enfermedades, tales como infestaciones por hemoparásitos (Pavlak *et al.*, 2005; Gayathri y Hegde, 2006; Fair *et al.*, 2007; Krause *et al.*, 2016). Se ha observado que, tanto en especies migrantes como no migrantes, el Hto se mantiene estable durante la época reproductiva, que tiene lugar en primavera- verano (Norte *et al.*, 2008; Hatchy Smith, 2010) momento en el que fueron realizadas las campañas de muestreo del presente estudio. Cabe destacar que, en especies pertenecientes a las áreas naturales protegidas, se hallaron hemoparásitos intraeritrocitarios compatibles con *Haemoproteus* spp en los frotis analizados, siendo las especies más afectadas *C. picui*, *M. badius* y *Zonotrichia capensis*. Por las razones planteadas, y tal como se establecerá más adelante con otros parámetros tomados como biomarcadores, es que consideramos inapropiado tomar un único parámetro de análisis como potencial biomarcador que refleje alguna situación ambiental. Consideramos correcta la ponderación de varios parámetros para la evaluación de diversos ambientes con posible exposición a tóxicos ambientales.

En general, para las 31 especies de passeriformes estudiadas se presentaron valores de hematocrito que promediaron un $52,46 \pm 4,48\%$ con una media de los coeficientes de variación (CV) de 7,13% para las especies de RBÑ, 10,62% para las de RNT, 6,61% para las especies de FSR y 5,63% para FM. Los valores de hematocrito están en consonancia con lo reportado en un meta-análisis sobre la capacidad de transporte de oxígeno, que incluía 140 especies de Paseriformes con valores promedios de hematocrito de $48,34 \pm 0,32\%$, con un CV de 9,0% para grupos silvestres y de 7,9% para grupos en cautiverio (Minias, 2018; Marshal *et al.*, 2020). No se ha encontrado un análisis similar para columbiformes, pero una revisión actual establece rangos promedios de hematocritos entre los $34,3 \pm 3,3\%$ y los $61,4 \pm 4,0\%$ para 6 especies de columbiformes diferentes (Powers y Stowe, 2020), incluidas *Columba livia* como única

especie en común con nuestro estudio. El valor promedio de hematocrito para las especies de esta familia taxonómica en nuestro estudio se estableció en $53,20 \pm 3,44\%$ con un coeficiente de variación del 6,94% para las especies de RBÑ, 8,83% para RNT, 6,82% para FSR y 7,45% para FM. Estos resultados también muestran consonancia con los valores reportados en otros estudios.

Ewenson *et al.* (2001), demuestra que el Hto en aves silvestres de vida libre es significativamente más elevado que en aquellas mantenidas en cautividad. Los autores atribuyen que la demanda de oxígeno y la actividad del vuelo en individuos silvestres podrían asociarse a mayores niveles en el Hto y de recuento eritrocitario, dado que existen mayores demandas ante el desplazamiento para la búsqueda y obtención de recursos. Por otro lado, el Hto no estaría asociado únicamente con el RTE, sino también con el tamaño de los eritrocitos circulantes y con la concentración de hemoglobina en cada célula, que a su vez se relaciona con el nivel de oxígeno demandado por los tejidos (Kostelecka-Myrchay Cholostiakow-Gromeck, 2001; Aroray Vatsalya, 2011). En nuestro estudio, hemos observado que en las especies *P. domesticus* y *C. picui* el Hto no fue significativamente diferente entre las poblaciones de los diversos sitios de estudios, pero sí existió diferencia significativa en el RTE. Las poblaciones de áreas naturales fueron similares entre sí, pero diferentes de las poblaciones de áreas agrícolas, que mostraron valores más elevados. Si bien, en nuestro estudio no pudimos evaluar concentración de hemoglobina para establecer una posible asociación con una potencial demanda de oxígeno, consideramos que el efecto observado puede deberse a las dificultades relacionadas con la obtención de recursos, más que a un efecto ante la exposición de plaguicidas. La dispersión de recursos alimenticios, por ejemplo, no presenta el mismo patrón para el monte nativo que en áreas agrícolas, ya que estas últimas implican distancias más amplias de desplazamiento para las aves, lo que conllevaría una mayor demanda de las funciones que cumplen los eritrocitos.

El Recuento Total Leucocitario y la proporción y variación de las diferentes líneas leucocitarias pueden ser indicativos de una respuesta celular inmune ante un proceso de estrés fisiológico, reflejando la condición de salud de los individuos frente a procesos adaptativos (Stevenson 2005; Wikelski and Cooke, 2006; Krams *et al.*, 2012). Ante una respuesta al estrés es esperable observar una disminución en el RTL, pero un aumento en la proporción H/L, provocada por la disminución del número relativo de linfocitos y aumento del número relativo de heterófilos (Ruiz *et al.*, 2002; Cavalli *et al.*,

2018). Factores como las alteraciones del hábitat, enfermedades, muda de plumas, estado reproductivo, temperatura ambiental y gasto energético podrían significar procesos de estrés para las aves silvestres. La captura y manipulación de las aves, por ejemplo, es una situación de estrés agudo, que puede alterar la leucograma a partir de los 60 min, produciendo principalmente un aumento de los heterófilos y disminución de los linfocitos (Cirule *et al.*, 2012). Basados en esta premisa, nos aseguramos que el proceso de captura y muestreo fuera inferior a los 40 min para todos los individuos, a fin de evitar sesgos asociados con esta situación en la lectura de los leucogramas (Davis *et al.*, 2005). Respecto a las poblaciones de gorriones estudiadas, no se observaron diferencias en el RTL. Sin embargo, para la torcacita común fue posible observar una diferencia significativa en el RTL, que presentó un valor significativamente mayor en poblaciones muestreadas en áreas agrícolas posterior a la aplicación de insecticidas. Una diferencia en este parámetro global precisa de un análisis detallado y de mayor profundidad, a fin de observar lo que ocurre con las distintas líneas celulares y el índice H/L.

De acuerdo con Marshall y Heatley (2020), las especies pueden ser clasificadas como linfocitarias o heterófilas de acuerdo a la línea leucocitaria predominante. En nuestro estudio, la mayoría de las especies de áreas naturales y consideradas como referenciales, resultaron ser linfocitarias (predominio de linfocitos por encima de las líneas granulocíticas en el leucograma), con excepción de *Myiodinastes maculatus*, *Tyrannus melancholicus* y *Diuca diuca*. Pensamos que la importancia de establecer estas categorías radica en que el tipo de leucocitos circulantes varía y responde ante situaciones de estrés (Davis *et al.*, 2008). Detectar un aumento en la proporción de heterófilos para una especie linfocitaria, especialmente para grupos que habitan entornos antropizados y modificados, podría dar evidencia de que los individuos enfrentan una situación de estrés. En nuestro estudio, los valores en la tasa H/L de poblaciones en fincas agrícolas presentaron resultados más elevados pero dispares, por lo que no son tomados como concluyentes (Figura 19). La valoración completa y en conjunto de todos los componentes del perfil leucocitario, podría ser más útil para aproximarnos a la causa de estrés, que sólo la interpretación de la tasa derivada entre los heterófilos y los linfocitos (Maxwell 1993; Matson, 2006; Vinkler *et al.*, 2010; Owen *et al.*, 2013).

La relación H/L se ha descrito como una medida de valoración de estrés en aves (Davis *et al.*, 2008; Cid *et al.*, 2018). Esta tasa, antes y después del evento estresante se relaciona con la magnitud del efecto estresor, los glucocorticoides circulantes, enfermedades e infecciones, y diversas hormonas circulantes (Włodarczyk *et al.*, 2017). Este complemento del hemograma permite evaluar estrés fisiológico prolongado en aves (Davis *et al.*, 2008, Banbura *et al.*, 2011), y se ha visto asociado a la degradación de hábitat, al cambio de las estaciones, lesiones, calor severo, enfermedad, ejercicio extremo, privación de alimentos, contaminación y/ o exposición a nuevas situaciones sociales (Vleck *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2011; Pandian *et al.*, 2012 Banbura *et al.*, 2013; Messina *et al.*, 2018). En paseriformes, el índice aumenta en respuesta a una variedad de estresores, incluyendo migración a larga distancia (Owen y Moore, 2006), transporte y manipulación (Parga *et al.*, 2001; Scope *et al.*, 2002; Groombridge *et al.*, 2004), e infecciones parasitarias (Clark *et al.*, 2016). Por otro lado, si bien el índice H/L no es el único parámetro para valorar la salud y condición inmunológica de las aves, es bien reconocido como indicador del efecto de estresores agudos y crónicos (Cotter, 2014). Las variaciones hematológicas por estrés podrían vincularse en ocasiones a respuestas especie-específicas, y es una consideración a tener en cuenta ante la elección de una especie como potencial bioindicador.

Para *P. domesticus* y *C. picui* no existieron diferencias significativas en los índices H/L entre poblaciones de distintos sitios. Sin embargo, es posible destacar que, para la torcacita común, se observa una tendencia a mayor tasa en las áreas agrícolas, donde en todos los casos el valor alcanzado fue mayor a 1,00. Esto último indica que la proporción de heterófilos supera el valor de linfocitos, tal como se espera ante una respuesta al estrés. Si consideramos que el valor promedio para el índice H/L en esta especie en áreas naturales fue de 0,64 (0,75 para RBÑ y 0,53 para RNT), puede asumirse que este valor tomado como referencial fue 40,7% promedio mayor para la FSR y un 47,1% promedio mayor para la FM posterior a la fumigación. La misma situación se evidencia en la investigación realizada por Fokidis *et al.* (2008), donde poblaciones de *P. domesticus* procedentes de áreas rurales no mostraron diferencias, pero sí se observaron respuestas distintas en poblaciones de los paseriformes *Mymus polyglottos* y *Toxostoma curvirostre* ante potenciales situaciones de mayor estrés en zonas urbanizadas. Tal como refleja este último estudio, el efecto aditivo de factores que provocan situaciones de mayor estrés en aves silvestres, podrían detectarse con

simples perfiles hematológicos, ante la comparativa entre valores para una misma especie que habita y se adapta a diversos escenarios ambientales.

El ensayo de MN se ha adaptado para ser aplicado sobre células sanguíneas, especialmente para eritrocitos de vertebrados, tales como mamíferos (Zúñiga-González *et al.*, 2001; Alimba y Bakare, 2015; Quero *et al.*, 2018), aves (Souto *et al.*, 2018), reptiles (Poletta *et al.*, 2008; Schaumburg *et al.*, 2012; Latorre *et al.*, 2015), anfibios (Bosch *et al.*, 2011) y peces (Melo *et al.*, 2013). Durante al menos 20 años, se ha demostrado la sensibilidad del ensayo de MN en aves expuestas a estresores ambientales.

Se sugiere una frecuencia basal media de $MN \geq 0,35$ como punto de corte para que una especie sea considerada útil como bioindicador de riesgo genotóxico (Zúñiga-González *et al.*, 2001). Las especies seleccionadas para el análisis en este estudio no cumplieron con esta premisa para MN, dado que se hallaron valores en promedio inferiores a lo establecido. Otras especies capturadas en áreas naturales, tales como *Tyrannus savana* y *Saltator aurantiirostris*, coincidente con estudios nuestros previos a esta tesis (Quero *et al.*, 2016), podrían resultar útiles e informativas para evaluar posibles daños genéticos, dado que superaron el valor de corte establecido. Sin embargo, para sustentar esta hipótesis, sería necesario aumentar el número de individuos analizados para estas últimas especies, dado que las mismas presentaron nulo índice de captura en los sitios agrícolas y baja abundancia relativa en las áreas naturales protegidas. Entonces, estas especies podrían demostrar respuestas aceptables ante la exposición ambiental a tóxicos, pero no representan bioindicadores ideales a causa de su restringida distribución, baja abundancia y difícil muestreo.

Los valores obtenidos del recuento de MN para la mayoría de las especies de aves silvestres que habitan las áreas protegidas y, en especial para *P. domesticus* y *C. picui*, resultaron ser similares a otras especies analizadas en áreas naturales. En el presente trabajo, en estas 2 especies hallamos valores comprendidos entre los 0 a $0,38 \pm 0,18$ MN/1000 eritrocitos, mientras estudios realizados por Baesse *et al.* (2015) hallaron valores comprendidos entre los 0 y 0,40 MN/1000 eritrocitos. Sin embargo, fueron llamativamente bajos los valores presentados en las poblaciones de áreas agrícolas post fumigación, con promedios de 0,08 a 0,32 MN/1000 eritrocitos y sin diferencias con los sitios naturales. Resultados similares se han descrito en la especie *Volatinia jacarina* ($X = 0,03$ MN/ 1000 eritrocitos), la cual habita áreas con impacto agrícola (Rodrigues

Silveira *et al.*, 2021). Un valor de 0,30 MN/1000 eritrocitos también fue obtenido como promedio general para paseriformes y columbiformes que habitan áreas de cafetales, y un 17% de las 21 especies estudiadas no expresaron MNs (Souto *et al.*, 2018). Sin embargo, para especies como el cernícalo americano (*Falco sparverius*) que habita áreas agrícolas, se han observado valores de MN superiores a 1 o 2 MN/1000 eritrocitos (Frixione y Rodríguez-Estrella, 2020). Ante la variada respuesta de este biomarcador en diferentes especies, autores suponen que ciertas características intrínsecas como el sexo, edad, hábitos alimenticios, estado sanitario y estatus migratorio, como así también factores extrínsecos como hábitat, estación del año, alimentos disponibles y tipos de contaminantes, podrían afectar la expresión de este biomarcador. Es altamente probable que las aves rapaces como el cernícalo sufran procesos de biomagnificación a causa de su dieta carnívora, en comparación con la mayoría de las paseriformes o columbiformes que suelen tener dietas granívoras, insectívoras u omnívoras, pero establecidas en los primeros eslabones de la cadena trófica (Quirós *et al.*, 2008; Tomazelli *et al.*, 2021).

Varios estudios también han demostrado que la descripción de AN bajo el ensayo “citoma” puede ser aplicado en eritrocitos nucleados como biomarcador complementario en diversas especies de aves (Gómez-Meda *et al.*, 2006; De Mas *et al.*, 2015; Baesse *et al.*, 2019). Estos ensayos no solo han evidenciado los efectos citotóxicos y genotóxicos ante la exposición a contaminantes ambientales (Sharaf *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2014; López-González *et al.*, 2017), sino también en el marco de monitoreos de efectos producidos en poblaciones que habitan ambientes con impacto antrópico (Souto *et al.*, 2018; Frixione y Rodríguez-Estrella, 2020; Rodrigues Silveira *et al.*, 2022; Tomazelli *et al.*, 2021), tal como fue planteado en el presente estudio. Se reportan valores de 7 tipos de alteraciones nucleares distintas para un total de 25 especies diferentes de aves silvestres entre áreas naturales y fincas agrícolas.

En cuanto a los resultados del ensayo Citoma se identificaron las AN: Y, Bin, Pn, Cn, Hn, E y Np, propuestas para células de epitelio bucal de humanos y eritrocitos de peces por Carrasco *et al.* (1990); Tolbert *et al.* (1992), Thomas y Fenech (2011), y adaptadas a eritrocitos de aves por nosotros (Quero *et al.*, 2016). Cabe aclarar aquí también que, los valores reportados en áreas naturales fueron considerados como valores basales debido al bajo impacto antrópico, por lo que pueden ser utilizados como referencia a la hora de realizar comparaciones posteriores a la exposición a xenobióticos (Poletta *et al.*, 2008). Del total de las 7 AN descriptas, las especies seleccionadas en este

estudio presentaron una variedad de entre 5 a 7 alteraciones diferentes, sin distinguirse entre sí las poblaciones de áreas naturales con las agrícolas. La población de *C. picui* de la RBÑ fue la que presentó el valor más alto de alteraciones nucleares totales (ANT), vinculado con su alta frecuencia de Hn. Fue la segunda especie con valor más elevado de su comunidad luego de *T. savana*, y representa un valor de 46.3% más elevado que la población de la RNT y un 40% promedio más elevado que los valores hallados en las poblaciones de las fincas agrícolas luego de la aplicación de plaguicidas. Consideramos que, ante esta situación, es correcto realizar un análisis diferenciado de las frecuencias de cada alteración nuclear entre poblaciones a fin de considerar qué tipo de biomarcadores podrían ser los más representativos ante el efecto que expresan las poblaciones en contextos ambientales distintos.

Las yemas o brotes nucleares podrían ser consideradas como manifestaciones que refieren a amplificaciones génicas defectuosas o fragmentos acéntricos de cromosomas (Fenech *et al.*, 2011). Si estas estructuras no estuviesen integradas al núcleo en interfase, podrían ser consideradas como MN, por lo que la frecuencia de Y podría estar asociada con una expresión temprana de MN (Cheong *et al.*, 2013). Las frecuencias de Y observadas en *P. domesticus* y *C. picui* superaron el valor de 0,30 Y/1000 eritrocitos y, en todos los casos, fue mayor que sus respectivas frecuencias de MN. En promedio, *P. domesticus* expresó valores para Y que superan en más del doble a los expresados por *C. picui*, lo que refuerza la idea de que estos biomarcadores de efecto deben ser valorados de forma especie específica y no ser ponderados entre especies distintas. Sin embargo, a la hora de comparar poblaciones de ambas especies que habitan diferentes entornos, no se observaron diferencias entre áreas naturales y sitios agrícolas.

Se ha mantenido como hipótesis que las células binucleadas se originan a causa de fallas en la citocinesis durante la mitosis celular (Thomas y Fenech, 2011). En este proceso la reestructuración del citoesqueleto cumple un rol fundamental y, sus defectos finalmente impactarían en la división del material genético replicado. En continuidad con lo observado para Y, las Bin también se hallaron con valores promedios superiores en *P. domesticus* respecto de *C. picui*. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas entre las distintas poblaciones analizadas de ninguna de las 2 especies. La especie *T. savana* muestreada en RBÑ demostró valores llamativamente altos para esta alteración ($X = 7,63$ Bin/1000 eritrocitos) al igual que para MN ($X = 1,30$ MN/1000

eritrocitos). Esta especie, se convierte en una opción interesante a evaluar como modelo de especies migrantes y la dinámica e interacción que mantienen con genotóxicos presentes en los diversos ambientes que visitan a lo largo de sus rutas de desplazamiento.

Los puentes nucleoplásmicos y las colas nucleares podrían producirse mediante mecanismos emparentados (Anbumani y Mohankumar, 2015). El primero se forma cuando un cromosoma dicéntrico se divide entre polos opuestos durante la mitosis, pero conectados por una cromátida en común, y las cromátidas darían lugar a un puente nucleoplásmico que conecta 2 núcleos, el cual podría romperse y originar un MN (Fenech *et al.* 2011). Ante una constricción del puente nucleoplásmico y su posterior ruptura podría generarse la formación de una cola nuclear (Anbumani y Mohankumar, 2015). Los puentes nucleoplásmicos son una AN poco frecuente de observar y no se cuenta con registros en eritrocitos de sangre periférica en aves. En nuestro estudio, solo 8 de las 25 especies analizadas para biomarcadores de genotoxicidad en eritrocitos expresaron esta AN y, excepto para *C. picuí* y *S. aurantirostris* la frecuencia no superó los 0,1 Pn/ 1000 eritrocitos.

Por otra parte, las colas nucleares han sido descritas inicialmente por Kursá y Bezrukov (2008). Estos autores hallaron colas nucleares en cinco especies de aves con una media general de 0,46 Cn/ 1000 eritrocitos, incluida una especie de paseriforme. De Mas *et al.* (2015) describieron esta anomalía en pingüinos, mientras que Alimba y Bakare (2015) la hallaron también en *Coturnix coturnix japonica*. En nuestro estudio, esta AN poco frecuente de observar fue hallada en 13 de las 25 especies y sólo alcanzó valores similares a los antes descrito en una de las poblaciones de *C. picuí* ($X=0,46$) e individuos de *Furnarius rufus* y *Pitangus sulphuratus*. Dado que estas anomalías nucleares fueron poco probables de hallar y con frecuencias cercanas a 0, se excluyeron de los análisis estadísticos para comparaciones entre sitios. Resulta interesante profundizar la idea de la baja frecuencia de estas alteraciones y su significado al presentarse en las células sanguíneas.

Las células con hendiduras nucleares se caracterizan por presentar una notoria invaginación de la membrana nuclear (Carrasco *et al.*, 1990) y su formación puede ser atribuida a modificaciones en proteínas del citoesqueleto, responsables de mantener la forma del núcleo celular luego de procesos mitóticos con aneuploidías (Ghisi *et al.*, 2014). En la actualidad, varios autores han registrado este tipo de AN en el ensayo

citoma aplicado a eritrocitos de diversas clases de vertebrados, pero aún no se ha descrito el mecanismo y las variables que desencadenan su formación ni las implicancias que podrían presentar para el material genético (De Mas *et al.*, 2015; Benvindo-Souza *et al.*, 2020). En la mayoría de las especies analizadas en este estudio, indistintamente del sitio de muestreo, ésta es la AN que presenta mayor frecuencia por encima de las otras, y suele ser la que mayor incidencia tiene en el resultado final de ANT, como también se ha observado en otro estudio (Viana *et al.*, 2018). Consideramos que el valor basal de esta AN suele ser elevado, tomando como referencia una frecuencia mayor a 1Hn /1000 eritrocitos. Sin embargo, se denotan marcadas diferencias especie-específicas, por ejemplo, las frecuencias de Hn halladas en *C. picui* supera hasta en 9 veces los valores de la población de *P. domesticus* del mismo sitio de estudio (FM-PostCSF). Esto podría indicar una mayor sensibilidad de una especie respecto a otra en algunos tipos de alteraciones nucleares. Esta hipótesis refuerza la postura de utilizar la descripción de las alteraciones nucleares por especie, sin ponderar los datos agrupados bajo una misma clase o familia taxonómica en general. Encontrar la especie adecuada que resulte como mejor centinela en cada región le atribuye un valor ecosistémico, científico y social que prioriza su inclusión en actos de conservación de sus poblaciones y el medio donde habitan.

En nuestro estudio, las poblaciones de gorriones que pertenecen a los sitios agrícolas tuvieron frecuencias de Hn significativamente menores que las poblaciones de las reservas naturales. En la torcacita común, las poblaciones no se diferenciaron. Si se considera que un aumento de frecuencia determinaría la funcionalidad que se le atribuye a una AN, es posible pensar que este biomarcador no resultaría útil a los fines de evaluar un daño citotóxico ante una potencial exposición, dado que se presupone que las poblaciones de áreas naturales no estarían expuestas directamente a estos factores. Sin embargo, aún es pobre el conocimiento existente sobre su génesis. Si se considerara que este biomarcador se produce como forma previa y temprana de algunas otras alteraciones nucleares, como brotes nucleares, células binucleadas y MN (Fernandes *et al.*, 2007), podríamos comenzar a valorar su reducción ante el aumento de otras potenciales alteraciones nucleares con las que pueda vincularse. Esto nos lleva a reflexionar que los biomarcadores de efecto deben ser ponderados en conjunto y no como un fenómeno y/o resultado aislado uno del otro.

Los eritroplástidos o eritrocitos anucleados también son considerados anómalos en aquellas especies en las que se esperaría encontrar glóbulos rojos con núcleo. Los mecanismos involucrados en su formación no han sido descritos, pero algunos autores sugieren que estas alteraciones se vinculan con efectos toxicológicos (Devyatkin *et al.*, 2006; Hiraga *et al.*, 2008). Múltiples estudios han podido registrar altos valores de estas alteraciones en eritrocitos de aves que atraviesan cuadros clínicos diagnosticados como anemia inmunomediada (Johnston *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2015). Sin embargo, se estima que valores que no superan el 1% del conteo general de eritrocitos no se asocia con manifestación de signos clínicos (Clark *et al.*, 2009), tal como fue hallado en la mayoría de las especies de nuestro estudio. Sólo 1 individuo de *P. lophotes* (RNT) y de *T. amaurochalinus* (RBÑ) presentaron frecuencias mayores a este porcentaje y, coincidentemente fueron diagnosticados mediante frotis con presencia de los hemoparásitos *Trypanosoma* spp y *Haemoproteus* spp respectivamente. Gonçalves *et al.* (2020) observó frecuencias de eritroplástidos mayores a 0,40 E/1000 eritrocitos en 5 poblaciones de *Antilophia galeata*, donde la población más cercana al sitio urbano demostró la frecuencia de mayor valor (1.29 E/1000 eritrocitos). En nuestro estudio, ningunas de las poblaciones de *P. domesticus* o *C. picui* alcanzaron aquellos valores, y si bien no se presentaron diferencias estadísticas entre sitios analizados, solo las poblaciones de gorriones de áreas agrícolas mostraron una tendencia a tener mayores frecuencias respecto de las poblaciones de áreas naturales. Gonçalves *et al.* (2020) sugiere que las aves expuestas a contaminantes volatilizados proveniente de la combustión de vehículos e industrias podrían presentar valores mayores de este biomarcador.

El desplazamiento o rotación del núcleo celular contemplado bajo el término de “núcleos periféricos” son alteraciones que han sido adaptadas y descritas para aves en el presente estudio, pero no en otros, y sólo contamos con pocos registros realizados para reptiles (López González *et al.*, 2017 y 2019). Pensamos que la anómala posición del núcleo podría estar vinculada con la dinámica de proteínas que constituyen el citoesqueleto para determinar la ubicación del núcleo celular, por tanto, podrían ser consideradas como potenciales alteraciones citotóxicas. En general, para las especies analizadas, se puede observar que esta alteración ha sido una de las 3 alteraciones que mayor frecuencia ha presentado y constituye una importante proporción sobre el valor final de ANT. Esto refuerza la idea de que este último índice es valioso cuando puede

discriminarse la riqueza de las alteraciones que lo conforman, tal como ocurre con el RTL y los recuentos relativos para las variables celulares del leucograma.

Inversamente a lo observado con las Hn, los núcleos periféricos presentaron frecuencias considerablemente más elevadas en *P. domesticus* que en *C. picui*. Las poblaciones de gorriones de áreas agrícolas muestreadas días posteriores a la aplicación de plaguicidas, mostraron frecuencias significativamente mayores que las poblaciones de áreas naturales. Si bien es desconocido su mecanismo de formación y posteriores implicancias, pensamos que es importante sentar precedentes sobre un potencial biomarcador que puede resultar de interés a la hora de evaluar exposición a xenobióticos. El hecho de dilucidar su génesis podría aproximarnos a considerar potenciales efectos que producen los contaminantes en el metabolismo celular.

Basados en el análisis de componentes principales aplicado al ensayo MN-Citoma, se observa que las últimas dos alteraciones nucleares discutidas, los eritroplástidos y las células con núcleos periféricos, son las que más frecuentemente tienden a presentarse en poblaciones de gorriones y torcacitas que habitan áreas agrícolas luego de su fumigación. Es decir, existiría una asociación entre ambos tipos de alteraciones y los sitios con impacto antrópico, fenómeno que no ocurre con las poblaciones de áreas naturales protegidas. Estas últimas poblaciones no mostraron tendencia a ser caracterizadas por la expresión particular de alguna de las alteraciones nucleares analizadas. La posibilidad de contemplar estas relaciones y su repetibilidad en otras poblaciones expuestas ambientalmente a plaguicidas, podría representar un valor de alarma cuando la valoración individual de cada alteración nuclear pareciera no ser concluyente.

La actividad de la enzima ChE ha sido tomada en múltiples organismos como bioindicador de efecto y exposición a plaguicidas que pueden alterar sus funciones, y es el principal parámetro utilizado en comparaciones ante posibles procesos de exposición ambiental, especialmente en paseriformes y rapaces (Cobos *et al.*, 2006; Ruvacalba-Ortega *et al.*, 2017; Quero *et al.*, 2019). El uso de colinesterasas plasmáticas en comparación con la estimación de colinesterasas cerebrales aporta un método no cruento ni letal para realizar monitoreo de poblaciones silvestres que se intentan conservar.

Lo primero a ser destacado en nuestro estudio es la variabilidad de medias y diferencias que existen entre los niveles de actividad de ChE entre diferentes especies. Esto sugiere, que existe una condición intrínseca especie-específica de respuesta, por lo que debe ponderarse esta situación si las comparaciones se realizan con otras especies, aunque compartan ciertos escalafones taxonómicos. Si nos referimos a otras clases taxonómicas, por ejemplo, los mamíferos, la actividad de ChE también muestra diferencias amplias entre especies (Peterson y Talcott, 2013). En este estudio, el valor máximo detectado corresponde al Piciforme *Melanerpes cactorum* (5318 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$), y referidos a los paseriformes correspondió a *Pipraeidea bonariensis* (2517,5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$), los cuales superaron en 10y 4,7 veces respectivamente al valor medio mínimo detectado en los paseriformes *P. domesticus* ($532,48 \pm 25,8$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$) del mismo sitio de estudio (RNT). Algunos autores postulan que la filogenia es uno de los factores que puede explicar, en parte, la variabilidad en la actividad de la ChE (Roy, 2005), y que la ChE plasmática ha sido más influenciada por el genotipo de las aves que por el ambiente (Norte *et al.*, 2009).

El sexo, la edad, el estado fisiológico y reproductivo se han indicado como causas de variabilidad biológica en la actividad de la ChE plasmática en humanos, roedores y animales domésticos (Tecles *et al.*, 2001; Vaughan-Higgins *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2019). En aves, se ha reportado que diferentes sexos y edades difieren en su bioquímica enzimática y actividad fisiológica (Maul y Farris 2004, Roy, 2005; Norte *et al.*, 2009), pero no es una situación bien definida, dado que no siempre se han hallado diferencias (Zwarg *et al.*, 2012). En un estudio publicado y realizado de forma paralela con los resultados de este estudio, no se encontraron diferencias estadísticas entre los niveles detectados en gorriones adultos y juveniles o entre machos y hembras (Quero *et al.*, 2019). Sin embargo, cuando se agrupó a las aves según su tipo de dieta, se observó que las granívoras presentaban valores significativamente más bajos que las insectívoras. A nivel mundial, las aves granívoras pueden verse gravemente afectadas por varios insecticidas (BLI, 2018). Teniendo en cuenta los alimentos consumidos por la especie, podrían tomar relevancia los posibles agentes de riesgo para las aves. En las zonas agrícolas, las probabilidades de intoxicación en las aves están dadas por el tipo y la tasa de ingesta (EFSA, 2009). Sería importante contar con mayor cantidad de estudios que ayuden a definir mejor cuáles pueden ser las variables que resulten críticas a la hora

de valorar los resultados y la respuesta de la ChE plasmática como bioindicador ecotoxicológico (Ruvalcaba-Ortega, *et al.*, 2017).

Los menores valores de ChE plasmática lo presentaron la especie *P. domesticus* para todos los sitios de estudio, la especie con una convivencia cercana a las poblaciones y asentamientos humanos. Esta especie es un comensal obligado de los humanos sedentarios (Anderson, 2006). Se ha observado en otras especies de aves, que los grupos que convivían con humanos tenían niveles más bajos que los grupos sin contacto diario (Zwarg *et al.*, 2012). Por otro lado, en los estudios realizados por González-Escalante *et al.* (2013), *P. domesticus* parece ser la especie más sensible a la inhibición de la actividad de ChE entre las especies estudiadas. El valor promedio que hemos obtenido de la actividad de ChE para el gorrión doméstico que habitan el desierto del Monte ha sido menor al reportado en México para individuos de áreas no agrícolas: $1,379 \pm 0.338 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ ($n = 7$) y áreas agrícolas: $998 \pm 0,289 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ ($n = 7$). Además de su condición vinculada con el humano, esta disparidad de resultados sugiere que existen otros factores que pueden intervenir en los resultados finales obtenidos para este biomarcador. Autores como Roy (2005) han reportado variaciones intraespecíficas que oscilan entre el 10,6% y el 44,3% para otros órdenes de aves. Dada la variabilidad inter e intraespecífica, pensamos que en situaciones de biomonitorio resulta indispensable contar con niveles de actividad enzimática de ChEpre-exposición por especie. La importancia radica en poder contrastar valores en la ocurrencia de aves intoxicadas o cuando se pretenda evaluar en áreas agrícolas los efectos secundarios no deseados de los insecticidas anticolinesterásicos utilizados para fumigaciones.

Para el gorrión doméstico, se pudo observar que no existieron diferencias estadísticas entre los valores reportados para poblaciones de áreas naturales y áreas agrícolas, luego de la fumigación con insecticidas anticolinesterásicos. Es importante aclarar, en base a los potenciales factores que pueden afectar la actividad enzimática, que los muestreos fueron realizados en 2 años distintos, pero en la misma temporada de primavera, a fin de reducir las probabilidades de variación de este biomarcador por acción del clima y las temporadas de muda/ reproducción (Cobos *et al.*, 2010; Tsarpali *et al.*, 2020). Sin embargo, para el sitio Finca Maipú, se pudieron obtener resultados previos a la aplicación de CSF, lo que proporcionó información valiosa. Se evidencia una reducción significativa de un 53,3% en los individuos muestreados luego de la fumigación respecto a los capturados previo a este evento, lo que refuerza la premisa ya

expuesta en relación a la importancia de contar no solo con valores basales o referenciales por especie, sino también en momentos previos a la implementación de plaguicidas cuando la prioridad principal es realizar un biomonitoreo de un agroecosistema. De forma anecdótica puede destacarse que los animales recapturados no presentaron signos de intoxicación en la instancia porst-fumigación, a pesar de la reducción de actividad ChE plasmática detectada. Esta disminución, acompañada por la detección de trazas de CSF en tejidos, podría alertar sobre una exposición directa de los animales y humanos que habitan estos ecosistemas agrícolas.

En la torcacita común, la reducción de los niveles de actividad ChE plasmática fue más evidente. Las poblaciones de sitios agrícolas muestreadas luego de la fumigación, mostraron de un 34,1% y 47% menos actividad enzimática respecto a los valores descriptos para poblaciones de áreas naturales. Entre las poblaciones de sitios agrícolas, no se observaron diferencias estadísticas. En la población de FM pudo observarse una reducción significativa del 41,2% luego de la aplicación de CSF respecto del muestreo previo a la fumigación, valor que fue similar a la diferencia hallada respecto a las poblaciones de las reservas naturales. Estos resultados pueden sugerir, por un lado, que *C. picui* podría resultar una especie con mayor sensibilidad a demostrar alteraciones en este biomarcador ante eventos de exposición, en comparación con lo observado para *P. domesticus*. Datos bibliográficos sostienen que alcanzar niveles de inhibición del 50 al 70% de las colinesterasas plasmáticas podría desencadenar signos clínicos neurológicos que pondrían en riesgo la supervivencia de los individuos (Hill y Fleming, 1982; Mitra *et al.*, 2011). Si bien al momento del muestreo no se observó signología de intoxicación en los ejemplares capturados, basados en los datos expuestos, los niveles de reducción de ChE plasmática en torcacita común resultan alarmantes. Podría advertirse que múltiples aplicaciones de insecticidas anticolinesterásicos en los sitios donde desarrollan su vida estas aves podrían resultar en eventos de intoxicaciones agudas y envenenamiento de animales, si los tiempos de recuperación de las enzimas y los mecanismos fisiológicos de amortización no logran contrarrestar el efecto de los plaguicidas aplicados. En el peor de los escenarios, una subestimación o desconocimiento de lo que ocurre en estos ambientes podría resultar en la disminución o desaparición en el mediano plazo de las poblaciones y comunidades aviares que habitan estos agroecosistemas.

Las aves brindan una alerta temprana ante problemas ambientales; sus poblaciones son indicadores de la calidad ambiental, ya que el declive de sus poblaciones son indicadores de un ecosistema en colapso (Donald *et al.*, 2001; Iknayan y Beissinger, 2018). Existe cada vez más evidencia de que los insecticidas neurotóxicos están teniendo un efecto perjudicial en las aves que habitan las tierras de cultivo (BLI, 2008). A menudo, en aves silvestres resulta difícil confirmar la sospecha de intoxicación por plaguicidas anticolinesterásicos utilizando solo pruebas que miden la actividad de ChE en plasma, porque los valores de referencia en aves no expuestas suelen ser desconocidos (Zwarg *et al.* 2012), o incluso varían para la misma especie de un hemisferio a otro (Strum *et al.*, 2010). Los agentes anticolinesterásicos son los insecticidas más utilizados a nivel local, y el uso de grandes cantidades de OP y CB en Europa y América del Norte durante la última década ha tenido efectos negativos comprobados en la vida silvestre (Mañosa *et al.*, 2000). En los países en desarrollo, donde la regulación de estos plaguicidas es cuestionable, deberíamos evitar atravesar las mismas consecuencias.

Nos resulta importante destacar que se proponen por primera vez niveles de actividad enzimática de ChE plasmática para 32 especies de aves silvestres, entre ellas Paseriformes, Columbiformes, Psitaciformes y Piciformes que habitan en la región central de Monte. Se podrían considerar valores referenciales pre-exposición los descritos para 8 especies no expuestas de áreas naturales protegidas donde el n° de ejemplares fue ≥ 4 individuos: *C. picui*, *D. diuca*, *G. aurantioatrocristatus*, *M. bonariensis*, *P. domesticus*, *P. ornata*, *S. aurantirostris*, *T. melancholicusy*, *Z. capensis*. Dada la alta variabilidad interespecífica observada en aves silvestres, en las intoxicaciones por anticolinesterásicos, recomendaríamos también contar con niveles de actividad enzimática pre-exposición del sitio a biomonitorrear para poder cuantificar con mayor certeza las alteraciones en este biomarcador.

La importancia de utilizar diversos marcadores de punto final para el biomonitoreo de especies silvestres radica en que a partir de una única muestra no invasiva accedemos a un enfoque más completo y general que nos permite valorar los efectos y consecuencias que pueden manifestarlas especies en la interacción con los contaminantes. Si bien en el presente trabajo la respuesta de las colinesterasas plasmáticas pareciera ser los marcadores más sensibles en asociación con los insecticidas aplicados, es recomendable cotejar las alteraciones a otros niveles de

organización biológica para comprender y detectar otras alertas tempranas que indiquen potencial exposición a los mismos, en especial en aquellos ecosistemas que comparten con los seres humanos.

CAPÍTULO III

VALORACIÓN DE BIOMARCADORES EN CODORNIZ COMÚN (*Coturnix coturnix*) ANTE LA EXPOSICION A CLORPIRIFOS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN INCUBACIÓN ARTIFICIAL

INTRODUCCIÓN

La historia del impacto ambiental de los plaguicidas, y en especial la protagonizada por los compuestos organoclorados y OF, llevó a los ecotoxicólogos a gestar la idea de un diseño experimental en bioterio para testear y contrastar los datos obtenidos a campo en aves de ambientes silvestres y agrícolas impactados. Los estudios ecotoxicológicos en laboratorio ofrecen la posibilidad de conocer los efectos tóxicos inducidos por un compuesto o una mezcla específica bajo el control de múltiples variables, aunque carecen del realismo generado por las características e interacciones propias que se llevan a cabo en un ambiente natural. A su vez, los estudios a campo permiten analizar una situación real, pero con la limitante de no poder sopesar diferencialmente la influencia de cada factor ambiental sobre el efecto del tóxico (Geiser *et al.*, 2000).

Los ensayos experimentales en aves han sido exitosos utilizando diversas especies como la codorniz, aves acuáticas y al menos 5 tipos de passeriformes diferentes (Cordi *et al.*, 1997), durante y luego de la aplicación de plaguicidas agrícolas. En un estudio realizado por Raimondo *et al.* (2007) se relevaron datos de toxicidad aguda que fueron tomados en distintas especies de aves como modelos de laboratorio. El objetivo

principal fue identificar cuáles especies pueden ser las más indicadas a la hora de realizar ensayos que pretenden simular lo que sucede en situaciones reales en el ambiente, y con resultados plausibles de ser adaptados a poblaciones de aves silvestres. Con estos datos, se obtuvo un índice a partir de modelos de estimación de correlación interespecies, con un programa diseñado por la EPA (2016). Se estima que la codorniz común (*Coturnix coturnix*) podría ser un modelo sustituto apropiado para valorar exposiciones y efectos en otras familias de aves, como por ejemplo los Paseriformes silvestres.

La codorniz pertenece, junto a las gallinas, los faisanes y los pavos a la superfamilia *Phasianoidae* y al orden de las Galliformes. Son aves de pequeño tamaño y precociales, dado que nacen con capacidad de desplazarse y emplumados, además de alcanzar la madurez sexual en un breve periodo de tiempo de entre 35 y 42 días para los machos, mientras que las hembras comienzan su postura alrededor de los 40 días (Barbado, 2004). El dimorfismo sexual es poco notorio entre machos y hembras, y se centra especialmente en el plumaje que se visualiza en los individuos adultos sobre la región de los músculos pectorales, donde la hembra muestra un contorno inferior poblado de plumas amarillentas divididas por un rafe fino de tonalidad casi blanca que contrasta con las plumas negras que se encuentran a cada lado con forma de punta de flecha. Los machos presentan una coloración marrón rojiza con plumas de contornos menos definidos (Bissoni, 2000) (Figura 26).

Después de la gallina, la codorniz ha sido considerada en los últimos 50 años como un modelo de laboratorio útil y popular. Su rápido crecimiento y desarrollo, su facilidad para la cría, su corta vida media y fisiología comparable con la del humano, además del rápido desarrollo embrionario la han convertido en modelos apropiados para estudios de patologías y del envejecimiento (Raimondo *et al.*, 2007; Huss *et al.*, 2008). Las líneas actuales, producto de la selección artificial, han logrado obtener animales que tienen una capacidad de postura promedio de hasta 300 huevos por año (Bissoni, 2000).

Se ha validado el uso de la codorniz para evaluar el efecto embriotóxico de plaguicidas en huevos (Martin, 1990; Ismail, 2012; Farhat *et al.*, 2020). La embriotoxicidad es la capacidad que presenta un agente tóxico de producir efectos adversos en la progenie, con posibilidad de abarcar desde la fecundación hasta la

finalización del período fetal. Los efectos pueden incluir defectos del desarrollo no hereditarios (teratogénesis), disfunciones, muerte pre y perinatal, alteraciones del crecimiento y funciones posnatales alteradas. En toxicidad del desarrollo, se ha evaluado la potencial exposición tóxica de contaminantes en huevos de aves y la sensibilidad neonatal de los polluelos a estos contaminantes, incluyendo compuestos químicos utilizados para el control de malezas acuáticas (herbicidas) y mosquitos (insecticidas), entre otros. El fenómeno de afinamiento o adelgazamiento de la cáscara del huevo, la disminución de la productividad y la mortalidad de aves a campo se han utilizado como instrumentos útiles para alertar sobre los peligros que representan los plaguicidas aplicados en condiciones no controladas (Hoffman y Albers, 1984; Ohlendorf *et al.*, 1986; Martin, 1990; Uggini y Suresh, 2013). En estos casos, la determinación del grosor de la cáscara de huevo roto para la evaluación del efecto de los plaguicidas organoclorados tendría valor diagnóstico, ya que fue uno de los biomarcadores inicialmente usados que aún sigue vigente (Ratcliffe, 1970).

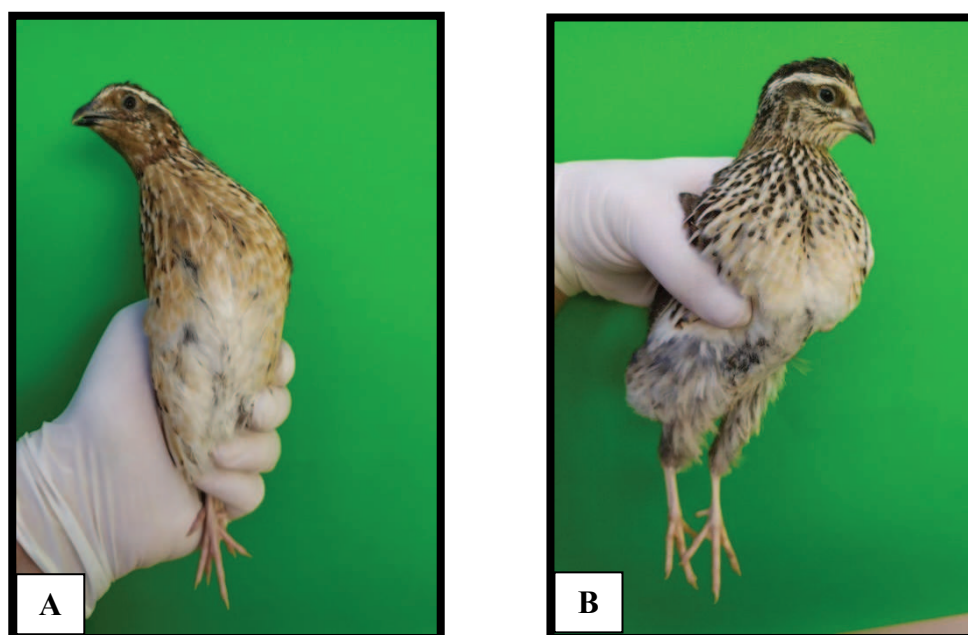


Figura 26. Ejemplares de codorniz común (*Coturnix coturnix*). (A) Ejemplar macho;(B) Ejemplar hembra.

La cuantificación analítica de plaguicidas en tejidos de aves y huevos es parte de un estudio integral en la evaluación de los efectos ecotoxicológicos (Hoffman, 1990). Una aproximación muy utilizada resulta la medición de enzimas acetil y

butirilcolinesterasas en tejidos de individuos afectados (Thompson, 1999), ya que los OF y CB son inhibidores de estas enzimas. Este último biomarcador analizado en sangre resulta una alternativa poco invasiva y menos cruenta que otros marcadores.

El presente estudio comprende una valoración experimental en pichones de codorniz expuestos durante su incubación artificial, para evaluar el efecto de uno de los plaguicidas más utilizados en las zonas frutihortícolas de Mendoza, el insecticida CPF (Ferré *et al.*, 2018b), sobre parámetros de genotoxicidad, embriotoxicidad y teratogenicidad. Respecto al análisis de riesgos que implica el CPF en las aves, existe una cantidad muy limitada de reportes referidos a sus efectos (Khan *et al.*, 2020).

El destino ambiental de los OF y CB, su disposición y los efectos tóxicos para la avifauna silvestre son aspectos que motivaron el desarrollo del presente diseño experimental. La necesidad de conocer cómo el CPF puede afectar la instancia del desarrollo embrionario en aves, sumado a la imposibilidad de obtener huevos de aves silvestres desde sus ambientes naturales por el potencial impacto negativo que esto podría producir en las poblaciones locales, condujo al uso de la codorniz como modelo experimental. La aplicación de CPF sobre los huevos en incubación, a concentraciones diferentes y durante días claves del desarrollo del embrión, podría alterar diferentes biomarcadores que alertarían sobre el efecto perjudicial para el desarrollo y la supervivencia de los pichones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo y condiciones experimentales

Los procedimientos de incubación fueron diseñados siguiendo las sugerencias expuestas por Romao *et al.* (2008), Moraes *et al.* (2008) y Galíndez *et al.* (2009). El experimento a presentar fue reproducido en 2 incubaciones.

Recolección y almacenamiento de huevos

1. En un criadero local de codornices de escala familiar, se seleccionaron 15 codornices adultas (12 hembras y 3 machos) para la provisión de huevos fértiles. Todos los ejemplares presentaban buen estado de salud a la inspección clínica, se encontraban en el establecimiento desde un tiempo mayor a 1 año y sometidos a las mismas condiciones de manejo, alimentación y plan sanitario. La recolección de huevos se realizó una semana después de la comprobación visual de cópulas entre machos y hembras. En el mes de octubre fueron recuperados los huevos para el primer ensayo y en el mes de febrero para el segundo. Ambos ensayos se establecieron dentro de la misma temporada de postura.
2. Los huevos se recolectaron entre los 10 y 2 días previos al inicio de la incubación. Este tiempo de envejecimiento es adecuado para garantizar la viabilidad de al menos el 80% de los huevos potencialmente fecundados, y sin que presenten diferencias evidentes durante el desarrollo embrionario en los 18 días de incubación que requiere esta especie.
3. Los huevos se almacenaron en una habitación oscura y a temperatura ambiente, con rango entre 10 a 15°C y humedad entre 70-80%.
4. Los huevos fueron mantenidos en posición vertical en maples, con el polo menor hacia arriba.

Recepción y clasificación

1. En el laboratorio, todos los huevos fueron desinfectados por inmersión de 10 seg en agua clorada al 5% y temperatura de 35-38°C, a fines de realizar desinfección superficial de la cáscara y evitar problemas de contaminación bacteriana durante la incubación.

2. Todos los huevos fueron pesados en balanza analítica (error $\pm 0,01g$) y medidos longitudinalmente con calibre digital (Figura 27).
3. Grupos experimentales: para la conformación de los grupos experimentales fueron seleccionados todos aquellos huevos que presentaron un peso entre los 8 y 12 g. Se pudo utilizar un número total de 109 huevos, priorizando la conformación de los grupos tratados con CPF y controles positivos. Los huevos fueron asignados al azar en cada grupo. Los grupos experimentales fueron en total 15, conformados por 4 huevos cada uno, debido a la capacidad máxima de la incubadora (60 huevos) y, de acuerdo a la combinación entre la concentración de CPF recibida y el día de incubación escogido para realizar la exposición al plaguicida.

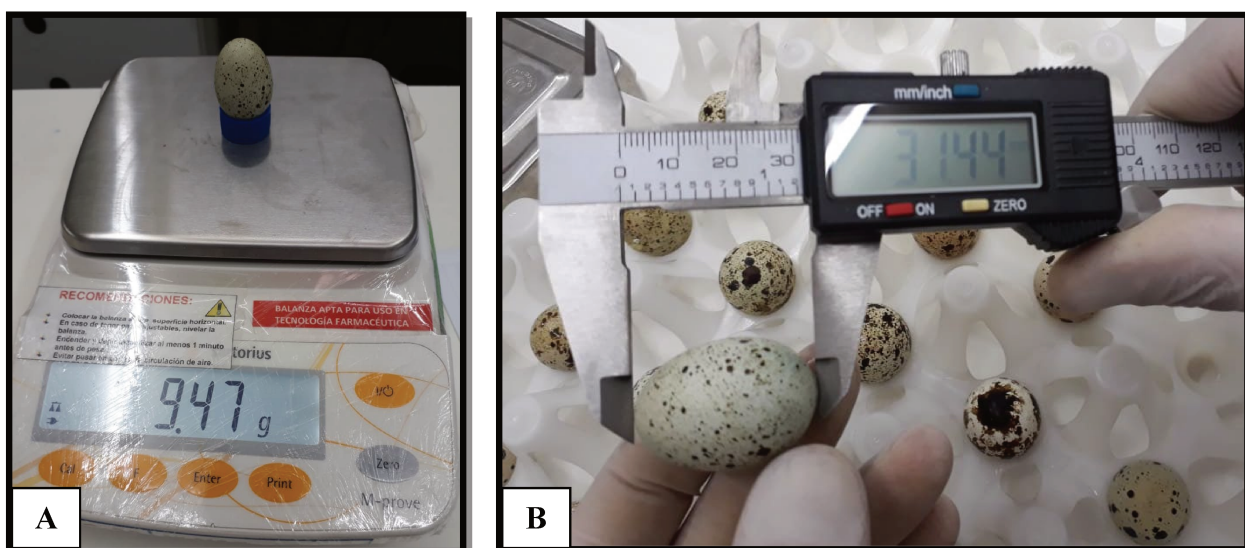


Figura 27: Toma de variables en huevos de codorniz común previo a la incubación. (A) Pesaje de huevos en balanza analítica; (B) Medición del eje longitudinal del huevo con calibre digital.

Exposición

1. De acuerdo con la concentración de exposición se conformaron 5 categorías de grupos:
 - “Control negativo” (C-): aplicación de agua destilada.
 - “Control positivo” (C+): aplicación del genotóxico Mitomicina C (MitC) a concentración de 0,1mg/huevo en un volumen total de 0,2 ml/huevo. Esta concentración es sugerida como aquella a partir de la cual puede

presentarse potencial efecto genotóxico y resulta menor a la DL₅₀ establecida para aves (Wolf y Luepke, 1997).

- “Clorpirifos 1X” (CPF 1X): aplicación de formulación comercial Pirfos 48% (Icona®- Clorpirifos 48%). A este grupo se le aplica una concentración de 38,4 µg/huevo equivalente a la concentración de 96 gr/ha. Esta última concentración refiere a la sugerida por prospecto para la aplicación a campo sobre frutales no cítricos (150-200 cm³/hl), de acuerdo con la cantidad de principio activo disponible por cm² de superficie plana sobre el follaje.
 - “Clorpirifos 5X” (CPF 5X): aplicación de formulación comercial Pirfos 48% (Icona®- Clorpirifos 48%). A este grupo se le aplica una concentración de 192 µg/huevo equivalente a concentración de 480 gr/ha. Esta refiere a una concentración 5 veces mayor a la sugerida por prospecto para la aplicación a campo sobre frutales no cítricos.
 - “Clorpirifos 10X” (CPF 10X): aplicación de formulación comercial Pirfos 48% (Icona®- Clorpirifos 48%). A este grupo se le aplica una concentración de 384 µg/huevo, equivalente a la concentración de 960gr/ha. Esta refiere a una concentración 10 veces mayor a la sugerida por prospecto para la aplicación a campo sobre frutales no cítricos.
2. De acuerdo con los días de exposición al plaguicida, se establecieron 3 categorías para cada grupo mencionado anteriormente, según lo referenciado por Martin (1990):
- Día 1 (D1). Exposición al iniciar la incubación. El huevo fecundado antes de la oviposición ha atravesado los estados de clivaje, formación del área pelúcida y del hipoblasto, a fin de establecer el eje embrionario (Hamburger y Hamilton, 1992). Posterior a la oviposición, los huevos permanecen en estado “latente” hasta que las condiciones de incubación sean las adecuadas, a fin de retomar el desarrollo embrionario. En el día 1 de incubación se produce la reactivación del desarrollo embrionario, por tanto, es considerado como uno de los días claves para realizar la exposición. Asumimos que la totalidad de los huevos se encuentran en el mismo estado de desarrollo embrionario al momento de iniciar la incubación.

- Día 4 (D4). Este día sugiere ser clave, dado que en la codorniz común es cuando inicia el proceso de la organogénesis.
- Día 14 (D14). Este día sugiere ser clave, dado que en la codorniz común inicia el crecimiento corporal acelerado del embrión.

Se diagrama a continuación el diseño bajo el cual fueron conformados los grupos experimentales en base a las condiciones explicadas:

Día de incubación	Tratamientos y concentraciones				
	<i>Control (-)</i> 0 µg/H	<i>Control (+)</i> <i>MitC</i> 0,1 mg/huevo	<i>Clorpirifos</i> 38,4 µg/H (1x)	<i>Clorpirifos</i> 192 µg/H (5x)	<i>Clorpirifos</i> 384 µg/H (10x)
Día 1 (D1)	Grupo D1.C-	Grupo D1.C+	Grupo D1.1X	Grupo D1.5X	Grupo D1.10X
Día 4 (D4)	Grupo D4.C-	Grupo D4.C+	Grupo D4.1X	Grupo D4.5X	Grupo D4.10X
Día 14 (D14)	Grupo D14.C-	Grupo D14.C+	Grupo D14.1X	Grupo D14.5X	Grupo D14.10X

µg/H: gramos/huevo; mg/H: miligramos/huevo

3. Aplicación de CPF: El método de aplicación del insecticida fue mediante múltiples topiaciones con micropipeta sobre la cáscara del huevo. En la superficie libre de cada huevo que sobresale del maple de incubación se aplicaron 40 gotas de 1µl/ huevo. Con ello se intentó simular la aplicación sugerida a campo para CPF en frutales por pulverización, que consta de 20 gotas de 2 µl/cm² de superficie plana.

La aplicación se realizó por única vez durante en el día preestablecido y sobre la superficie visible del huevo, bajo la hipótesis que, en situaciones a campo, un huevo recibiría una aplicación directa del plaguicida sobre su superficie libre, mientras que el resto de la superficie en contacto con el nido quedaría resguardado (Figura 28).

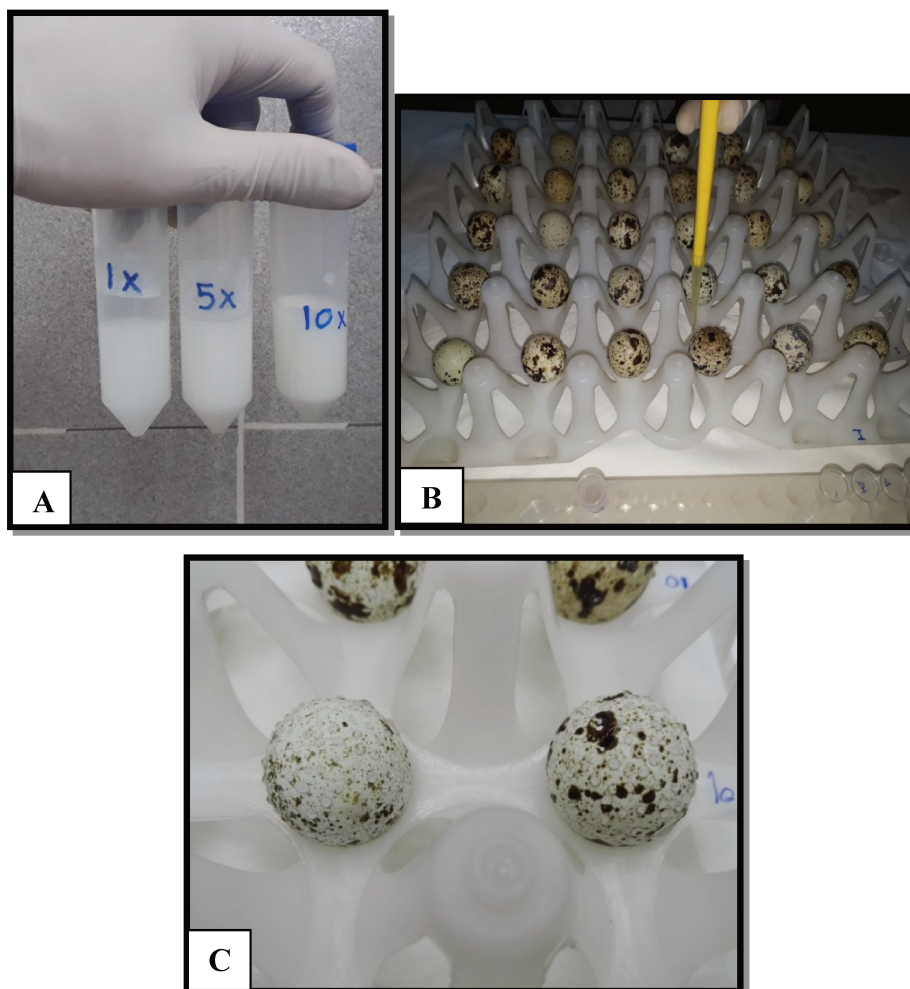


Figura 28. Procedimiento de la aplicación de plaguicidas sobre la superficie de huevos de codorniz común. (A) Diluciones de clorpirifos (Pirfos 48- Icona®) aplicadas: 38,4 $\mu\text{g}/\text{H}$ (1X), 192 $\mu\text{g}/\text{H}$ (5X) y 384 $\mu\text{g}/\text{H}$ (10X); (B) Proceso de múltiples topicaciones sobre superficie libre del huevo colocado en maple de incubación; (C) Apreciación de múltiples gotas por topicación sobre superficie libre de los huevos.

Parámetros de incubación

1. Temperatura de incubación: $37,5 \pm 0,5$ °C.
2. Humedad: 60 – 70% hasta el día 13 de incubación. A partir del día 14 la humedad se aumentó a 80%.
3. Rotación: Los huevos se mantuvieron en posición vertical, con la cámara de aire hacia arriba (polo mayor) e inmóviles hasta el día 4 de incubación. Posteriormente se implementó un sistema de rotación automatizado cada 2 h hasta el día 14.

4. Eclosión: En el día 15, los huevos fueron transferidos a canastas nacedoras, separados por grupos, y mantenidos en el interior del sistema de incubación hasta el momento de la eclosión de los pichones.

Eclosión, toma de muestras y eutanasia

1. La eclosión de los pichones se produjo entre los días 17 y 18 de la incubación de forma natural y espontánea, sin manipulación para facilitar el proceso. Los huevos que no presentaron signos de eclosión o con eclosión detenida (picaje de la cáscara) y sin movimiento del pichón fueron abiertos al final del ensayo en el día 18.
2. Según el estado final del huevo/pichón, se establecieron 4 categorías: “huevos infértiles”, los cuales no evidenciaron el proceso de embriogénesis; “muertes embrionarias”, determinado por la visualización de pichones con interrupción de la embriogénesis antes del día 18; “eclosión fallida”, determinada por pichones que completaron la embriogénesis, pero fallaron en eclosionar y consecuentemente murieron y; “eclosión efectiva”, que refiere a los pichones nacidos vivos.
3. En base a un estudio paralelo realizado en el marco de esta investigación, donde describimos las características morfológicas del pichón de codorniz a lo largo de su incubación artificial (Robbio, 2021), se pudo estimar el día en el cual se efectuó la muerte embrionaria.
4. Cada pichón fue retirado de la canasta nacedora y evaluado externamente en búsqueda de alteraciones morfológicas sobre estructuras visibles: cabeza, ojos, pico, cuello, alas, tórax, abdomen, raquis, patas y cloaca. Posteriormente, fue pesado en balanza analítica.
5. Muestra de sangre: Se aplicó una gota de heparina sobre el talón y se realizó una punción sobre el talón con aguja 30G. La sangre fue recolectada con capilar heparinizado hasta contar con 1 o 2 capilares llenos en al menos un 50% de su capacidad. Las muestras de sangre fueron procesadas para la realización de 2 frotis sanguíneos por individuo, determinación de hematocrito y separación de plasma para la determinación de actividad ChE plasmática de acuerdo con lo especificado en Materiales y Métodos del Capítulo 2 del presente estudio.

6. Eutanasia: Los pichones fueron colocados en cámara cerrada acoplada por válvula a tubo de CO₂. La eutanasia se ejecutó por saturación de la cámara con el gas, produciendo un volteo y un paro cardiorrespiratorio del animal en menos de 15 seg. Para huevos no eclosionados y a fin de asegurar el deceso del ejemplar, antes de la apertura de la cáscara se implementó un método eutanásico por enfriamiento en congelador a -4°C por 1 h. Estos métodos son los recomendados por la DGXI de la Comisión Europea, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (UE, 2010).
7. El animal ya eutanasiado fue inmediatamente transferido a una placa de análisis en donde se determinó la longitud tarsal y cráneo-caudal con calibre digital.
8. Disección y biopsias para estudio histopatológico (Figura 29): El pichón fue montado en placa de telgopor en posición ventrodorsal. Luego de humedecer el plumón se procedió con la apertura de la cavidad celómica con tijeras y bisturí. Con ayuda de agujas 25G se procedió a aislar y extraer por completo el hígado sin generar daños en la estructura parenquimatosa. Para la localización de los riñones, se retiraron vísceras digestivas (intestino delgado, grueso y estómagos glandular y muscular). Se localizaron en proximidades del foramen oval y a los laterales de la columna lumbar. Los riñones fueron extraídos de igual manera que el hígado diseccionando cuidadosamente la serosa que los recubre e intentando conservar su estructura en racimos. Los órganos fueron colocados en canastas de biopsias rotuladas e individualizadas por cada ejemplar muestreado.
9. Las cáscaras de los huevos que habían sido analizados se conservaron en heladera a 4°C hasta su posterior estudio. A cada cáscara se la separó de la membrana que recubre su cara interna. Se tomó una porción de cáscara del polo mayor del huevo, el cual estuvo en contacto directo con el plaguicida durante su aplicación, y mediante un calibre micrómetro se determinó su espesor (Figura 30). Se determinó la media y el error estándar del grosor de la cáscara para cada grupo experimental.

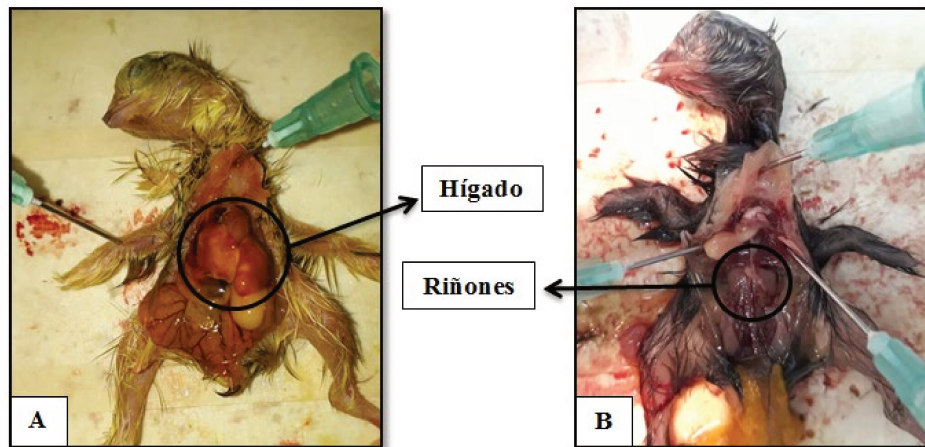


Figura 29. Disección de pichones de codorniz común recién nacidos para realizar estudios histopatológicos de órganos. (A) Zona de visualización del hígado. (B) Zona de visualización de ambos riñones.

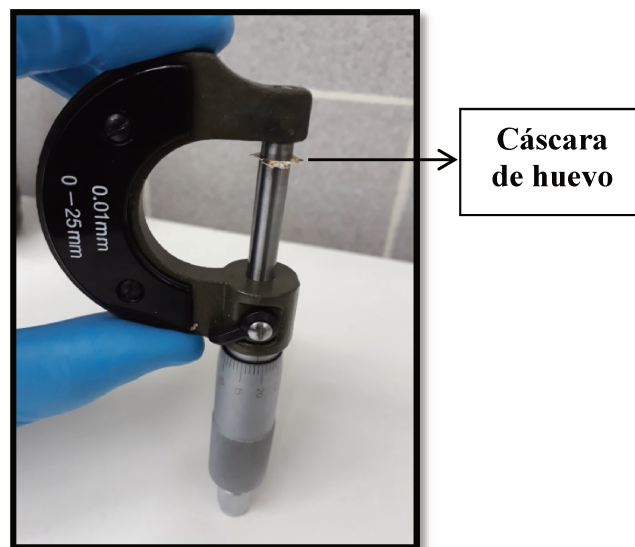


Figura 30. Método de medición del grosor de la cáscara de huevo de codorniz con calibre micrométrico

Estudios Histopatológicos

1. Las muestras de hígado y riñón fueron conservadas en solución de formaldehído 4% durante 48 h.
2. Los tacos para histopatología fueron elaborados de acuerdo al siguiente procedimiento de deshidratación e inclusión en parafina de las biopsias obtenidas:
 - Inmersión en alcohol 50° durante 2 h

- Inmersión en alcohol 70° durante 2 h
 - Inmersión en alcohol 90° durante 2 h
 - Inmersión en alcohol 96° durante 2 h
 - Inmersión en alcohol 100° durante 1 h
 - Inmersión en xilol 1 durante 1 h
 - Inmersión en xilol 2 durante 1 h
 - Inmersión en parafina 1 durante 1 h
 - Inmersión en parafina 2 durante 1 h
3. Las muestras obtenidas fueron incluidas en parafina líquida en tacos de tamaño de 1 cm³.
 4. Cada taco fue cortado mediante micrótopo manual y se elaboraron 2 vidrios con 3 cortes por cada muestra.
 5. Coloración: Hematoxilina-Eosina. (Biopur[®])
 6. Montaje y conservación: inclusión del portaobjetos con Bálsamo de Canadá y sellado con cubreobjetos.
 7. Las características histológicas de referencia del hígado y el riñón fueron establecidas a partir de la observación de muestras obtenidas de los grupos Control (-).
 8. **Análisis microscópico de muestras de hígado:** La evaluación de cada portaobjeto con 3 cortes histológicos fue realizado mediante microscopía óptica. Para cada análisis se utilizó el corte central, o en caso de no poder utilizarlo, se escogió el corte con mejor estado de conservación y calidad del tejido. Cada corte fue evaluado en dos aumentos: 100X y 400X. Para cada aumento se analizaron 3 campos microscópicos al azar por muestra. Se realizó una valoración semi-cuantitativa de diferentes grados de daño tisular. El número asignado a cada categoría responde en orden de menor a mayor severidad de daño descripto (Arrieta-Mendoza *et al.*,2007). Los parámetros evaluados y sus categorías fueron:
 - *Simetría de estructura* (100X): La asimetría se evaluó en virtud del orden/desorden trabecular y la dilatación de capilares. Simetría normal (0), asimetría que afecta a menos del 25% del área de los campos observados (1), asimetría que afecta entre el 25 al 50% de los campos observados (2), asimetría que afecta entre el 50 al 75% de los campos observados (3) y,

asimetría generalizada y equivalente a más del 75% del área de los campos visualizados (4).

- *Simetría de color*: se evaluó por la presencia de acidofilia (necrosis tisular) presente en el campo de observación (40X). Ausencia de la alteración (0), acidofilia en menos del 25% del área de los campos observados (1), área afectada aproximada del 25 al 50% (2), área afectada entre el 50-75% del campo observado (3) y, afección generalizada y equivalente a más del 75% del campo visualizado (4).
- *Dimensión del espacio sinusoidal* (400X): Espacio sinusoidal conservado (0), espacio sinusoidal aumentado con hepatocitos conservados (1), espacio sinusoidal aumentado con hepatocitos lesionados (2). El aumento del volumen del líquido en la luz del espacio sinusoidal y el estado de conservación de las células da cuenta de la magnitud de daño en el tejido.
- *Vacuolización del citoplasma* (400X): Prevalencia de citoplasmas con microvacuolas (1), prevalencia de citoplasmas con macrovacuolas (2), prevalencia de citoplasmas destruidos (3). Dado que la presencia de vacuolas en hepatocitos es esperable, la valoración se realizó en función al tamaño de las vacuolas en citoplasmas y su estado de conservación.
- *Estado de conservación del citoplasma* (400X): Citoplasmas conservados (0), Destrucción grado 1(1); destrucción grado 2 (2), destrucción grado 3 (3). Se estableció como grado 1 cuando la destrucción de los citoplasmas se encontraba restringida a sitios focales, por ejemplo, alrededor de las trabéculas; grado 2 cuando la destrucción de los citoplasmas era parcial, pero con un patrón diseminado en el tejido; grado 3 cuando la destrucción de los citoplasmas era total y diseminada.
- Estado de conservación de los núcleos (400X): Prevalencia de núcleos en picnosis en menos del 30% del campo analizado (0), prevalencia de picnosis entre el 30-60% del campo observado (1), prevalencia de picnosis mayor al 60% del área analizada (2), prevalencia de picnosis y cariólisis en más del 60% del campo visualizado (3).

9. **Análisis microscópico de muestras de riñón:** Tal como se explicó en la introducción, la estructura renal en aves es más compleja que en mamíferos y la

disposición de las estructuras no permite un claro establecimiento de límites entre regiones de médula y corteza. Se estableció la misma metodología de observación por campos microscópicos que en hígado y se observaron 9 estructuras diferentes: En la corteza se observó la nefrona, conformada por *glomérulo*, *capsula glomerular* y *espacio de Bowman*; túbulos corticales compuestos por el *túbulo contorneado proximal*, *túbulo contorneado distal* y el *intersticio corteza/médula*. En el cono medular se pudo identificar el *intersticio*, los *túbulos colectores* y el *asa de Henle*.

De acuerdo con Çakıcı (2015) se analizó en cada una de estas estructuras la presencia de las siguientes lesiones: *hemorragia*, *edema*, *infiltración*, *hipertrofia*, *vacuolización*, *retracción*, *fibrosis*, *desprendimiento epitelial*, *cariolisis* y *necrosis*. Cada lesión fue valorada en 4 categorías a las cuales se le asignó un valor numérico de acuerdo con la severidad y área de extensión en el campo observado: ausencia (0), leve (1), moderado (2) y severo (3). Para cada individuo analizado, y de acuerdo con las valoraciones de daño establecidas para cada estructura, se realizó una sumatoria de puntaje para valorar cualitativa y cuantitativamente el nivel de daño general en tejido renal. Finalmente se obtuvieron los rangos de puntaje referidos a lesión renal, cantidad de estructuras renales afectadas y cantidad de lesiones diferentes observadas por grupo de individuos en virtud de los días y concentración de exposición.

Análisis de genotoxicidad: Ensayo de Micronúcleos- Citoma en eritrocitos

Para el análisis de genotoxicidad se realizaron 2 frotis por individuo a partir de la muestra de sangre obtenida de todos los pichones que lograron eclosionar vivos en este ensayo. El procedimiento de fijación, coloración, análisis y criterios de identificación fueron idénticos a los implementados en los ensayos de genotoxicidad para aves silvestres, descritos en Materiales y Métodos del Capítulo 2 de este estudio. Los valores finales para cada biomarcador y por cada individuo se expresaron como frecuencia de alteración nuclear por cada 1000 eritrocitos observados. Se obtuvo la media y el error estándar para cada grupo experimental.

Análisis de actividad de colinesterasas plasmáticas

Para el análisis de colinesterasas plasmáticas se extrajo la muestra de plasma sanguíneo desde los capilares recolectados con muestra de sangre. La metodología usada fue idéntica a la implementada para el análisis de colinesterasas en aves silvestres expuesta en Materiales y Métodos del Capítulo 2 de la presente tesis. Luego de determinar los valores individuales, se obtuvo la media y el error estándar para cada grupo experimental. El ensayo de linealidad se llevó a cabo con el plasma de un individuo perteneciente a uno de los grupos controles negativos. Esta muestra fue escogida por presentar un volumen suficiente que permitió realizar las determinaciones por triplicado. A partir de esta muestra (100%) se realizaron cuatro diluciones de plasma del 50,00%; 25,00%; 12,50% y 6,25%, empleando solución isotónica de cloruro de sodio. Se obtuvo el valor medio \pm desvío estándar (DE) por dilución y el coeficiente de variación.

Análisis estadístico

Para la cantidad de huevos infértiles, muertes embrionarias, fallas en la eclosión, pichones nacidos vivos y pichones con anomalías morfológicas visibles se obtuvieron los valores totales absolutos por grupo y, se calcularon los valores medios con sus respectivos desvíos estándar para las variables peso del pichón y longitud tarsal.

Para el análisis de las variables categóricas y cuali-cuantitativas en los estudios histopatológicos de hígado se obtuvo la moda como medida de tendencia central para cada individuo, a fin de conformar un rango de categoría que exprese el grado de lesión tisular por cada grupo experimental. Para analizar si existe una asociación entre concentración o días de exposición y las categorías de lesiones observadas, se implementó un Análisis de Correspondencia Múltiple, el cual opera en base a una matriz de desviaciones Chi cuadrado.

Para el análisis de las variables que comprenden los estudios histopatológicos de riñón, se analizó de acuerdo a la moda cuáles fueron las 2 estructuras renales más afectadas y cuáles fueron las 2 lesiones con mayor frecuencia de observación. En base a las categorías establecidas de acuerdo con la severidad y extensión de las lesiones, se aplicó un Análisis de Correspondencia Múltiple, con la finalidad de analizar si existe

asociación entre estas categorías de lesiones y las concentraciones o el día de exposición. Los análisis estadísticos anteriormente detallados fueron realizados en el software InfoStat versión 2016 (Di Renzo *et al.*, 2016).

Para el análisis de los biomarcadores de actividad de la enzima ChE plasmática y de genotoxicidad, se obtuvieron los valores medios y desvíos estándares por cada grupo experimental. Para estimar si hubo efecto de la concentración o el día de exposición sobre los valores de ChE plasmáticos y las frecuencias de alteraciones nucleares eritrocitarias, se analizaron los resultados por medio de una prueba de hipótesis bajo modelos lineales independientes (GLM). De forma separada, se implementaron dos modelos, donde se colocó la actividad ChE y las alteraciones nucleares (MN, Y, B, Hn, Np, E) como variable respuesta, mientras que los días de exposición y las concentraciones fueron las variables predictoras. Para este análisis se utilizó el Software R Development Team (2018) con la aplicación del paquete lme4 (Bates *et al.*, 2015).

Consideraciones éticas

La metodología empleada ha sido evaluada y aprobada por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, Investigación y Docencia CICUALID de la Universidad Juan Agustín Maza bajo Protocolo N°119/ Año 2016.

RESULTADOS

Finalizada la incubación, se obtuvieron los valores absolutos de huevos, embriones y pichones para las 4 categorías establecidas, además de la valoración de los parámetros “peso del pichón” y “longitud tarsal” para cada grupo experimental (Tabla 5).

Para el total de huevos fértiles en el estudio (n= 88), fueron registrados 13 eventos de muerte embrionaria durante el proceso de incubación. Diez eventos ocurrieron en grupos expuestos bajo alguna concentración de CPF, mientras que los restantes se registraron dentro de los grupos expuestos al control positivo de genotoxicidad, con MitC. Ninguna muerte embrionaria fue observada en los grupos control negativo. De acuerdo con la concentración de exposición, el tratamiento con CPF 5X es la que mayor cantidad de muertes embrionarias registró (6 de los 13 eventos).

El estado del desarrollo embrionario permitió identificar que las muertes se produjeron en diferentes días de la incubación, incluso siendo en instancias posteriores al día de exposición, tal como puede ser observado en la Figura 31. La mayor cantidad de muertes embrionarias se registraron a partir del tratamiento en el día 4 (9 de los 13 eventos).

Respecto a las eclosiones fallidas, se registraron un total de 5 eventos, de los cuales 3 fueron pertenecientes al grupo control positivo expuestos a MitC y sólo 2 corresponden a grupos tratados con CPF, a concentración de 384 µg/ huevo el día 1 de incubación y a concentración de 38,4 µg/ huevo el día 14 de incubación (Tabla 5).

Entre los pichones nacidos vivos para los distintos grupos experimentales, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para las variables “peso” y “longitud tarsal”. Sin embargo, se observó que el número de individuos nacidos vivos con anomalías fue más elevado en los grupos tratados durante el día 14 de incubación con diferentes concentraciones de CPF respecto a los grupos controles negativo (Tabla 5). Las anomalías presentadas fueron casi en su totalidad referida a los miembros posteriores, caracterizadas por alteraciones en los aplomos, como afección de la articulación coxofemoral, retracciones flexurales y/o edema en patas, mientras que sólo 1 individuo presentó ventroflexión de cuello con imposibilidad de adoptar una posición

ventrodorsal o mantenerse en estación (Figura 32). De estos ejemplares con anomalías, el 26,7% fueron expuestos a Mitomicina C, mientras que el 66,6% fueron individuos expuestos a distintas concentraciones de CPF.

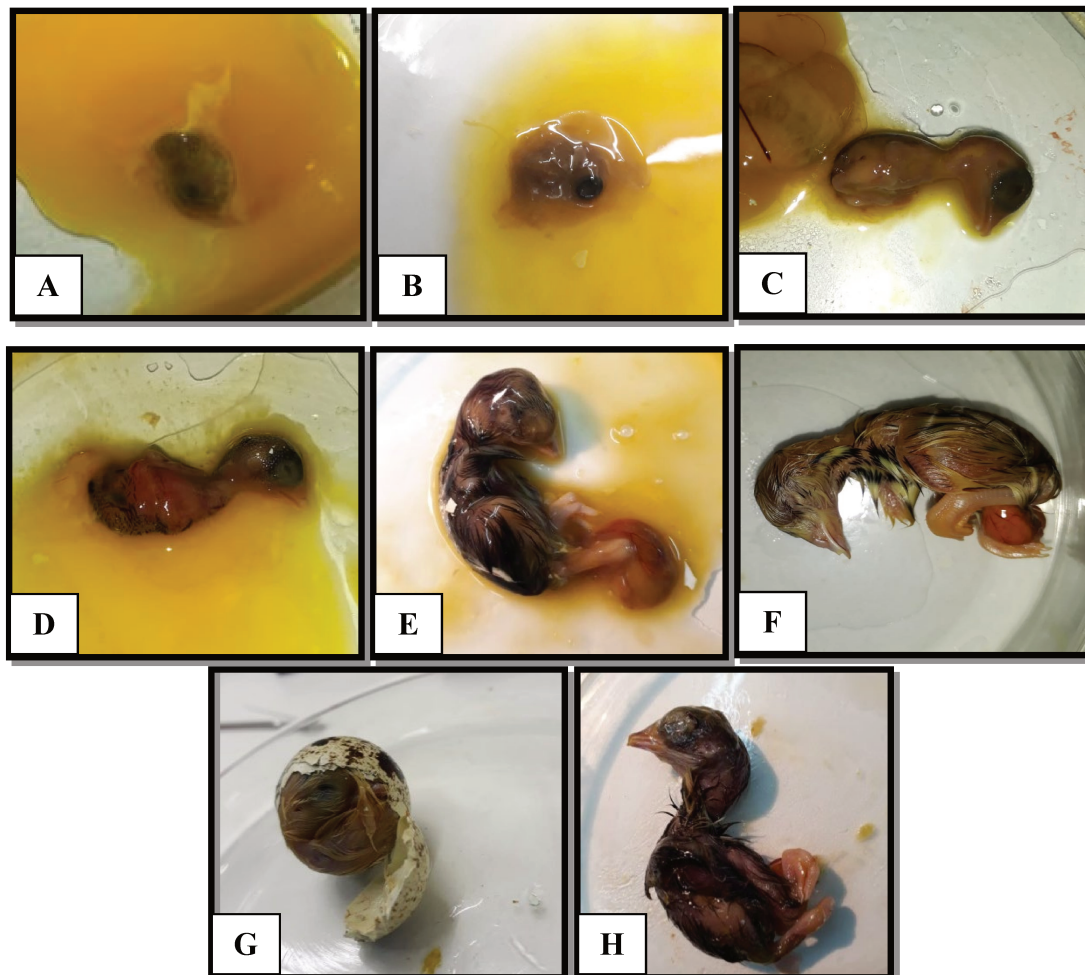


Figura 31. Registro fotográfico de embriones y pichón de *Coturnix coturnix* con eclosión fallida luego de una exposición por topicación con clorpirifos durante la incubación artificial. (A) Embrión con estimación de 3 días de desarrollo (Grupo día 1- dosis 192 μ g CPF/huevo); (B) Embrión con estimación de 5 días de desarrollo (grupo día 4- dosis 384 μ g CPF/huevo); (C) Embrión con estimación de 7 días de desarrollo (grupo día 4, dosis 192 μ g CPF/huevo); (D) Embrión con estimación de 9 días de desarrollo (grupo día 1- dosis 384 μ g CPF/huevo); (E) Embrión con estimación de 12 días de desarrollo (grupo Día 4- dosis 192 μ g CPF/huevo); (F) Embrión con estimación de más de 15 días de desarrollo (grupo día 4- 192 μ g CPF/huevo); (G-H) Pichón de codorniz de 17 días de desarrollo y eclosión fallida (grupo día 14- 192 μ g CPF/huevo).

Tabla 5. Características en huevos, embriones y pichones de *Coturnix coturnix* topicados externamente con clorpirifos en 3 momentos claves del desarrollo embrionario durante la incubación artificial.

Tratamientos Día de incubación (concentración)	Total huevos incubados por grupo n	Total huevos fértils por grupo n	Huevos fértiles no eclosionados		Huevos fértiles con eclosiones efectivas			
			Muertes embrionarias n (%)	Eclosiones fallidas n (%)	Pichones nacidos vivos n (%)	Peso (g) Media±D.E.	Longitud tarsal (mm) Media ±D.E.	N° de pichones con anomalías morfológicas
<i>Día 1</i>								
Control (-)	8	7	0	0	7 (100%)	6,52±0,14	12,60±0,37	1
1X (38,4 µg CPF/huevo)	8	8	0	0	8 (100%)	7,02±0,12	13,36±0,35	0
5X (192 µg CPF/huevo)	8	8	2 (25%)	0	6 (75%)	6,70±0,34	13,08±0,60	1
10X (384 µg CPF/huevo)	8	8	2 (25%)	1 (13%)	5 (62%)	6,49±0,23	11,99±0,50	0
Control (+)	7	6	0	1 (17%)	5 (83%)	6,50±0,23	12,85±0,22	2
MitC (0,1mg/kg)								
<i>Día 4</i>								
Control (-)	4	3	0	0	3 (100%)	6,28±0,34	12,33±0,47	0
1X (38,4 µg CPF/huevo)	8	5	1 (20%)	0	4 (80%)	6,64±0,14	13,27±0,55	1
5X (192 µg CPF/huevo)	8	5	3 (60%)	0	2 (40%)	6,81±0,40	13,17±0,66	0
10X (384 µg CPF/huevo)	8	6	1 (17%)	0	5 (83%)	7,03±0,24	12,55±0,14	1
Control (+)	7	5	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)	5,81	14,60	1
MitC (0,1mg/kg)								
<i>Día 14</i>								
Control (-)	4	4	0	0	4 (100%)	6,39±0,16	13,16±0,52	0
1X (38,4 µg CPF/huevo)	8	7	0	1 (14%)	6 (86%)	6,43±0,17	13,08±0,24	2
5X (192µg CPF/huevo)	8	5	1 (20%)	0	4 (80%)	6,97±0,32	12,90±0,60	3

10X (384 µg CPF/huevo)	8	5	0	0	5 (100%)	6,59±0,32	12,78±0,65	2
Control (+)	7	6	0	1 (17%)	5 (83%)	6,65±0,21	13,31±0,27	1
MitC (0,1mg/kg)								
TOTALES	109	88	13	5	70			15

n: número de individuos. (%): Porcentaje en virtud de huevos fértiles. D.E.: Desvío estándar. CPF: Clorpirifos. MitC: Mitomicina C. No se observaron diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos respecto de las variables analizadas ($p > 0,05$)

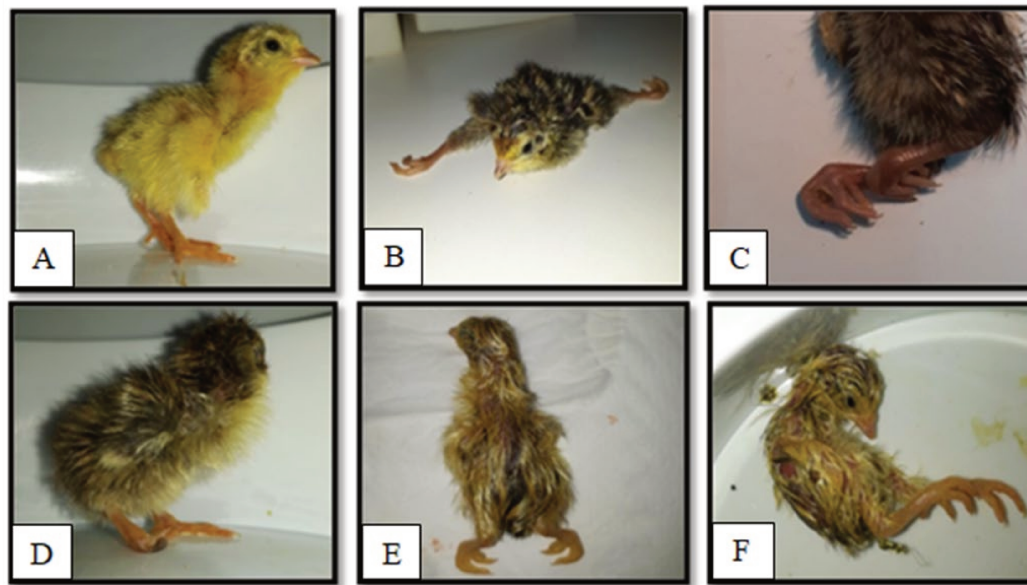
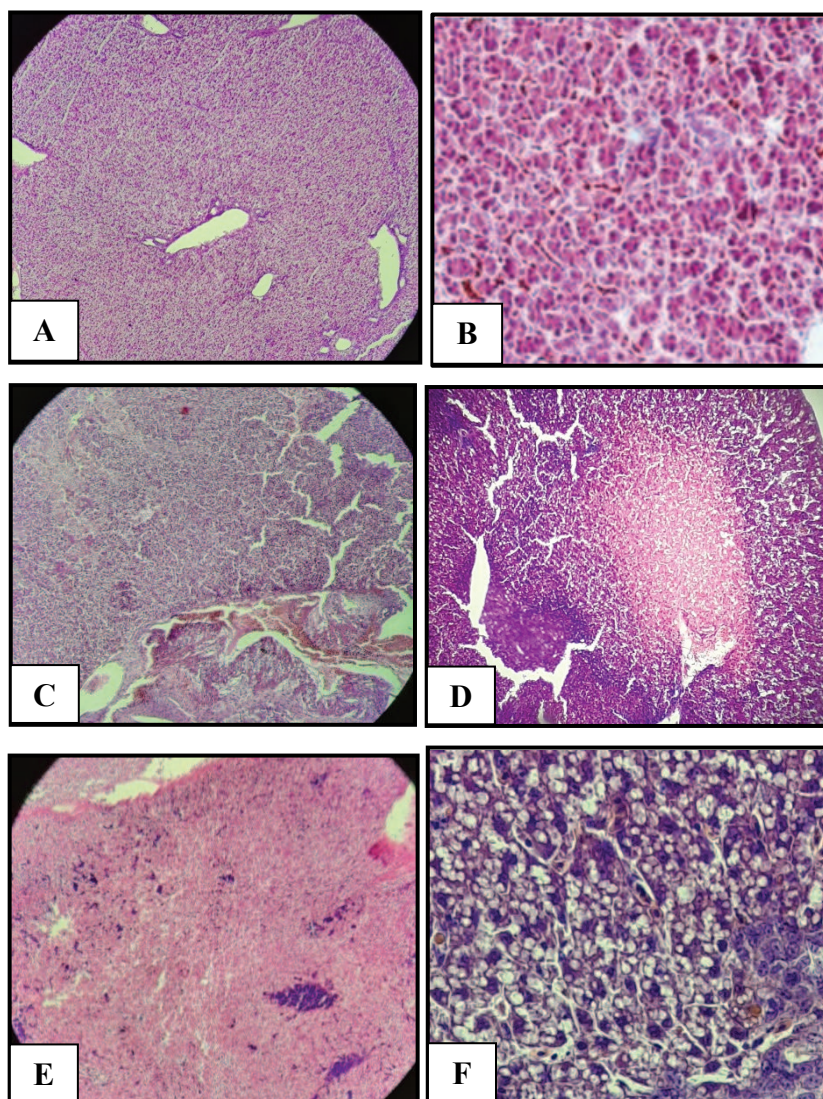


Figura 32. Registro fotográfico de anomalías morfológicas en pichones de *Coturnix coturnix* con eclosión efectiva luego de una exposición por topicación con clorpirifos e incubación artificial. (A) Pichón con morfología externa y aplomos sin alteraciones (Grupo día 1- Control negativo); (B) Pichón con aparente laxitud coxofemoral en miembros posteriores- pie zambo (grupo día 14- concentración 192 μg CPF/huevo); (C) Pichón con edema en ambos miembros posteriores (grupo Día 4- concentración 384 μg CPF/huevo); (D) Pichón con retracción flexural en pata derecha- pie zambo (grupo día 14- concentración 192 μg CPF/huevo); (E) Pichón con retracción flexural en ambas patas- pie zambo (grupo día 14- 384 μg CPF/huevo); (F) Pichón con ventroflexión de cuello e imposibilidad de incorporarse sobre sus patas (grupo día 14- concentración 384 μg CPF/huevo).

Las mediciones del grosor de la cáscara del huevo variaron entre un valor mínimo promedio de $17,20 \pm 0,73 \mu\text{m}$ para el grupo D14.10X a un valor máximo promedio de $19,86 \pm 2,16 \mu\text{m}$ para el grupo D1.C-. No se observaron diferencias estadísticas entre los grupos controles negativos y los grupos expuestos a diversas concentraciones de CPF. No se determinó un efecto particular de acuerdo con la concentración ni el día de exposición.

En referencia al tejido hepático, se pudieron identificar variedad de alteraciones que comprometen la estructura tisular, la integridad del citoplasma y la conservación del núcleo de los hepatocitos (Figura 33), los cuales se categorizaron según la extensión de la afección sobre el tejido en rangos de puntaje por cada grupo control y de tratamiento con CPF (Tabla 6). No se observó asociación entre el día de exposición y el tipo de

lesiones. Sin embargo, se pudo establecer correspondencia estadística entre las concentraciones de exposición y la severidad de las lesiones, observándose que el grupo control (-) y aquel expuesto a concentración de 1X se asocian a lesiones leves, mientras que los grupos con concentración de 5X se vinculan con lesiones de nivel intermedio y, los grupos con concentración de 10X se vinculan con las categorías más altas de lesión tisular (Figura 34).



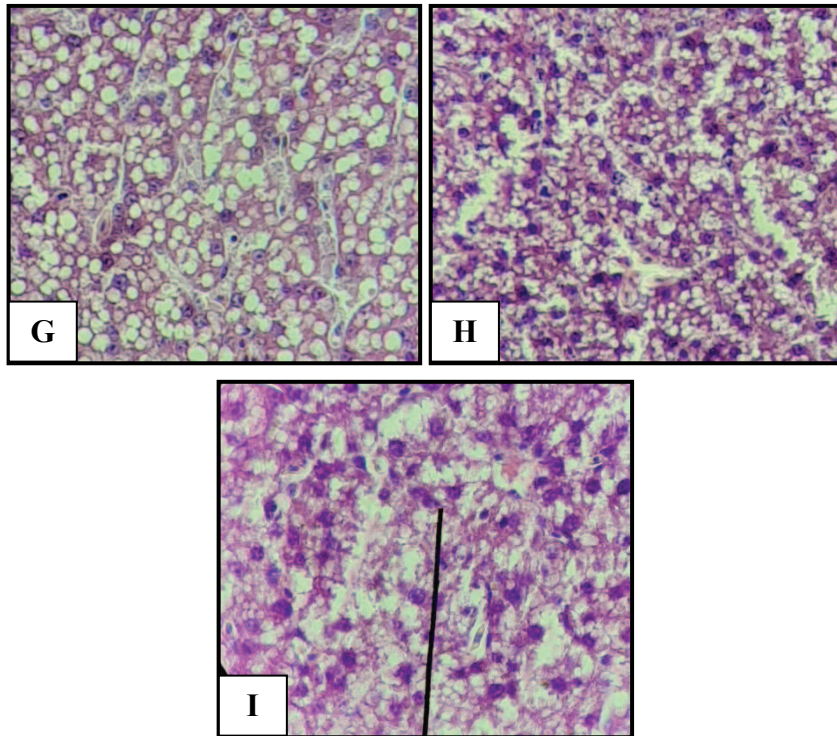


Figura 33. Registro fotográfico de lesiones histopatológicas observadas en tejido hepático en pichones de *Coturnix coturnix* expuestas a clorpirifos en concentraciones de 38,4, 192 y 384 $\mu\text{g}/\text{huevo}$. (A) Parénquima hepático de individuo de grupo control donde se observa el espacio porta rodeado de venas centrolobulillares (aumento 100x); (B) Parénquima hepático de individuo de grupo control con aumento 400x; (C) Desorden trabecular- concentración 38,4 μg CPF/huevo (aumento 100x); (D) Acidofilia- concentración 384 μg CPF/huevo (aumento 100x); (E) Necrosis tisular- concentración 384 μg CPF/huevo (aumento 100x); (F) Dilatación sinusoidal leve con hepatocitos conservados y predominancia de microvacuolas en citoplasmas- concentración 38,4 μg CPF/huevo (aumento 400x); (G) Dilatación sinusoidal leve con hepatocitos conservados y predominancia de macrovacuolas en citoplasmas- concentración 192 μg CPF/huevo (aumento 400x); (H) Dilatación sinusoidal avanzada con hepatocitos lesionados y destrucción del citoplasma- concentración 384 μg CPF/huevo (aumento 400x); (I) Lesión severa de hepatocitos y presencia de núcleos picnóticos y cariolíticos- concentración 384 μg CPF/huevo (aumento 400x).

Tabla 6. Tipos y severidad de lesiones tisulares hepáticas observadas a nivel histopatológico en pichones de *Coturnix coturnix* recién nacidos del ensayo experimental en incubación artificial.

Tratamientos <i>Día de incubación</i> (concentración)	N	Tipo y severidad de lesiones hepáticas				
		SEC	DES	VCit	CCit	CNuc
<i>Control (-)</i>	12	1	1 - 2	1 - 2	1	1 - 2
<i>Control (+)</i> MitC (0,1mg/kg)	10	1 - 2	1 - 2	2	1 - 2	1
<i>Día 1</i>						
1X (38,4 µg CPF/huevo)	5	1 - 2	1 - 2	1 - 2	0 - 2	0 - 3
5X (192 µg CPF/huevo)	6	1 - 3	1 - 2	2 - 3	1 - 2	1 - 3
10X (384 µg CPF/huevo)	4	1 - 3	2	2 - 3	2	1 - 2
<i>Día 4</i>						
1X (38,4 µg CPF/huevo)	3	1 - 2	1 - 2	1 - 2	1 - 2	1 - 2
5X (192 µg CPF/huevo)	5	1 - 3	1 - 2	2	1 - 2	1 - 2
10X (384 µg CPF/huevo)	3	2 - 3	2	2 - 3	2	1 - 2
<i>Día 14</i>						
1X (38,4 µg CPF/huevo)	5	1 - 2	1	1 - 2	0 - 1	1 - 2
5X (192 µg CPF/huevo)	2	2 - 3	2	2 - 3	1 - 2	2
10X (384 µg CPF/huevo)	4	2 - 4	2	3	3	2 - 3

CPF: Clorpirifos. MitC: Mitomicina C. SEC: Simetría, color y estructura tisular; DES: Dimensión del espacio sinusoidal; VCit: Grado de vacuolización del citoplasma; CCit: Grado de conservación de citoplasmas; CNuc: Grado de conservación de núcleos. La severidad de la lesión se cuantifica desde ausencia de lesión (0) en orden de número creciente hasta mayor severidad (4).

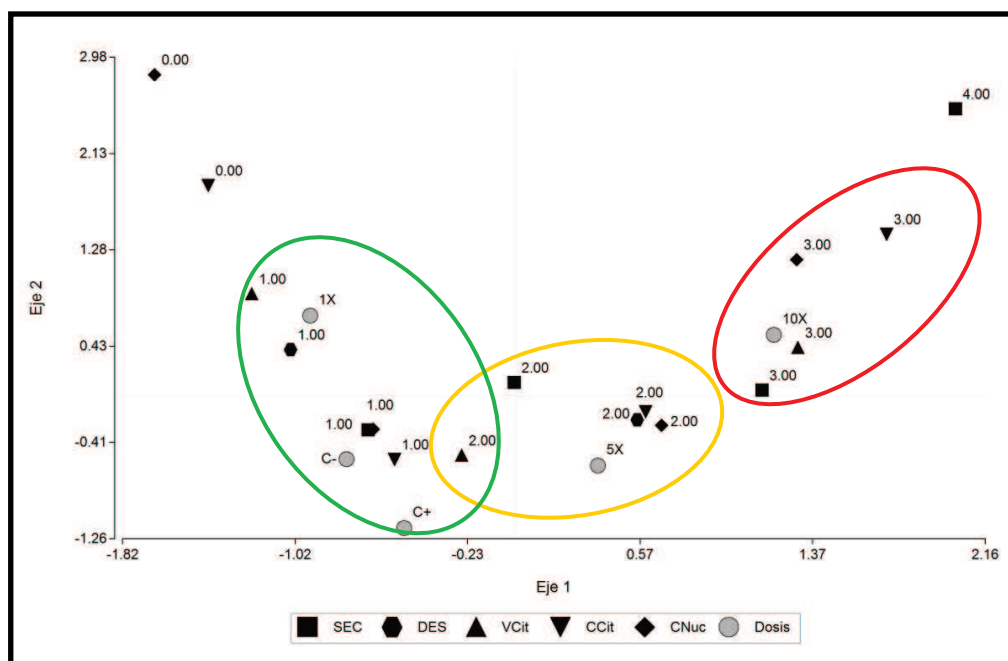


Figura 34. Análisis de correspondencia entre concentraciones de aplicación y categorías de severidad según tipo de lesión para la valoración del daño histopatológico en hígado de pichones de *Coturnix coturnix* expuestos a clorpirifos durante la incubación artificial. SEC: Simetría, color y estructura tisular; DES: Dimensión del espacio sinusoidal; VCit: Grado de vacuolización del citoplasma; CCit: Estado de conservación de citoplasmas; CNuc: Estado de conservación de núcleos. C-: Grupo control negativo; C+: grupo control positivo; 1X: Grupos expuestos a concentración de 38,4 µg CPF/huevo; 5X: Grupos expuestos a concentración de 192 µg CPF/huevo; 10X: Grupos expuestos a concentración de 384 µg CPF/huevo. Los números del 1 a los 4 asociados a las figuras geométricas refieren a la escala de severidad de cada lesión. El óvalo color verde refiere asociación de grupos a lesiones de tipo leves; el óvalo color amarillo refiere asociación de grupos a lesiones de tipo moderadas; el óvalo color rojo refiere asociación de grupos a lesiones de tipo severas.

En referencia al tejido renal, la evaluación cuali-cuantitativa se presenta con mayor complejidad, dada la diversidad de estructuras, cantidad de lesiones y grados de extensión que se observan sobre el tejido (Figura 35). De las 9 estructuras renales analizadas, se pudo observar una tendencia a mayor cantidad de estructuras afectadas en los grupos experimentales expuestos a CPF en comparación con los grupos controles negativos, independientemente del momento o concentración de exposición. Las estructuras que se mostraron afectadas con mayor frecuencia fueron los túbulo contorneados proximales (TCP), túbulo contorneados distales (TCD) y túbulo colectores (Tcol) (Tabla 7). De los 10 tipos de lesiones caracterizadas, también existe una tendencia a identificar mayor diversidad de lesiones en los grupos expuestos a CPF.

A bajas concentraciones, se observan con mayor frecuencia lesiones como desprendimiento epitelial (Dep) y vacuolización (Vac), mientras que en concentraciones mayores de CPF son más frecuente lesiones como la necrosis (Nec; Tabla 7).

Por otra parte, de acuerdo con el análisis de correspondencias implementado, se pudo determinar que no existe asociación entre categoría de lesiones y día de exposición, pero sí hay correspondencia con la concentración de aplicación. La concentración de 38,4 $\mu\text{g}/\text{huevo}$ se asocian a lesiones de categorías 0 y 1, la concentración de 192 $\mu\text{g}/\text{huevo}$ y los grupos controles (-) se asocian a lesiones de categoría 0 y 2, y los grupos expuestos a concentración de 384 $\mu\text{g}/\text{huevo}$ se corresponden con lesiones de categoría 2 y 3 (Figura 36).

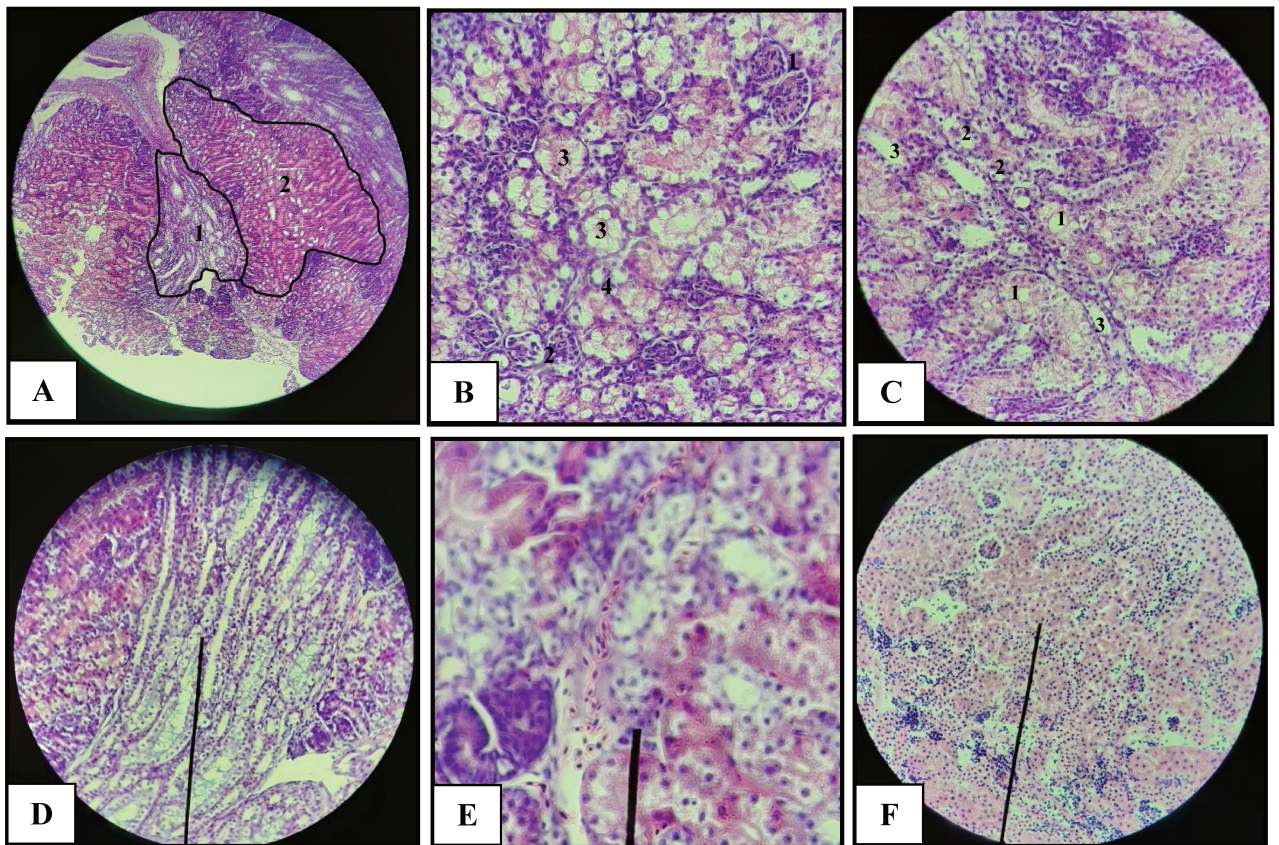


Figura 35. Registro fotográfico de estructuras normales y diversas lesiones histopatológicas observadas en tejido renal de pichones de *Coturnix coturnix* expuestos a clorpirifos en concentraciones de 38,4, 192 y 384 $\mu\text{g}/\text{huevo}$. (A) 1. Cono medular sin daño tisular, 2. Cilindros corticales sin daño tisular (aumento 40x). (B) 1. Corpúsculo/ glomérulo de nefronas mamilarias sin daño tisular; 2. Corpúsculo/ glomérulo de nefronas reptilianas sin daño tisular; 3. Túbulo contorneado proximal normal; 4. Túbulo contorneado distal sin daño tisular (Aumento 400x). (C) 1. Túbulo contorneado proximal sin daño tisular; 2. Túbulo contorneado distal sin daño tisular; 3. Túbulo colector sin daño

tisular (Aumento 400x). (D) Vacuolización citoplasmática en túbulos colectores (Aumento 400x). (E) Hemorragia intersticial entre túbulos colectores. (F) Necrosis e infiltración celular.

Tabla 7. Estructuras renales afectadas y tipos de lesiones observadas a nivel histopatológico en pichones de *Coturnix coturnix* recién nacidos del ensayo experimental en incubación artificial.

Tratamientos Día de incubación (concentraciones)	N	Cantidad de estructuras renales afectadas	Estructuras renales afectadas con mayor frecuencia*	Cantidad de lesiones diferentes observadas	Tipo de lesión observada con mayor frecuencia*
<i>Control (-)</i>	12	2 a 7	TCP / TCD	1 a 3	Dep / Vac
<i>Control (+)</i> MitC (0,1mg/kg)	10	6 a 8	TCP / TCol	4 a 6	Nec / Vac
Día 1					
1X (38,4 µg CPF/huevo)	6	3 a 8	TCP / TCD	3 a 5	Dep / Vac
5X (192 µg CPF/huevo)	5	5 a 8	TCP / TCD	3 a 6	Dep / Nec
10X (384 µg CPF/huevo)	3	7 a 8	Tcol / TCP	4 a 6	Nec / Dep
Día 4					
1X (38,4 µg CPF/huevo)	3	7 a 8	Tcol / TCP	4 a 5	Dep / Hrr
5X (192 µg CPF/huevo)	3	6 a 7	TCP / TCD	4 a 6	Nec / Crl
10X (384 µg CPF/huevo)	6	8 a 9	TCD / TCol	4 a 6	Nec / Inf
Día 14					
1X (38,4 µg CPF/huevo)	5	5 a 9	TCP / TCD	4 a 8	Dep / Vac
5X (192 µg CPF/huevo)	2	5 a 7	Tcol / AH	5 a 6	Nec / Dep
10X (384 µg CPF/huevo)	4	8 a 9	TCP / TCol	4 a 5	Nec / Crl

* Se muestran las 2 estructuras que se repitieron con mayor frecuencia para cada caso en cada grupo experimental. CPF: Clorpirifos. MitC: Mitomicina C.

Estructuras renales: AH (Asa de Henle); TCP (Túbulo contorneado proximal); TCD (Túbulo contorneado distal); TCol (Túbulos colectores). Tipo de lesiones: Crl (Cariolisis) Dep (desprendimiento de epitelio); Hrr (Hemorragia); Inf (Infiltración); Nec (Necrosis); Vac (Vacuolización).

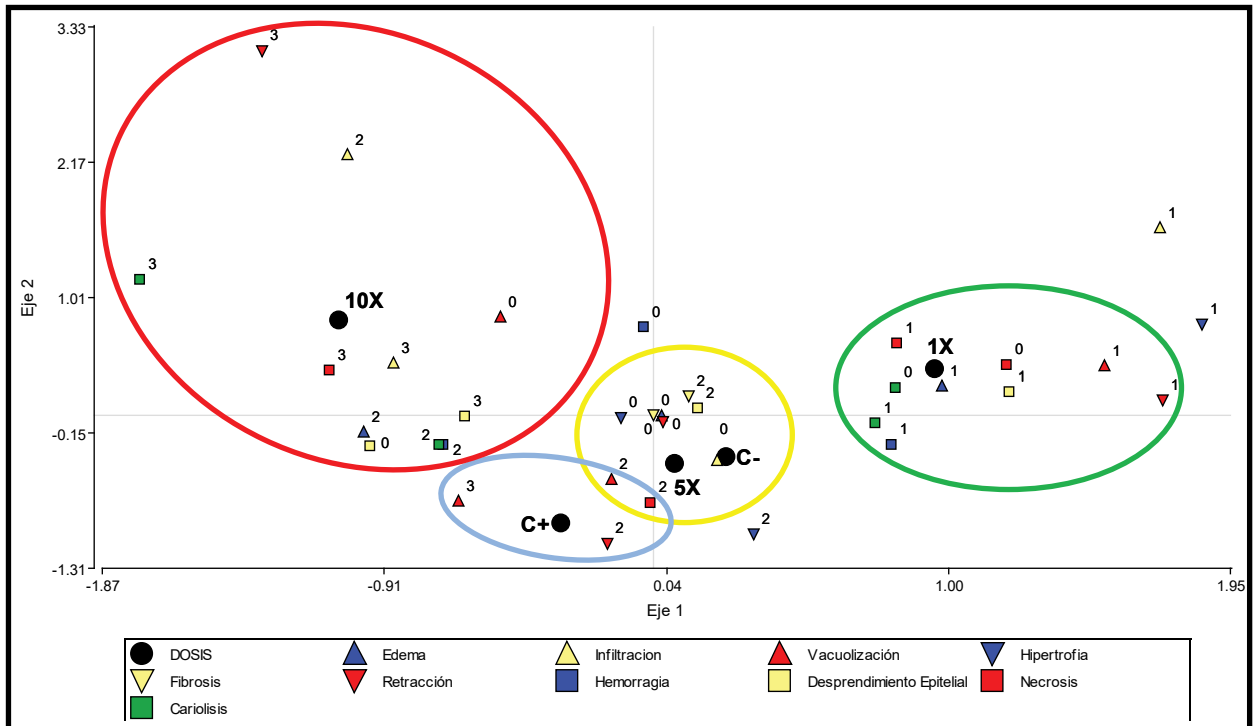


Figura 36. Análisis de correspondencia entre concentraciones de aplicación y categorías de severidad según tipo de lesión para la valoración del daño histopatológico en riñón de pichones de *Coturnix coturnix* expuestos a clorpirifos durante la incubación artificial. C-: Grupo control negativo; C+: grupo control positivo; 1X: Grupos expuestos a clorpirifos a concentración de 38,4 μg CPF/huevo; 5X: Grupos expuestos a clorpirifos a concentración de 192 μg CPF/huevo; 10X: Grupos expuestos a clorpirifos a concentración de 384 μg CPF/huevo. Los números del 0 al 3, asociados a las figuras geométricas, refieren a la escala de severidad de cada lesión. El óvalo color verde refiere asociación de grupos experimentales a lesiones de tipo leves; el óvalo color amarillo refiere asociación de grupos experimentales a lesiones de tipo leves a moderadas; el óvalo color celeste destaca la asociación del grupo control positivo con lesiones de tipo moderado; el óvalo color rojo refiere asociación de grupos a lesiones de tipo moderadas a severas.

En referencia al análisis de biomarcadores de genotoxicidad en eritrocitos, se pudieron obtener los valores medios y los respectivos desvíos de las frecuencias de AN para cada grupo de pichones obtenidos de huevos del ensayo experimental. Los valores expresados en la Tabla 8 sólo refieren a las frecuencias observadas en pichones nacidos vivos.

Con foco en las frecuencias de MN y Y, los individuos que conforman al grupo control (+) expuestos con MitC, presentaron frecuencias significativamente superiores al grupo control negativo ($p < 0,05$). Se pudo determinar que existieron diferencias entre los grupos control (-) y los expuestos a CPF, en particular para MN, Hn y ANT, y que

dicho efecto fue concentración-dependiente, pero no hubo evidencia de efectos provocados por el día de la exposición (Tabla 9- Figura 37).

Tabla 8. Biomarcadores de genotoxicidad observados en pichones de *Coturnix coturnix* recién nacidos en el ensayo experimental durante el desarrollo embrionario en incubación artificial.

Tratamientos <i>Día</i> <i>de incubación</i> (concentraciones)	N	Tipo de alteración nuclear/ 1000 eritrocitos/ animal								
		MN	Y	Bin	Pn	Cn	Hn	E	Per	ANT
<i>Día 1</i>										
Control (-)	5	0,34 ± 0,09	0,24 ± 0,11	0	0	0,04 ± 0,02	1,72 ± 0,79	2,84 ± 0,56	1,80 ± 0,65	6,98 ± 0,69
1X (38,4 µg CPF/huevo)	5	1,28 ± 0,44	0,72 ± 0,74	0	0,02 ± 0,02	0	1,84 ± 0,66	4,84 ± 0,87	2,12 ± 0,60	10,82 ± 1,66
5X (192 µg CPF/huevo)	6	1,00 ± 0,14	0,37 ± 0,12	0,03 ± 0,03	0	0	3,73 ± 0,31	3,50 ± 0,24	2,43 ± 0,17	11,07 ± 0,52
10X (384 µg CPF/huevo)	3	1,80 ± 0,31	0,53 ± 0,24	0,13 ± 0,13	0	0	4,87 ± 0,70	2,93 ± 0,41	2,60 ± 0,92	12,87 ± 0,13
Control (+) MitC (0,1mg/kg)	5	1,36 ± 0,17	1,04 ± 0,17	0,08 ± 0,05	0	0,08 ± 0,06	3,32 ± 0,31	3,00 ± 0,38	2,12 ± 0,52	11,00 ± 0,81
<i>Día 4</i>										
Control (-)	3	0,20 ± 0,12	0,53 ± 0,07	0,17 ± 0,03	0	0,27 ± 0,17	2,27 ± 1,09	3,07 ± 0,37	1,80 ± 0,50	8,30 ± 0,95
1X (38,4 µg CPF/huevo)	3	2,00 ± 0,81	0,80 ± 0,20	0,10 ± 0,06	0,07 ± 0,07	0	4,47 ± 0,87	3,67 ± 0,44	1,13 ± 0,35	12,23 ± 1,04
5X (192 µg CPF/huevo)	3	1,40 ± 0,12	0,47 ± 0,07	0	0	0	3,67 ± 0,87	4,13 ± 0,75	1,80 ± 0,53	11,47 ± 1,77
10X (384 µg CPF/huevo)	3	1,40 ± 0,00	0,40 ± 0,12	0,20 ± 0,20	0	0	4,07 ± 1,16	3,20 ± 0,12	1,33 ± 0,35	10,60 ± 0,95
Control (+) MitC (0,1mg/kg)	1	1,40	1,00	0,10	0	0,10	3,40	3,40	2,20	11,60
<i>Día 14</i>										
Control (-)	4	0,38 ± 0,13	0,53 ± 0,07	0,03 ± 0,03	0	0,08 ± 0,05	1,80 ± 0,22	2,95 ± 0,17	2,35 ± 0,22	7,98 ± 0,30
1X (38,4 µg CPF/huevo)	5	2,28 ± 0,79	0,36 ± 0,15	0,12 ± 0,08	0,06 ± 0,06	0	3,48 ± 0,52	3,96 ± 1,19	2,16 ± 0,35	12,42 ± 2,18
5X (192 µg CPF/huevo)	3	1,20 ± 0,12	0,33 ± 0,13	0	0	0	1,67 ± 0,98	3,27 ± 0,71	1,07 ± 0,57	7,53 ± 1,54
10X (384 µg CPF/huevo)	4	1,30 ± 0,31	0,35 ± 0,15	0,10 ± 0,06	0	0	4,60 ± 0,79	5,95 ± 0,95	1,50 ± 0,21	13,80 ± 1,46

Tratamientos <i>Día</i> de incubación (concentraciones)	N	Tipo de alteración nuclear/ 1000 eritrocitos/ animal								
		MN	Y	Bin	Pn	Cn	Hn	E	Per	ANT
Control (+) MitC (0,1mg/kg)	5	1,64 ± 0,44	1,04 ± 0,59	0,16 ± 0,12	0,02 ± 0,02	0,06 ± 0,06	3,20 ± 1,03	3,64 ± 0,92	2,63 ± 0,73	12,12 ± 2,26

CPF: Clorpirifos. Mit C: Mitomicina C. MN: Micronúcleos; Y: Brotes nucleares; Bin: Células binucleadas; Pn: Puentes nucleoplásmicos; Cn: Colas nucleares; Hn: Hendiduras nucleares; An: Eritroplástidos; Per: Núcleos periféricos; ANT: Alteraciones nucleares totales.

Tabla 9. Resultados de los Modelos Lineales independientes aplicados a los datos obtenidos de biomarcadores de genotoxicidad observados en pichones de *Coturnix coturnix* recién nacidos en el ensayo experimental durante el desarrollo embrionario en incubación artificial.

Variable	Error estándar	T	P
MN			
Intercepto*	0,30	4,35	8,74x10 ⁻⁵
Control negativo	0,34	-3,31	0,001
Concentración 38,4 µg/huevo	0,34	1,10	0,279
Concentración 192 µg/huevo	0,34	-0,82	0,419
Día 4	0,30	0,66	0,512
Día 14	0,27	0,95	0,346
Y			
Intercepto*	0,14	3,21	0,002
Control negativo	0,15	-0,36	0,718
Concentración 38,4 µg/huevo	0,15	1,23	0,223
Concentración 192 µg/huevo	0,15	-0,31	0,758
Día 4	0,13	0,73	0,471
Día 14	0,12	-0,87	0,390
B			
Intercepto*	0,05	2,24	0,031
Control negativo	0,05	-1,56	0,127
Concentración 38,4 µg/huevo	0,05	-1,22	0,228
Concentración 192 µg/huevo	0,05	-2,12	0,040
Día 4	0,05	1,61	0,115
Día 14	0,04	0,56	0,577
Hn			
Intercepto*	0,55	7,87	1,01x10 ⁻⁹
Control negativo	0,63	-4,17	1,54x10 ⁻⁶
Concentración 38,4 µg/huevo	0,61	-2,29	0,027
Concentración 192 µg/huevo	0,63	-2,05	0,046
Día 4	0,54	1,10	0,277
Día 14	0,50	-0,03	0,975
E			
Intercepto*	0,58	7,10	1,2x10 ⁻⁸
Control negativo	0,65	-1,93	0,059
Concentración 38,4 µg/huevo	0,64	0,01	0,990
Concentración 192 µg/huevo	0,66	-0,86	0,394
Día 4	0,56	-0,23	0,823
Día 14	0,52	0,76	0,453

Variable	Error estándar	T	P
Per			
Intercepto*	0,37	5,88	7,86x10 ⁻⁷
Control negativo	0,41	0,35	0,729
Concentración 38,4 µg/huevo	0,41	0,18	0,856
Concentración 192 µg/huevo	0,42	0,15	0,879
Día 4	0,36	-1,92	0,061
Día 14	0,33	-1,11	0,275
ANT			
Intercepto*	1,03	12,09	4,21x10 ⁻¹⁵
Control negativo	1,16	-4,21	1,34x10 ⁻⁶
Concentración 38,4 µg/huevo	1,14	-0,69	0,497
Concentración 192 µg/huevo	1,17	-1,91	0,063
Día 4	1,00	0,22	0,828
Día 14	0,93	0,23	0,818

CPF: Clorpirifos. Mit C: Mitomicina C. MN: Micronúcleos; Y: Brotes nucleares; Bin: Células binucleadas; Pn: Puentes nucleoplásmicos; Cn: Colas nucleares; Hn: Hendiduras nucleares; An: Eritroplástidos; Per: Núcleos periféricos; ANT: Alteraciones nucleares totales. *El intercepto refiere a la exposición a clorpirifos en concentración de 384 µg/huevo y día 1 de incubación. Los casilleros sombreados resaltan los grupos que presentaron diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$).

En referencia al análisis de actividad AChE plasmática, se pudieron obtener los valores medios y los respectivos desvíos para cada grupo de animales (pichones con eclosión efectiva) expuestos a CPF y el grupo control negativo en virtud del día de aplicación del insecticida. Todos los grupos expuestos a CPF presentaron una actividad de ChE plasmática menor a la del grupo control, pero sólo con significancia estadística observable en grupos expuestos durante el día 4 de la incubación ($p < 0,05$; Tabla 10). En estos últimos, la mayor reducción se produjo en el grupo que recibió la concentración de 38,4 µg/huevo (Figura 38). Mediante los modelos lineales aplicados se pudo valorar que existe diferencia entre el grupo control y los expuestos y, si bien no existe suficiente evidencia para asegurar un efecto concentración-dependiente, sí existe un efecto marcado en la actividad ChE de acuerdo con el momento de exposición, que es más evidente durante la aplicación en el día 4 de la incubación (Tabla 11– Figura 38).

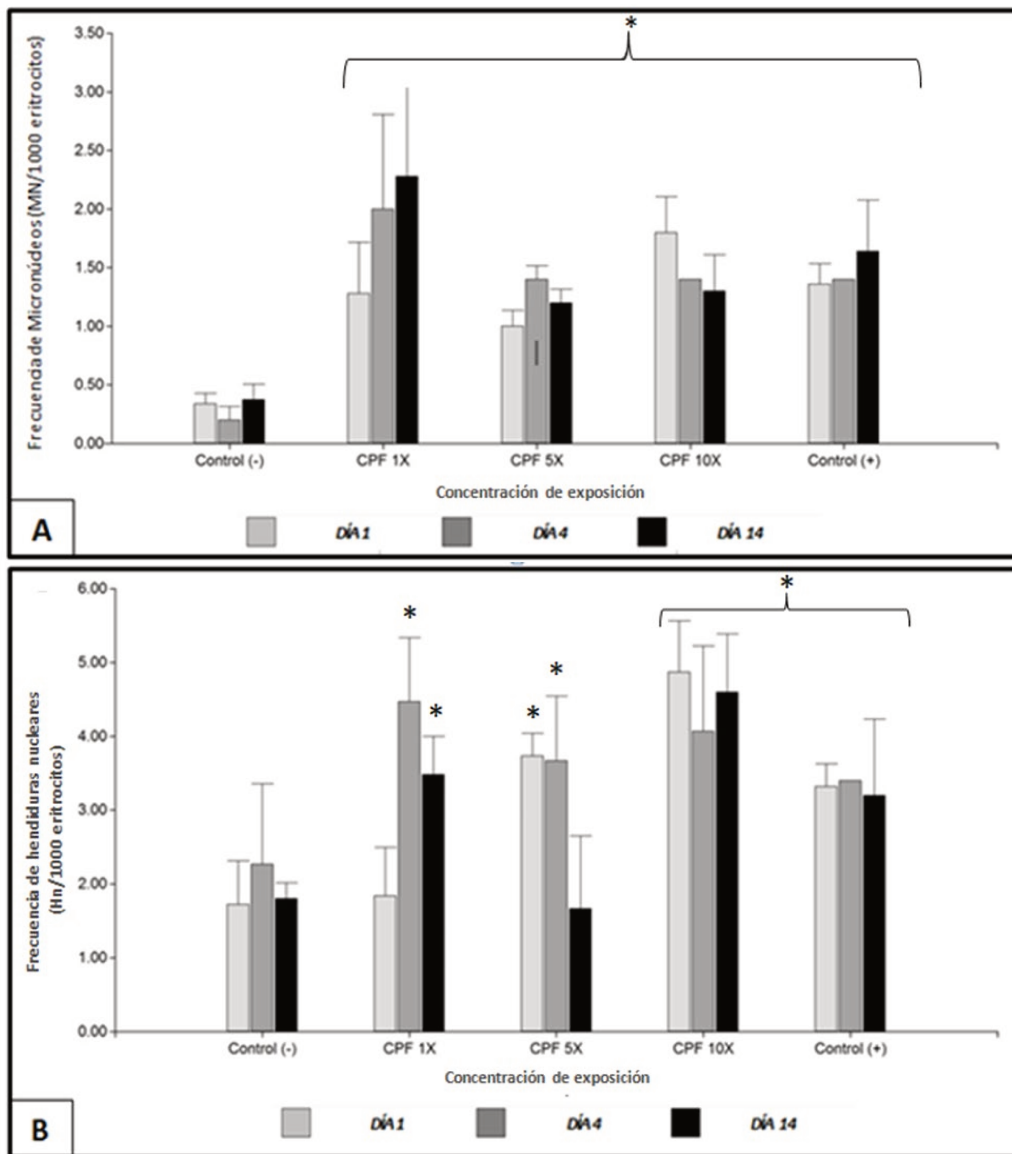


Figura 37. Frecuencia de biomarcadores citogénéticos en eritrocitos de pichones de codorniz expuestos a distintas concentraciones de CPF durante días claves de la incubación artificial. (A) Frecuencia de micronúcleos (MN); (B) Frecuencia de hendiduras nucleares (Hn). CPF 1X: concentración de clorpirifos de 38,4 µg/huevo; CPF 5X: concentración de clorpirifos de 192 µg/huevo; CPF 10X: concentración de clorpirifos de 384 µg/Huevo. * Significancia estadística ($p < 0,05$) respecto al grupo control negativo.

Tabla 10. Actividad de colinesterasas plasmática en pichones de *Coturnix coturnix* recién nacidos en el ensayo experimental durante su desarrollo embrionario en incubación artificial.

		Concentraciones de clorpirifos			
		Media \pm D.E.			
		(n)			
		Control (-)	38,4 μ g/Huevo	192 μ g/Huevo	384 μ g/Huevo
Momento de exposición	Día 1	579,03 \pm 50,26 (5)	446,36 \pm 67,42 (5)	541,78 \pm 50,05 (6)	514,14 \pm 99,56 (3)
	Día 4	600,11 \pm 54,75 (4)	369,56 \pm 18,30 (3) *	422,34 \pm 24,82 (3) *	447,39 \pm 40,72 (3) *
	Día 14	567,63 \pm 60,68 (4)	445,68 \pm 41,18 (5)	477,98 \pm 34,52 (3)	412,28 \pm 28,14 (5)

* Diferencia estadística entre grupos tratados respecto al grupo control negativo en un mismo momento de la incubación ($p < 0,05$)

Tabla 11. Resultados de los Modelos Lineales independientes aplicados a la actividad ChE en pichones de *Coturnix coturnix* durante el desarrollo embrionario en incubación artificial a concentraciones y días variables.

Variable	Error estándar	T	P
Intercepto*	21,15	22,95	< 0,001
Control negativo	23,93	5,09	< 0,001
Concentración 38,4 μ g CPF/huevo	23,49	-0,98	0,333
Concentración 192 μ g CPF/huevo	24,10	1,40	0,168
Día 4 de incubación	20,64	-2,52	0,015
Día 14 de incubación	19,11	-2,15	0,037

*El intercepto refiere a concentración de clorpirifos 384 μ g CPF/huevo y día 1 de incubación
CPF: Clorpirifos

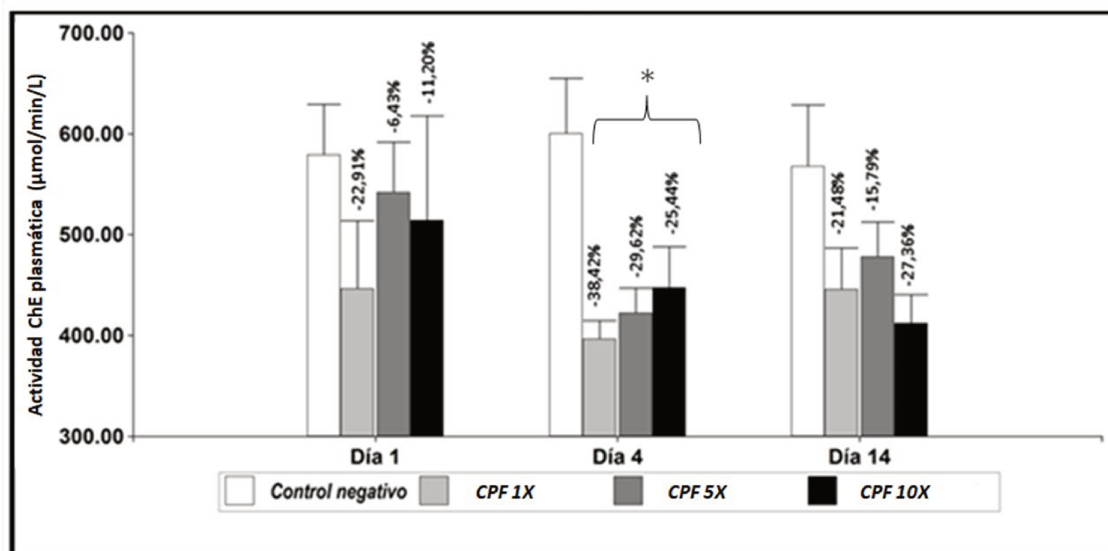


Figura 38. Actividad ChE plasmática y porcentaje de inhibición de actividad enzimática en pichones de *Coturnix coturnix* expuestos a distintas concentraciones de clorpirifos topicado durante momentos claves de la incubación artificial. ChE: colinesterasa plasmática; CPF 1X: concentración de clorpirifos de 38,4 µg/Huevo; CPF 5X: concentración de clorpirifos de 192 µg/Huevo; CPF 10X: concentración de clorpirifos de 384 µg/Huevo. *Significancia estadística respecto al grupo control negativo ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio permiten evidenciar y poner bajo análisis respuestas de diversos biomarcadores ante la aplicación *in-ovo* de compuestos anticolinesterásicos como el CPF. El modelo propuesto busca detectar respuestas y alteraciones que pueden tener implicancias en la vida fetal y perinatal de aves expuestas durante su gestación. Recientes estudios en huevos embrionados resultan útiles para reflexionar sobre los potenciales efectos que también podrían ocasionar estos compuestos en el ser humano, al encontrarse expuesto durante la gestación ante distintos contextos de contaminación ambiental (Garcês *et al.*, 2020; Ortíz-Santaliestra *et al.*, 2020; Mitidiero Stachissini Arcain *et al.*, 2021).

Para la recolección de los huevos utilizados en nuestro estudio, se utilizó un plantel de codornices adultas que pertenece a un criadero comercial de índole privado y domiciliario. Las condiciones de manejo, nutricionales, sanitarias y ambientales fueron las mismas para todas las aves proveedoras de huevos, y su seguimiento es facilitado por la reducida cantidad de animales que se encuentra en el criadero. Es importante destacar que para el manejo ambiental y sanitario nunca fueron utilizados plaguicidas de ningún tipo, por lo que se asume que las aves progenitoras no se han encontrado expuestas de forma directa e intencional a este tipo de compuestos. Resulta relevante esta salvedad dado que, a la hora de analizar efectos tóxicos en huevos, se debe tener en consideración potenciales exposiciones parentales. Muchos de los compuestos orgánicos persistentes, tales como lo son los pesticidas que nos ocupan, pueden saltar barreras transgeneracionales y concentrarse en huevos, lo que implica un riesgo tanto para la progenie de las especies silvestres como también para el consumo humano de estos productos en especies domésticas (García-Hernández *et al.*, 2006; Hamid *et al.*, 2017).

Por más de 50 años, las codornices (huevos, pichones y adultos) han sido utilizadas como modelos de laboratorio eficientes para monitoreos toxicológicos, epidemiológicos y estrategias productivas (Huss *et al.*, 2008). Los organismos como modelo de laboratorio aportan información toxicológica útil que se expresa bajo condiciones controladas, pero que pueden servir como aproximación a lo que ocurre en condiciones reales en un ambiente determinado. De acuerdo con el sistema desarrollado por Raimondo *et al.* (2007), los datos toxicológicos disponibles para codornices serían útiles para ser adaptados a passeriformes y columbiformes silvestres, dada la proximidad

taxonómica de las especies domesticas utilizadas para cría a estos grupos. La importancia de contar con modelos en especies domésticas radica en el hecho de poder simular escenarios y efectos, sin producir un impacto real en las comunidades que habitan ecosistemas naturales, ya que la extracción de huevos de especies silvestres o la exposición experimental dentro de un ambiente podría generar futuros efectos negativos en aquellas poblaciones evaluadas. Al poder obtener huevos desde criaderos de especies domésticas también resulta más simple contar con un número apropiado de unidades experimentales, uniformidad y mismas condiciones o estados para iniciar la experimentación. Nuestra posición en el presente estudio se ha fundado en la aplicación de estrategias como modelos de laboratorios y análisis no invasivos que preserven al máximo las posibilidades de supervivencia de los ejemplares silvestres y las condiciones naturales de las especies analizadas en los ambientes que habitan.

Actualmente, la literatura es inconsistente a la hora de facilitar comparaciones ante un mismo modelo de exposición, dado que los resultados pueden tornarse diferentes cuando el método para la incorporación del plaguicida se realiza de manera distinta, tanto por inyección *in ovo* (Slotkin *et al.*, 2008; Farhat *et al.*, 2020) o inmersión (Martin *et al.*, 1990). Algunos métodos no reflejan la realidad a campo, y la concentración de residuos químicos como sus efectos podrían ser diferentes ante distintos métodos de aplicación (Varga *et al.*, 2002; Lehel *et al.*, 2021). Sostenemos que los 2 métodos anteriores resultan poco realistas ante una simulación en laboratorio de lo que ocurriría en el ambiente, siendo el rociado o las múltiples topicaciones la forma natural en la que un huevo se podría encontrar expuesto en su nido dentro de un sistema agrario. Se ha observado por ejemplo que, la exposición mediante pulverización o múltiples topicaciones sobre la cáscara de huevo con plaguicidas tales como el 2,4-D y tebuconazol, podrían conducir a una mayor acumulación de principios activos dentro del huevo y provocar aumentos de hasta un 26% en la mortandad de pichones de otro galliforme como la perdiz colorada (Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2020).

En este estudio se escogieron días claves del desarrollo embrionario de la codorniz y concentraciones específicas de CPF para realizar la exposición. Los huevos fecundado almacenados hasta el momento previo a la incubación han atravesado al menos 4 de los 46 estados del desarrollo embrionario, a fin de establecer el eje embrionario primitivo (Hamburger y Hamilton, 1992). Desde este punto se retoma el desarrollo cuando inicia la incubación. La exposición a agentes químicos durante el día

1 de la incubación, podría significar un riesgo crucial para la elongación de la línea embrionaria primitiva, en el caso de verse afectados procesos de expresión génica vinculados con el crecimiento y la división celular. Efectos como ausencia del desarrollo embrionario en días posteriores podrían reflejar procesos de muerte embrionaria temprana. Para distinguir entre muerte embrionaria y huevos infértiles se requiere de evaluaciones microscópicas de cada sujeto para discriminar tales condiciones, dado que macroscópicamente no se denotan diferencias hasta entonces.

Otros grupos fueron expuestos a CPF al inicio del día 4 de la incubación. En este momento el embrión cursa entre el estado 22 y 24, caracterizado por el inicio de la pigmentación de los globos oculares y la elongación de los brotes de las extremidades superiores e inferiores (Sallier et al., 2006; Ainsworth et al., 2010). A estas etapas le sobrevienen procesos posteriores como la demarcación y crecimiento del pico, diferenciación de párpados y dedos. La organogénesis se encuentra en pleno avance (Martin, 1990). Efectos tóxicos en este momento podrían suponer un riesgo en la correcta formación de las estructuras mencionadas, y supondría una evidencia el aumento en la frecuencia de aspectos teratogénicos en los embriones, además, de posibles aumentos en los índices de muerte embrionaria. Si bien no se observó un claro efecto vinculado al día de exposición, los grupos expuestos el día 4 fueron los que mayor cantidad de muertes embrionarias presentaron en nuestro estudio. Resulta llamativo observar que, de acuerdo con lo anteriormente mencionado, los mayores efectos teratogénicos pudieron ser observados por defectos en las extremidades inferiores.

Los grupos de huevos embrionados que fueron expuestos durante el inicio del día 14 de incubación, se encontraban cursando entre el estado 42 y 43 del desarrollo. Estos estados pertenecen al tercer tercio de la embriogénesis de la codorniz, caracterizado especialmente por un crecimiento y desarrollo acelerado, lo cual es evidenciable en virtud de la longitud que van adoptando sus patas y dedos (Ainsworth et al., 2010). Los patrones y características generales se modifican poco luego de la etapa 42, aunque los embriones continúan aumentando de tamaño y peso. Efectos tóxicos provocados por aparentes agentes químicos podría ser observados a partir de alteraciones de medidas morfométricas como longitud total, longitud tarsal y peso, además de la muerte embrionaria. La longitud del pico y del tercer dedo del pie han sido

tomado como marcadores confiables para evaluar esta condición (Sallier et al., 2006; Ainsworth et al., 2010).

En relación a la evaluación de efectos embriotóxicos del presente modelo experimental se ha podido observar que, en los controles negativos, a los cuales solo se les aplicó agua, se obtuvo casi la totalidad de supervivencia de los embriones y eclosión de los pichones. Excepto en 2 casos, donde no se observó inicio del desarrollo embrionario, posiblemente debido a la ausencia de fecundación. Teniendo en cuenta el tamaño, peso y tiempo de almacenamiento que tuvieron los huevos en este ensayo, es esperable un porcentaje de eclosión mayor al 85% de los huevos incubados (Romao *et al.*, 2008), condición que cumplen los grupos control negativo.

Los grupos tratados con CPF presentaron distintos porcentajes de supervivencia, donde sólo el grupo expuesto el día 1 y a la concentración mínima de CPF produjo un 100% de supervivencia y eclosión. Los grupos restantes presentaron porcentajes de supervivencia y eclosión entre el 75% y el 50%. Del total de huevos expuestos a distintas concentraciones de CPF (n= 72), un 25% no inició el proceso de desarrollo embrionario, y se los consideró infértiles. Las muertes embrionarias representaron el 12% del total de huevos tratados y se observaron en las exposiciones a las 2 concentraciones más altas: 192 µg/huevo y 384 µg/huevo. Estas muertes embrionarias significaron un 75% del total de muertes observadas en el ensayo, mientras que el 25% restante fueron de huevos sometidos a la exposición con MitC. Farhat *et al.* (2020) no observaron efectos de reducción en la supervivencia en pichones de huevos inyectados con CPF hasta dosis de 41,2 µg/g de huevo. Sin embargo, en nuestro estudio hemos de suponer que incluso con las concentraciones más elevadas no se alcanzarían *in ovo* las dosis detalladas anteriormente. Entonces, esto sugiere que las 2 aplicaciones de mayor concentración aplicadas mediante un método más realista y con una supuesta menor dosis biodisponible en interior del huevo, promueven un aumento en el índice de mortandad de pichones. En futuros ensayos donde se utilice la misma forma de exposición, proponemos la incorporación de métodos analíticos que permitan reconocer la concentración real del insecticida en tejidos de los pichones o en la albúmina del huevo.

De acuerdo con la descripción de la morfología embrionaria realizada por Robbio (2021), pudo determinarse que ninguno de los eventos de muerte embrionaria se produjo el mismo día de la aplicación de CPF sobre el huevo, al menos para los grupos

expuestos el día 4 y 14. Esto induce a pensar que la aplicación de tóxicos sobre la cáscara del huevo podría tener una incorporación mediata y, los efectos podrían presentarse en días posteriores en comparación con los efectos casi inmediatos que se observan por el mecanismo de inyección *in ovo*.

En el caso de los insecticidas organoclorados, las muertes embrionarias se asocian en ocasiones con rupturas de la cáscara de huevo por su adelgazamiento y fragilidad (Holm *et al.*, 2006; Ceyca Contreras, 2015). Este fenómeno también se ha evidenciado con otros compuestos orgánicos persistentes como el plomo, que, al encontrarse vinculado con los depósitos de calcio, tiene capacidad de depositarse en la cáscara de los huevos y su contenido, lo que afecta al desarrollo, el crecimiento y la eclosión de los pichones, en especial para especies de aves que nacen con un bajo grado de desarrollo (Williams *et al.*, 2017). En nuestro estudio, no se detectaron diferencias en el grosor de la cáscara de los huevos tratados y no tratados con CPF, por lo que pensamos que los eventos de muerte embrionaria no se vinculan con alteraciones de la cáscara y su fragilidad. Consideramos variable como potencial biomarcador de efecto, dado que desde hace años se vincula la reducción del grosor de la cáscara y el aumento de su fragilidad con la exposición a plaguicidas organoclorados y sus metabolitos (Hellou *et al.*, 2016), lo cual al parecer no se produciría con organofosforados, o al menos no en el caso del CPF.

Por otra parte, sólo se presentaron 2 eventos de eclosión fallida en huevos expuestos a CPF. Debido a la baja frecuencia de presentación de este evento, no fue considerado como relevante. Slotkin *et al.* (2008) observan que dosis repetidas de 20 µg/g aplicadas en la cámara de aire del huevo provocan hasta un 34% de fallas en la eclosión, ya que la exposición repetida y directa podría deprimir la actividad de la enzima AChE y afectar procesos neuromusculares imprescindibles para la eclosión y el nacimiento del pichón. La diferencia entre este último estudio y el nuestro radica en la forma y número de aplicaciones de CPF, ya que la dosis utilizada es similar a la implementada en nuestro ensayo. Las vías de exposición mediante inyección *in ovo* resultan poco reales al momento de simular las condiciones que ocurren en el ambiente. Consideramos que una exposición repetida a lo largo de la incubación, podría generar efectos acumulativos que concluyan en la falla del nacimiento del pichón. Es posible que una única exposición no sea suficiente para alterar el mecanismo de la ruptura de la

cáscara del huevo y el nacimiento del pichón, pero sí para generar depresión de los niveles de ChE plasmática.

Uno de los efectos más observados por otros autores en la exposición a CPF durante el desarrollo embrionario es la presentación de malformaciones, especialmente a concentraciones elevadas, tal como se presentó en nuestro estudio. Sin embargo, estas malformaciones no generarían problemas aparentes en el momento de la eclosión. Del total de pichones tratados y nacidos vivos (n=45), el 22% (n=10) presentaron algún tipo de anomalía morfológica. La mayor frecuencia de anomalías se presentó en las concentraciones de 192 µg CPF/huevo y 384 µg CPF/huevo. Esto es coincidente con lo hallado por otros estudios, donde un 17% de las crías de pollo (Slotkin *et al.*, 2008) y el 18,6% de las crías de codorniz japonesa (Martin, 1990) expuestas a CPF *in ovo* desarrollaron defectos anatómicos. Las alteraciones que comúnmente se describen en estos casos y ordenadas por mayor frecuencia consisten en: posición anómala de pies y piernas (pie zambo), anomalía de columna axial (lordosis, cifosis y escoliosis), órganos externalizados (gastrosquisis) y pico cruzado, entre otras patologías menos frecuentes (Martin, 1990; Uggini *et al.*, 2012; Farhat *et al.*, 2020). La mala posición de los pies y piernas fue la principal anomalía manifestada en los pichones de nuestro estudio (9/10 individuos) y solo uno presentó características de cifosis cervical. Dos de los pichones también presentaron edema en patas, efecto que también fue observado en pichones de pollos expuestos a CPF durante la incubación (Uggini y Suresh, 2013). En comparación con los estudios que inyectaron el CPF dentro del huevo, nuestros resultados refuerzan la hipótesis de que este insecticida también puede difundir desde el exterior a través de los poros de la cáscara del huevo y generar alteraciones en el desarrollo de los pichones (Kertész, 2001). Si es posible detectar un potencial riesgo de generación de anomalías en aves que reciben una única dosis subletal de CPF en el breve período de tiempo que dura su gestación, resulta preocupante pensar en las implicancias de exposiciones durante la gestación de organismos que tengan periodos mayores, como mamíferos y, entre ellos, los humanos (Chaudhary *et al.*, 2017), teniendo en cuenta que compuestos como el CPF pueden persistir largo tiempo en los tejidos.

Efectos teratogénicos similares a los descriptos para el CPF también han sido observados desde hace más de 40 años para un gran grupo de OFs como el paratión, azinfós, diclorvós, malatión, entre otros. Desde entonces, los efectos de la columna axial y el esqueleto en aves se han atribuido y correlacionado con alteraciones del sistema

nervioso colinérgico (Hoffman, 1990). La temporada reproductiva es coincidente con la época de mayor aplicación de estos plaguicidas en los agroecosistemas y, los nidos de aves se ven directamente expuestos a su rociado, por lo que el desarrollo de malformaciones en la progenie implica serias amenazas para la sobrevivencia y la demografía de las poblaciones silvestres que habitan estos ambientes (Mahmood *et al.*, 2016). La posibilidad de reportar datos útiles que reflejen esta situación facilitaría el desarrollo de estrategias que permitan una condición armónica entre la protección de especies silvestres y la aplicación de técnicas químicas agrícolas más amigables con el ambiente (Várgany y Budai, 1995).

Los eventos de disminución de la masa corporal o alteración del tamaño de estructuras óseas pueden ser claros signos de aumento de estrés prenatal en aves (Henriksen *et al.*, 2011), con los que pueden asociarse múltiples causas relacionadas a factores externos al huevo, salud de los padres o del mismo pichón. En nuestro estudio, tomamos el peso corporal y la longitud tarsal como variables que puedan evidenciar respuestas al estrés por exposición al insecticida. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas entre los pichones pertenecientes a controles negativos y los pertenecientes a grupos tratados. Tampoco se observaron diferencias para estas variables entre los distintos días de exposición a CPF. Martin (1990) reporta para codorniz, valores de peso similares a los de nuestro estudio luego de exposición por inmersión en una solución de CPF al 48%, pero los valores de longitud tarsal reportados expresan en promedio, un valor superior a 3-4 mm respecto de nuestros pichones. Consideramos que esto último puede deberse a variaciones intraespecíficas de razas o variedades de codorniz, y no a un efecto de estrés generado por la exposición a un tóxico, dado que los grupos no expuestos deberían evidenciar diferencias en este caso. La autora antes citada, tampoco observa diferencias de peso o longitud tarsal entre grupos controles y expuestos.

Es necesario destacar que la MitC se utilizó en grupos controles positivos como potencial genotóxico. Sin embargo, pudimos observar que estos grupos expuestos por topicación a concentración de 0,1 mg/huevo también presentaron muertes embrionarias, eclosiones fallidas y pichones con anomalías morfológicas en frecuencias similares a los grupos tratados con las 2 concentraciones más elevadas de CPF. Esto podría indicar que el principio activo utilizado también resultaría útil como potencial control positivo para ensayos de embriotoxicidad en huevos como modelo experimental.

Para nuestro análisis histopatológico de hígado y riñón, es necesario aclarar en primer lugar, que a todos los pichones nacidos vivos se les extrajo hígado y riñón para análisis histopatológico. Sin embargo, no pudimos en todos los casos, llevar adelante el análisis debido a situaciones relacionadas con la extracción de biopsia y su tamaño, o con alteraciones en el proceso de la preparación de la muestra, que no permitieron la obtención de un preparado histopatológico de calidad suficiente para la evaluación. Debido a ello, en la tabla 5, se expresa en número de pichones nacidos vivos, lo cual puede no ser coincidente con la cantidad de hígados y riñones analizados y presentados en las tablas 6 y 7.

Las respuestas metabólicas a insecticidas anticolinesterásicos son similares entre aves y mamíferos en una primera y segunda fase de detoxificación, aunque las aves resultarían ser más sensibles a desarrollar los efectos adversos que producen estos principios activos, debido a los bajos niveles de enzimas hepáticas (Anwar y Shakoori, 2010). Por esta razón, que el análisis de alteraciones histopatológicas en hígado como principal órgano detoxificante, y de riñón como órgano clave que interviene en la excreción de residuos, puede resultar valioso para alertar sobre potenciales consecuencias durante el desarrollo embrionario.

Se ha observado que la vesícula biliar, como órgano anexo y vinculado directamente al hígado, sufre aumentos de tamaño ante la exposición a CPF en pichones de gallinas expuestos *in ovo* (Farhat *et al.*, 2020). Esto se debe posiblemente, a procesos que interrumpen la biosíntesis de ácidos biliares o afectan la circulación enterohepática, tal como se ha observado con otros compuestos fosforados como los retardantes de llamas (Egloff *et al.*, 2014). Es probable que esta secuencia de efectos comprometa de forma directa el parénquima hepático, y esto pueda ser evidenciado en modificaciones histológicas del tejido tal como pudimos observar en nuestro estudio.

En general, para los pichones que fueron sometidos a la exposición de las 2 concentraciones más elevadas de CPF, se pudieron detectar alteraciones del tejido hepático determinado por cambios en la estructura y el color del parénquima, dilatación del espacio sinusoidal y alteración del grado de conservación del citoplasma y núcleo celular. La bibliografía resulta insuficiente para comparar nuestros efectos con otros autores que utilicen exposiciones a CPF en aves. Sin embargo, signos como aumento en la dilatación del espacio sinusoidal, acidofilia y necrosis, diverso grado de vacuolización citoplasmática y alteraciones del núcleo del hepatocito (condensación y

picnosis) han sido también destacados en polluelos de gallinas expuestas a insecticidas como cipermetrina y dicofol (Anwar *et al.*, 2004; Khurshid *et al.*, 2010; Bhaskar *et al.*, 2014). Se han descritos efectos hepáticos similares en ratas expuestas a CPF, donde se estima que la dilatación sinusoidal puede deberse a un proceso inflamatorio agudo, mientras que la vacuolización, infiltración celular, picnosis y acidofilia se vincularían a un aumento de especies reactivas de oxígeno que provocan daño a las membranas y proteínas celulares (Nishi y Hundal, 2015).

Nuestro análisis histopatológico en hígado se plantea desde una evaluación cuali-cuantitativa, que de acuerdo con la extensión que presenta un defecto sobre el tejido visualizado en los campos microscópicos, puede ser incluido en una categoría numérica que refleje la severidad del daño tisular (Arrieta-Mendoza *et al.*, 2007). La relación establecida entre el día de exposición y los efectos histopatológicos fue poco concluyente. Sin embargo, observamos asociación aparente entre las concentraciones utilizadas y la severidad de los efectos analizados. El análisis de correspondencia demuestra que, a mayor concentración recibida, aumenta la tendencia a desarrollarse alteraciones histopatológicas de mayor severidad y extensión. Los grupos expuestos a la concentración de 384µg CPF/ huevo parecen asociarse a las categorías más altas de daño tisular, donde puede observarse una evidente dilatación del espacio sinusoidal, acidofilia que se extiende más del 50% promedio del tejido hepático analizado, totalidad de hepatocitos vacuolizados, concentración de grandes vacuolas intracitoplasmática y entre un 50% a un 75% de los hepatocitos con núcleos condensados o picnóticos. Todas estas alteraciones son posibles de ser observadas en células que transitan el camino de la apoptosis o necrosis. Consideramos que este nivel de daño hepático representa una importante amenaza a las probabilidades de supervivencia perinatal de los pichones, si bien se han desarrollado hasta el momento de su eclosión. Resultaría interesante evaluar la viabilidad de los ejemplares ahora que reconocemos el nivel de daño tisular generado ante concentraciones elevadas. Supone aún una mayor gravedad pensar en las probabilidades de supervivencia en pichones de aves silvestres expuestos a concentraciones elevadas en ecosistemas agrícolas, dado que luego de nacer, deben hacer frente también a otros factores de riesgos como enfermedades, falta de alimento, estrés hídrico y térmico o incluso, exposición a nuevas mezclas de otros contaminantes.

La fisiología renal relacionada con el flujo sanguíneo, la concentración de sustancias y la biotransformación de compuestos originales, hace que este tejido sea

sensible a una gran variedad de toxinas (Nishi y Hundal, 2015). Esta compleja fisiología es sustentada por gran cantidad de estructuras diferentes que componen la nefrona, y en adición, es posible observar diversos procesos histopatológicos en cada una de estas estructuras, lo que resulta en un análisis más detallado y minucioso que el de hígado. Bajo este aspecto, el modo categórico implementado para el tejido hepático resulta menos adaptable. Sin embargo, consideramos que destacar los eventos que más se repiten (moda), son los resultados que mayormente representan los efectos ante la exposición a CPF. El hecho de conocer cuáles son las estructuras más afectadas y las lesiones más frecuentes ante este tipo de exposición, podría resultar útil en la aproximación diagnóstica ante potenciales eventos de intoxicación, incluso por exposición durante el desarrollo embrionario.

Es variada la cantidad de estructuras renales que se han visto alteradas en cada grupo de exposición, aunque se observa una tendencia a que, a mayor concentración de CPF, también aumenta la cantidad de estructuras renales afectadas, en especial para la concentración más alta. En comparación con el grupo control negativo, la diversidad de lesiones observadas sobre las estructuras renales también es mayor. Resulta lógico pensar entonces que, tal como se observa en la figura 36, existe una asociación entre la concentración de exposición y la cantidad de estructuras renales afectadas con grados diversos de lesiones desarrolladas.

Se ha observado que el daño renal basado en necrosis tubular es acción directa de compuestos OF, lo que representa la segunda causa de muerte después de los signos colinérgicos en intoxicaciones de aves (Kammon *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2015; Nishi y Hundal, 2015). El mismo tipo de daño tisular se ha observado en nuestro estudio, lo que nos aproxima a pensar que la incorporación del CPF se realiza a través de la cáscara del huevo y no solo es metabolizado en hígado, sino también que alcanza y afecta al tejido renal. En nuestro análisis, pudimos determinar que son 3 las estructuras que desarrollan con mayor frecuencia algún tipo de lesión tisular: el túbulo contorneado proximal, el túbulo contorneado distal y el túbulo colector. En coincidencia, las 2 lesiones más observadas en los grupos tratados con CPF fueron, la necrosis tisular focal y el desprendimiento del epitelio tubular, seguidas por la cariólisis y la vacuolización citoplasmática que pueden representar fases tempranas de degeneración y muerte celular.

Los días de exposición no tuvieron un efecto aparente en el desarrollo de lesiones tisulares. Sahu y Ghatak (2002) tampoco observaron efecto de lesiones renales en virtud del día de exposición por exposición *in ovo* con el OF dimecrón, pero sí determina un alto número de estructuras renales lesionadas, y destacan en especial, lesiones como el desprendimiento epitelial y la necrosis de los túbulos contorneados. Las aves presentan entre un 70 a 90% de sus nefronas con cortas porciones de TCP y TCD, este último muchas veces inexistente (Braun, 1998). Esto hace que las aves sean menos eficientes que los mamíferos en el proceso de concentración de orina, y un potencial daño sobre estas estructuras podría conducir al rápido desarrollo de desequilibrios homeostáticos que finalicen con la muerte del ejemplar. Asociar la complejidad de un examen histopatológico del riñón con el valor de urea y otros metabolitos sanguíneos para valoración de funcionalidad renal (creatinina, urea, fósforo y calcio) podría ayudar a esclarecer la verdadera afección que deben enfrentar y compensar los organismos expuestos a CPF.

Tanto en tejido hepático como en tejido renal se ha evidenciado una respuesta de concentración- efecto, donde las lesiones histopatológicas tienden a aumentar a mayores concentraciones de exposición. Esto hace suponer, en primer lugar, que la exposición a CPF tal como ocurre en el ambiente, en forma de un rociado y sólo sobre la cara descubierta del huevo, es suficiente para ser potencialmente internalizada y producir afección tisular. Las altas concentraciones de CPF utilizadas simulan preparaciones manuales y domésticas, con falta de conocimientos y sin control, que se utilizan en la actualidad para prácticas de fumigación en nuestro país. La acumulación de lesiones hace reflexionar sobre la perpetuidad y los potenciales riesgos a los que se encuentra expuesta la avifauna de sitios agrícolas y los humanos que comparten el hábitat con ellas.

El primer estudio para evaluar el efecto micronucleogénico en los eritrocitos a lo largo de la fase embrionaria en aves fue propuesto bajo modelos de huevos fecundados de gallinas con inyección de agentes genotóxicos en su cámara de aire (Wolf y Luepke, 1997). Luego, la técnica fue replicada y adaptada por varios investigadores para generar estudios centrados en la valoración de biomarcadores combinados en modelos experimentales similares (Sharaf *et al.*, 2010; Greywe *et al.*, 2012; Ceyca *et al.*, 2014). En aves silvestres, la recolección de huevos con desarrollo embrionario es limitado o prohibido en algunos países (Stončius y Lazutka, 2003), incluso en Argentina, lo que ha

restringido la validación del ensayo en sus poblaciones. Sin embargo, se estima que los efectos toxicológicos observados en modelos de laboratorios pueden resultar convenientemente transferibles a organismos silvestres, siempre que puedan ser simuladas de la forma más realista posible las condiciones de exposición de los individuos en el ambiente (Raimondo *et al.*, 2007).

Las etapas tempranas de la vida de los organismos ovíparos a menudo exhiben una mayor sensibilidad toxicológica a los contaminantes químicos, debido a la inmadurez de los sistemas de reparación y desintoxicación. En particular, la maduración de un sistema retículo endotelial que facilita la eliminación de eritrocitos dañados; la activación de antioxidantes y sistemas de reparación de ADN; y la reactivación de células hematopoyéticas que restablezca el número de células afectadas serían mecanismos menos efectivos que en organismos adultos (Zúñiga- González *et al.*, 2001; López- González *et al.*, 2017). Esto podría aumentar la susceptibilidad de algunas crías ante ciertos eventos de exposición. Por estas razones, consideramos al huevo embrionado como un modelo valioso que permite observar el efecto directo de los estresores ambientales sin producir sesgos relacionados con la acción de la fisiología o el metabolismo de los progenitores, tal como ocurriría en organismos vivíparos (Stončius, 2003), siempre y cuando no existan condiciones previas de índole metabólica o nutricional en la hembra que puedan originar potenciales defectos en la calidad del huevo.

La presencia de micronúcleos en los eritrocitos se considera un indicador de daño genético (Sandoval-Herrera *et al.*, 2021). Algunos contaminantes, principalmente metales no esenciales, compuestos orgánicos halogenados, agroquímicos e hidrocarburos aromáticos policíclicos pueden alterar la formación del huso mitótico o causar daño o pérdida cromosómica y, en consecuencia, pueden dar lugar a la formación de micronúcleos (Matsumoto *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2010; Dourado *et al.*, 2016). Los resultados de nuestro estudio revelaron que la formulación comercial de CPF, ampliamente aplicada en sistemas agrícolas de nuestra región, induce efectos genotóxicos en embriones de codorniz bajo un único momento de exposición por aplicación sobre la cáscara del huevo. Observamos frecuencias de marcadores de genotoxicidad significativamente mayores en todos los grupos expuestos a CPF. Se han reportado efectos genotóxicos para este pesticida en embriones de pollos, estimando que los efectos clastogénicos/aneugénicos podrían aumentar ante la presencia combinada de

este insecticida con otros principios activos como la cipermetrina (Uggini y Suresh, 2013). Situación similar se describe para combinaciones de CPF y otros insecticidas/herbicidas en huevos embrionados de yacaré overo (López-González *et al.*, 2019). Este último estudio, también postula que los compuestos usados como vehículos del principio activo y que constituyen parte de la formulación comercial, podrían tener un rol importante al generar un efecto potenciado por una acción sinérgica o aditiva entre sustancias. Las propiedades químicas de cada formulación, la toxicocinética, las rutas metabólicas, la interacción con otros compuestos y el mecanismo de acción de cada grupo tóxico pueden producir efectos muy variables (Hernández *et al.*, 2013).

Resulta importante destacar que las normativas actuales no exigen a los formulados comerciales detallar la totalidad de los componentes, y las sustancias utilizadas como vehículos son expresadas bajo el concepto de “excipientes”. En nuestro estudio, sólo utilizamos un único insecticida comercial, y no fue posible identificar y contar con el medio vehiculizador por separado para desarrollar el ensayo, por lo que los resultados obtenidos deberían contemplarse como efectos producidos por exposición a la formulación comercial completa.

Entre los biomarcadores analizados para determinar genotoxicidad, pudimos observar que los MN fueron los que presentaron las diferencias más contrastantes entre las frecuencias expresadas por grupos tratados y controles. La exposición en un único momento y con una única formulación comercial de CPF permitió detectar aumentos en las frecuencias de MN para todos los grupos tratados, superando en promedio entre 4 a 8 veces más los valores detectados en los grupos no tratados. Sin embargo, no se observó un efecto concentración- dependiente. Los valores alcanzados fueron similares a los expresados por los grupos controles positivos expuestos a MitC como compuesto genotóxico de referencia. Speit *et al.* (2000) sostienen que el efecto concentración- dependiente puede alterarse si las vías de llegada del genotóxico a su sitio de acción se ven saturadas, impidiendo una mayor acción del tóxico en virtud de la concentración aplicada. También, la activación forzada de mecanismos de reparación y eliminación de defectos a nivel genético y celular podrían implicar modificaciones, aunque consideramos que son condiciones menos efectivas en individuos recién nacidos. Para conocer si la llegada del genotóxico al tejido es la misma independientemente de la concentración aplicada, requeriríamos de la incorporación de métodos analíticos que puedan detectar las concentraciones alcanzadas por el CPF en sangre del embrión.

Resulta preocupante observar que la concentración comúnmente implementada a campo tiene el mismo potencial micronucleogénico que otras concentraciones más altas. Es decir, concentraciones de 38,4µg CPF/ huevo presentan similar riesgo de genotoxicidad que concentraciones 5 y 10 veces superiores. Solo bajo esta mirada, concentraciones sugeridas como seguras resultarían controversiales, dado que provocarían condiciones subclínicas difíciles de detectar en animales a campo y que representan potenciales signo de exposición. Si estas condiciones se encuentran presentes al momento del nacimiento y persisten como base durante la vida del individuo, ante exposiciones crónicas y subletales, pueden contribuir con la acumulación de daño celular que desencadene de forma temprana situaciones de toxicidad o patológicas, tal como ocurre con el daño genético en personas u otros organismos expuestos a contaminantes a lo largo de su vida (Cardoso *et al.*, 2001; Bolognesi *et al.*, 2009).

Por otro lado, esperábamos observar un aumento de la frecuencia de biomarcadores de genotoxicidad en embriones expuestos durante los primeros días de la gestación, ya que suponíamos una acción continua e ininterrumpida del CPF a lo largo del estadio gestacional. Sin embargo, tampoco fue posible establecer una relación entre la frecuencia de MN y otras AN con el momento de la exposición. Para todos los grupos expuestos a una misma concentración, se observaron frecuencias similares entre los distintos días de aplicación. Esto podría sugerir que, independientemente del momento en el que el embrión recibe el CPF durante su gestación, la potencia del genotóxico resulta similar, al igual que ocurre con las distintas concentraciones de exposición. Resultaría interesante evaluar bajo este mismo modelo experimental, los efectos producidos por más de una única aplicación a lo largo del período de incubación.

Se hipotetiza que algunas alteraciones nucleares podrían ser inducidas por la acción de ciertos compuestos genotóxicos, pero no necesariamente serían inductoras de la formación de MN (Kirschbaum *et al.*, 2009; Seriani *et al.*, 2015). En nuestro estudio, pudimos observar que algunas AN encontradas en eritrocitos de pichones de codorniz mostraron frecuencias mayores en la mayoría de los grupos tratados con CPF, aunque sin establecer una relación concentración-dependencia. Los Hn, por ejemplo, fueron la segunda alteración nuclear que mayores diferencias presentó, al aumentar en promedio entre 1,8 a 2 veces por encima del valor expresado para los grupos control negativo. Al igual que en aves adultas, alteraciones como los eritroplástidos y los Np también

presentaron altas frecuencias y, si bien los grupos tratados con CPF presentaron pequeños aumentos de sus frecuencias, estas diferencias no resultaron significativas frente a los controles negativos. Sin embargo, el análisis de las frecuencias para la totalidad de alteraciones nucleares en conjunto (ANT) sí determinó diferencias estadísticas entre los grupos que recibieron el tratamiento. Consideramos importante contemplar las frecuencias individuales de cada alteración nuclear y también en su totalidad, al igual que fue planteado para el análisis de eritrocitos en aves silvestres. Aunque los mecanismos implicados en la formación de estas anomalías aún son desconocidos, las modificaciones en sus frecuencias podrían reflejar una alerta temprana de daño genotóxico o citotóxico, especialmente si estos análisis se acompañan de biomarcadores de efecto a nivel celular y biomarcadores de exposición.

Se estima que la mayoría de las células sanguíneas embrionarias provienen del saco de la yema, uno de los tejidos más ricos en lípidos y con mayor tasa metabólica del embrión (Wolf *et al.*, 2003). Su predilección a ciertas sustancias lipofílicas podría representar un riesgo para la generación de diversas alteraciones. Luego de una exposición durante la gestación, es posible observar efectos citotóxicos y genotóxicos en eritrocitos de pichones recién nacidos, dado que persisten hasta que se alcanza la madurez del bazo, órgano del sistema retículoendotelial que se encarga de eliminar las células defectuosas (Uggini y Suresh, 2013). Se ha reportado que por efecto de la cipermetrina se producen aumentos de las frecuencias de proeritroblastos, eritroblastos y eritrocitos policromáticos (células jóvenes o inmaduras), como así también de diversas anomalías del núcleo celular como lobulaciones y fragmentaciones (Wolf *et al.*, 2002; Sharaf *et al.*, 2010). En nuestro estudio, sólo se analizaron alteraciones genotóxicas en eritrocitos maduros, los cuales suponemos que se mantienen sin modificaciones hasta momentos posteriores al nacimiento, donde se produce la maduración de los órganos del sistema retículoendotelial. No realizamos la caracterización de la línea eritrocitaria, pero resultaría valioso incorporar este biomarcador, dado que el análisis conjunto de perfiles hematológicos y test de MN-Citoma en eritrocitos puede representar una combinación útil para estimar el potencial daño generado en las células sanguíneas y al sistema hematopoyético.

Por otro lado, estimamos que sería valioso conocer si el efecto sobre la actividad ChE plasmática presentaba alguna posible relación con los resultados del test de MN-Citoma, a fin de establecer asociación entre un biomarcador de exposición y

biomarcadores de efecto genotóxico. Pudimos observar que no existió una relación directa o inversa entre la depresión de la actividad ChE plasmática y las alteraciones nucleares. En base a esto, consideramos que el efecto del CPF puede ser variado y con una potencia desigual para diversos tejidos y moléculas, por lo que resultaría difícil establecer una misma intensidad de efecto sobre marcadores que representan moléculas y procesos metabólicos o toxicocinéticos diferentes.

Las colinesterasas son proteínas catalizadoras que se encuentran presentes especialmente en hígado, sangre y sistema nervioso. Estas enzimas no solo tienen una función neuromuscular, sino que también actúan como “llave” en procesos regulatorios de hormonas hipotalámicas, hipofisarias y en procesos gonadales que intervienen en el correcto desarrollo del embrión (Rico *et al.*, 2006). La disrupción del sistema colinérgico se ha asociado con defectos de la columna axial. Su depresión en la fase de desarrollo embrionario podría resultar letal, dado que la AChE actúa como molécula neurotrópica regulando la proliferación, diferenciación y migración de células del sistema nervioso (Richardson *et al.*, 1993; Uggini *et al.*, 2012). Como consecuencia, los defectos del desarrollo neuronal y del esqueleto, en adición a cambios comportamentales prenatales, pueden derivar en signos convulsivos o descoordinados que impidan la correcta eclosión y maduración perinatal del pichón (Meneely y Wittenbach, 1989). Se ha observado también, que la disminución de la actividad enzimática cerebral y plasmática, por exposición a anticolinesterásicos, se acompañe efectos teratológicos, embriotóxicos y fallas en la eclosión (Ismail, 2012). La inhibición de la actividad ChE plasmática hallada en nuestro estudio y la teratogénesis desarrollada por algunos pichones de grupos tratados podrían estar reflejando condiciones similares a las detalladas.

Las colinesterasas cerebrales en embriones, se han utilizado para reconocer el potencial efecto neurotóxico y sus implicancias en la supervivencia. Las colinesterasas plasmáticas y de otros tejidos, son importantes para evaluar el alcance y detectar las potenciales intoxicaciones inducidas por organofosforados (Worek *et al.*, 2005). La inhibición de la colinesterasa plasmática en un 20-30% indica por lo general, exposición a organofosforados; una inhibición del 50% refleja eventos de intoxicación grave con efectos adversos en la salud; mientras que una inhibición mayor al 66% resulta mortal para los embriones de gallinas (Worek *et al.*, 2005; Nerváez *et al.*, 2016). Aun a dosis subletales, se ha observado que la exposición *in ovo* con compuestos organofosforados

pueden producir reducciones abruptas y riesgosas de la actividad ChE en aves. Por ejemplo, Pushpanjali *et al.* (2005) y Alhifi *et al.* (2018) informan inhibiciones de la actividad enzimática encefálica de hasta un 44% por inyección *in ovo* con CSF, dimetoato o metidatió. Niveles similares son reportados por Nervaes *et al.* (2016) para colinesterasas plasmática en pichones de codorniz expuestos a dosis subletales y subcrónicas de CPF. En nuestro estudio, pudimos observar variadas tasas de inhibición de AChE plasmática en los distintos grupos tratados, con valores hasta 38,4% más bajos que el grupo no tratado. La inhibición de la actividad ChE indica claramente que el CPF puede actuar como un compuesto potencialmente tóxico en embriones de codorniz, incluso con un único evento de exposición sobre la superficie del huevo.

En la actualidad, son escasos los reportes que abordan el efecto directo del CPF sobre la actividad ChE plasmática, en codornices durante el desarrollo embrionario, y en especial sobre las colinesterasas plasmáticas. En nuestro estudio, observamos que existe una aparente influencia entre el día de exposición y una menor actividad enzimática, que se acentúa en particular para los grupos expuestos en el día 4 y 14. Un patrón similar es descrito por Narváez *et al.*, (2016), quienes observan que los niveles de colinesterasas se mantienen sin alteraciones significativas hasta los 14 días de incubación en embriones de gallinas expuestos a dosis subletales de CPF. Sin embargo, se ha sugerido que la magnitud del efecto inhibitor sobre los niveles de colinesterasas puede cambiar a lo largo de la incubación, ya que los embriones de aves serían capaces de sintetizar rápidamente nuevas moléculas de diversas esterases que compensen o reestablezcan la supresión producida (Holmes y Boag, 1990). Entonces, los individuos expuestos en los primeros días de incubación a concentraciones subletales únicas presentarían mayores probabilidades de recuperar niveles de actividad enzimática lo suficientemente competentes para evitar problemas con la eclosión. En base a lo planteado, se puede suponer que exposiciones generadas en estadios avanzados serían de mayor riesgo, al comprometer repentinamente sistemas que cumplen un rol crítico en el nacimiento de los polluelos.

Resulta llamativo que las diversas concentraciones de CPF utilizadas en nuestro estudio, no hayan generado un efecto de concentración-respuesta para la actividad de ChE plasmática. Es probable que las dosis internalizadas en el huevo resulten en dosis subletales, lo suficientemente altas para generar efectos histopatológicos y enzimáticos, pero no tan severas para causar una inhibición de colinesterasas plasmáticas por encima

del umbral que desencadene la muerte aguda de todos los embriones, aunque desconocemos los valores de ChE de los pichones que resultaron muertos posterior al tratamiento con CPF. Las colinesterasas plasmáticas son producidas en el hígado y actúan como una primera barrera de defensa ante la exposición a anticolinesterásicos, atenuando el efecto de los mismos en el sistema nervioso (Santarpia *et al.*, 2013; Legler y Kummerfeld, 2016). Suponemos que altas y/o repetidas concentraciones de exposición a CPF podrían promover la degeneración de hepatocitos en estadios tempranos de incubación, tal como fue observado en el presente estudio para las dosis de 192 µg CPF/ huevo y 384µg CPF/ huevo. Esto induce a pensar que, ante una potencial exposición durante la incubación, la reducción de los niveles de colinesterasas plasmáticas podría vincularse, por un lado, a la disminución de la síntesis de compuestos colinesterásicos en hígado por daño tisular inducido por CPF y, por otro lado, a la inhibición de actividad enzimática por acción directa del anticolinesterásico.

En base a lo anteriormente planteado, consideramos que la exposición a CPF durante el desarrollo embrionario representa una serie de riesgos potenciales en vinculación con la concentración y el momento de exposición. Exposiciones a concentraciones elevadas o subletales repetidas en estadios tempranos de la incubación podrían promover afecciones del tejido hepático que reduzcan la correcta síntesis de colinesterasas plasmáticas. Esto facilita también la afección del sistema colinérgico, promotor de múltiples funciones en la embriogénesis, lo que favorecería la presentación de efectos teratogénicos y embriotóxicos. Pero, por otro lado, la exposición en estadios finales del desarrollo fetal podría suponer una inhibición abrupta de los niveles de colinesterasas, sin tiempo o capacidad para la síntesis de nuevas moléculas y, por consiguiente, en un aumento de las posibilidades de desarrollar condiciones que impidan la eclosión o comprometan la supervivencia perinatal de los pichones.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El objetivo principal de este estudio se centró en sustentar el uso de aves silvestres como bioindicadores de estudios ecotoxicológicos a través de modelos que permitan demostrar cómo se comportan determinados biomarcadores ante la exposición a compuestos anticolinesterásicos. El clorpirifos fue el insecticida escogido como prioritario para llevar adelante los estudios en aves a campo como en laboratorio, dado que es el insecticida mayormente aplicado en los sistemas agrarios de la provincia de Mendoza y la región. Este estudio no se encuentra aislado, sino que forma parte de un programa de investigación que pretende postular a diversos animales como centinelas de salud ambiental. En este marco, cobran importancia aquellas especies que conviven en cercanía con el ser humano, ya sea por ser mascotas, ganado o fauna silvestre peridoméstica, quienes podrían demostrar anticipadamente los riesgos de la exposición a contaminantes ambientales.

Dado que la exposición a plaguicidas puede cobrar significancia a lo largo de toda la vida, incluso durante la gestación, es que el presente estudio se dividió en dos etapas. Por un lado, se intentó vislumbrar los efectos y modificaciones en biomarcadores enzimáticos, hematológicos y genotóxicos en aves silvestres adultas que habitan un escenario real, donde se aplican estrategias agrícolas, como la fumigación con formulaciones comerciales de clorpirifos. Por otro lado, sin generar impacto directo sobre el ambiente, se implementa un modelo de laboratorio con huevos de codorniz común para destacar los efectos generados por una formulación comercial de clorpirifos durante etapas claves del desarrollo embrionario, simulando concentraciones y formas de aplicación similares a las que ocurren en el ambiente.

En líneas generales, ha sido posible observar efectos variados en los distintos biomarcadores analizados para aves adultas y pichones. Esto indica que las aves son organismos sensibles al uso de insecticidas durante el control de plagas en sitios agrícolas. Su estrecha convivencia con el humano podría representar un claro reflejo de los efectos que producen algunos plaguicidas en especies no blanco y se convierten en alertas tempranas de exposición. A continuación, se presenta las reflexiones que destacamos de mayor importancia y algunas perspectivas al respecto.

El gorrión doméstico y la torcacita común resultarían ser dos de las especies escogidas como bioindicadores dentro de la comunidad de aves presente en la región.

Dada su abundancia, distribución cosmopolita, facilidad de manipulación y sus hábitos peridomésticos en cercanía con el humano, les asignamos un rol fundamental para el análisis de nuestros resultados. Sus características los convierten en bioindicadores con ventajas y relevancia biológica, metodológica y social. Consideramos que cada región debería tener en vista cuáles resultan ser las especies representativas que puedan ser de utilidad como centinelas ante una evaluación ecotoxicológica. Además, es importante destacar que ambos bioindicadores silvestres abordados en este estudio tratan de una especie exótica para nuestra región y una especie cuyo estado de conservación es “no amenazada”. Utilizar estas especies como potenciales modelos de laboratorio sería enriquecedor para evitar traspolaciones e interpretaciones de resultados interespecie.

Los biomarcadores de efecto vislumbran modificaciones de patrones estandarizados, sin la posibilidad de identificar el agente causante del fenómeno. Esto justifica el uso combinado de una batería de biomarcadores, especialmente cuando los monitoreos toxicológicos se realizan en escenarios reales y fuera de las condiciones controladas de laboratorio. En aves silvestres que habitan sitios agrícolas, días posteriores a la fumigación con clorpirifos o carbosulfán observamos alteraciones poco concluyentes en los perfiles hematológicos, pero sí se destacaron importantes reducciones en los niveles de la actividad de las enzimas colinesterasas plasmáticas, alcanzando situaciones de hasta un 47% menor. Los eritroplástidos y núcleos periféricos fueron las alteraciones nucleares que se asociaron con aves que habitan sitios fumigados. Si bien la variación de estos biomarcadores no determina la sobrevivencia de los animales, resultan útiles para considerar potenciales situaciones y riesgos de exposición a las que el humano en los mismos ambientes podría estar sometido. Sin embargo, ante escenarios ambientales complejos y presencia de múltiples contaminantes, resulta necesaria la complementación con biomarcadores de exposición que puedan identificar la presencia y concentraciones de los principios activos de interés.

Las aves resultarían aún más sensibles a los efectos del clorpirifos durante la gestación. Con aplicaciones únicas sobre la cáscara del huevo bajo tres concentraciones de una formulación comercial en los días 1, 4 y 14 de la gestación, se produjeron múltiples eventos que podrían evidenciar sospechas del potencial tóxico de este compuesto. Independientemente del día de exposición, los grupos tratados con CPF presentaron eventos de muertes embrionarias en comparación con los grupos control negativo. En estos últimos no se observaron muertes, mientras que los grupos expuestos

a concentraciones de 1X, 5X y 10X presentaron porcentajes de muertes embrionarias de un 5% (1 de 20 huevos fértiles), 28% (6 de 21 huevos fértiles) y 15% (3 de 19 huevos fértiles) respectivamente. Los valores más bajos de las colinesterasas en los grupos tratados podrían ser asociado también con la producción de estos eventos embriotóxicos. Si bien no observamos un comportamiento concentración- efecto o día-efecto, destacamos los potenciales efectos que genera una única exposición al plaguicida. Sería de suma importancia conocer los efectos frente a exposiciones reiteradas, lo cual simula una condición que tiene lugar en escenarios reales de los sistemas agrícolas de la región.

Las lesiones hepáticas y renales también son evidencias de los efectos provocados por estas sustancias en tejidos “no blancos”, pero implicados en la toxicocinética del principio activo. Una relación directa entre la concentración de clorpirifos recibida y el aumento de la severidad de lesiones hepáticas o, la cantidad de estructuras renales afectadas y diversidad de tipos de lesiones generadas en tejido renal, induce a pensar en qué medida las prácticas agrícolas actuales sobre el control de plagas podrían reducir las posibilidades de supervivencia de pichones gestados y expuestos en condiciones naturales, lo que podría comprometer las dinámicas demográficas de poblaciones aviares que habitan, componen e intervienen los agroecosistemas. El rol adjudicado de centinelas para alertar estas situaciones tiene un valor intrínseco que la sociedad debe rescatar a fin de contemplar estas especies como componentes necesarios e imprescindibles de los ambientes que habitan.

Hemos podido evidenciar aumentos de algunas alteraciones nucleares como micronúcleos en grupos tratados, independientemente de la concentración o momento de aplicación. Resulta llamativo que una única aplicación de clorpirifos a concentración sugerida por prospecto para fumigaciones y, otras de 5 a 10 veces más elevadas aplicadas como prácticas rutinarias a campo, puedan inducir daño clastogénicos/aneugénicos con una intensidad similar a la de un genotóxico conocido como la MitC. Entonces, es controversial la seguridad relativa que describen estos compuestos para algunos organismos, especialmente para aves en su etapa de incubación. El aumento de daño a diversos niveles: molecular, genético, tisular, orgánico e incluso poblacional representa serios riesgos para la perpetuidad de las especies en sistemas agrícolas. Las prácticas de conservación deberían adoptar variables

ecotoxicológicas cuando se pretenda valorar el estado y riesgo de ciertas poblaciones silvestres que habitan ambientes antropizados.

Nuestro estudio ha sido el primero en reportar valores para múltiples biomarcadores ecotoxicológicos en aves silvestres de la región y el país. La información descripta para variables hematológicas, valores de actividad AChE plasmática y frecuencias de alteraciones nucleares eran desconocidas hasta el momento, en la mayoría de las especies que incluye este estudio. Esto permite construir una base referencial a la hora de requerir comparaciones cuando se presentan distintos contextos ambientales y procesos de exposición o contaminación. También hemos aportado al conocimiento escaso que se tenía sobre los efectos producidos por el CPF en etapas del desarrollo embrionario de aves.

Argentina, poco a poco avanza hacia miradas más comprometidas en el uso de sus recursos, y otorga espacios a estrategias más innovadoras y amigables con el ambiente y la sanidad vegetal, animal y humana. El 04 de agosto del 2021 fue sancionada la resolución por la cual se prohíbe la importación de clorpirifos al país, para el año 2022 restringir su fraccionamiento y manufacturación, y finalmente para en el año 2023 prohibir de forma definitiva su comercialización y uso (Res. SENASA 414/2021).

Sin embargo, en las actuales condiciones de demanda de alimentos a nivel mundial y con la expansión de la agricultura, el uso de agroquímicos continúa en alza. Se exigen producciones de alta efectividad, que provean alimentos sanos y de calidad. Lineamientos y estándares internacionales exigen cada vez más la toma de decisiones para generar alimentos en ambientes sustentables y libres de contaminantes. No puede ignorarse el hecho de que los plaguicidas representan un riesgo para la salud humana y para la continuidad de poblaciones silvestres expuestas a estos compuestos. Sin embargo, esto no puede ser sustentado si no existen datos que respalden esta mirada. En la actualidad, la información ecotoxicológica para la mayoría de las especies de vertebrados silvestres de nuestro país es escasa, lo que nos impulsa como pioneros para continuar expandiendo el conocimiento en este fragmento de las ciencias ambientales. Las aves, poco valoradas y visibilizadas como componentes necesarios de los sistemas agrarios, cada vez cobran más importancia a la hora de alertarnos ante potenciales colapsos ambientales, y en este estudio han proporcionado importantes perspectivas. Como humanos, seres conscientes y con capacidad de proyectar un futuro, somos

responsables de garantizar la calidad de los ambientes y la perpetuidad de las especies para que puedan ser utilizadas, disfrutadas y exploradas por nuestras generaciones futuras.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham E, del Valle HF, Roig F, Torres L, Ares JO, Coronato F, y Godagnone R (2009). Overview of the geography of the Monte Desert biome (Argentina). *Journal of Arid Environments*, 73(2), 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2008.09.028>
2. Agustí Montolío S (2015). Estudio hematológico y la bioquímica sanguínea de las rapaces nocturnas ibéricas. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
3. Ahmad MZ, Khan A, Javed MT y Hussain I. (2015). Impact of chlorpyrifos on health biomarkers of broiler chicks. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 122, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.024>
4. Ahrestani FS, Saracco JF, Sauer JR, Pardieck KL y Royle JA. (2017). An integrated population model for bird monitoring in North America. *Ecological Applications*, 27(3), 916–924.
5. Ainsworth SJ, Stanley RL y Evans DJR. (2010). Developmental stages of the Japanese quail. *Journal of Anatomy*, 216 (1), 3–15. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01173.x>
6. Alharbi HA, Letcher RJ, Mineau P, Chen D y Chu S. (2016). Organophosphate pesticide method development and presence of chlorpyrifos in the feet of nearctic-neotropical migratory songbirds from Canada that over-winter in Central America agricultural areas. *Chemosphere*, 144, 827–835. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.052>
7. Alhifi MA. (2018). Effect of pesticides mixture of dimethoate and methidathion on acetylcholinestrerase during embryo development using chick embryo model. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, F. Toxicology y Pest Control*, 3(1), 19–26.
8. Alimba CG, Bakare AA. (2016). In vivo micronucleus test in the assessment of cytogenotoxicity of landfill leachates in three animal models from various ecological habitats. *Ecotoxicology*, 25(2), 310–319. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1589-3>
9. Allen GT, Veatch JK, Stroud RK, Vendel CG, Poppenga RH, Thompson L (1996). Winter Poisoning of Coyotes and Raptors with Furadan-Laced Carcass

- Baits. *Journal of Wildlife Diseases*, 32(2), 385–389. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-32.2.385>
10. Allende D, Ruggeri MF, Lana B, Garro K, Altamirano J y Puliafito E. (2016). Inventory of primary emissions of selected persistent organic pollutants to the atmosphere in the area of Great Mendoza. *Emerging Contaminants*, 2(1), 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2015.12.001>
 11. Ames RG, Brown SK, Mengle DC, Kahn E, Stratton JW y Jackson RJ. (1989). Cholinesterase activity depression among California agricultural pesticide applicators. *American journal of industrial medicine*, 15(2), 143–150.
 12. Anbumani S y Mohankumar MN. (2015). Nucleoplasmic bridges and tailed nuclei are signatures of radiation exposure in *Oreochromis mossambicus* using erythrocyte micronucleus cytome assay (EMNCA). *Environmental Science and Pollution Research*, 22(23), 18425–18436. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5107-1>
 13. Anderson TR. (2006). *Biology of the ubiquitous house sparrow: from genes to populations*. Oxford University Press. Oxford, Reino Unido.
 14. Anwar KK, Ali SS y Shakoori AR. (2004). Effect of a single sublethal dose of permethrin on the development of liver in chick embryo. *Pakistan Journal of Zoology*, 36(1), 59–68.
 15. Anwar K y Shakoori AR. (2010). Cypermethrin toxicity in the liver of developing chick embryo. *Pakistan journal of Zoology*, 42(6), 725–733.
 16. Aroch I, Targan N, y Gancz AY. (2013). A Novel Modified Semi-direct Method for Total Leukocyte Count in Birds. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 68(2), 111–114.
 17. Arora KL y Vatsalya V. (2011). Deleterious Effects of Molting on the Morphophysiology of Japanese Quail Layers (*Coturnix japonica*). *International Journal of Poultry Science*, 10(2), 120–124. <https://doi.org/10.3923/ijps.2011.120.124>
 18. Arrieta-Mendoza D, Perez-Arevalo ML, Luengo A, Hernández JP y Lista-Alves D. (2007). Alteraciones histológicas hepáticas e incremento de proteínas séricas en pollos de engorde alimentados con dietas suplementadas con *Saccharomyces cerevisiae*. *Investigación Clínica*, 48 (4), 341–443.
 19. ATSDR: Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (2016). Resumen de salud pública – Clorpirifos. Disponible

en:https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs84.html. Ultimo Acceso 05-05-2018

20. Augspurger T, Smith MR, Meteyer CU y Converse KA. (1996). Mortality of Passerines Adjacent to a North Carolina Corn Field Treated with Granular Carbofuran. *Journal of Wildlife Diseases*, 32(1), 113–116. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-32.1.113>
21. Badii MH y Varela S. (2008). Insecticidas organofosforados: efectos sobre la salud y el ambiente. *CULCyT, Cultura Científica y Tecnológica* 28, 5–17.
22. Baesse CQ, Tolentino VCdeM, Morelli S y Melo C. (2019). Effect of urbanization on the micronucleus frequency in birds from forest fragments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, 631–637. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.026>
23. Baesse CQ, Tolentino VCdeM, da Silva AM, Silva AdeA, Ferreira GÂ y Paniago LPM. (2015). Micronucleus as biomarker of genotoxicity in birds from Brazilian Cerrado. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.024>
24. Balcomb R, Stevens R y Bowen C. (1984). Toxicity of 16 granular insecticides to wild-caught songbirds. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 33(1), 302–307.
25. Ballesteros ML, Bianchi GE, Carranza M y Bistoni MA. (2007). Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsiamultidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 42(4), 351–357. <https://doi.org/10.1080/03601230701309577>
26. Bańbura J, Bańbura M, Gładalski M, Kaliński A, Markowski M y Michalski M. (2011). Body Condition Parameters of Nestling Great Tits *Parus major* in Relation to Experimental Food Supplementation. *Acta Ornithologica*, 46(2), 207–212. <https://doi.org/10.3161/000164511X625991>
27. Banbura J, Skwarska J, Banbura M, Gladalski M, Holysz M y Kalinski A (2013). Spatial and Temporal Variation in Heterophil-to-Lymphocyte Ratios of Nestling Passerine Birds: Comparison of Blue Tits and Great Tits. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074226>
28. Barbado JL. (2004). Cría de Codornices. Editorial Albatros. Buenos Aires, Argentina.
29. Barbeito CG, González NV y Mario R. (2014). *Histología de las aves*. Editorial

- de la Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <https://elibro.net/ereader/elibrodemo/66426>.
30. Barrera JF. (2007). Manejo holístico de plagas: más allá del MIP. En *Memorias del XXX Congreso Nacional de Control Biológico-Simposio de IOBC, Mérida, Yucatán*.
 31. Bates D, Kliegl R, Vasishth S y Baayen H. (2015). Parsimonious mixed models. <https://doi.org/arXiv:1506.04967>.
 32. Benvindo-Souza M, Santos Oliveira EA, Assis RA, Araújo Santos CG, Borges RE, de Melo e Silva D y de Souza Santos RL. (2020). Micronucleus test in tadpole erythrocytes: Trends in studies and new paths. *Chemosphere*, 240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124910>
 33. Bernardi N, Gentile N, Mañas F, Méndez A, Gorla N y Aiassa D. (2015) Assessment of the level of damage to the genetic material of children exposed to pesticides in the province of Córdoba. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 113. <https://doi.org/10.5546/aap.2015.eng.126>
 34. Bernardos J y Zaccagnini ME. (2011). El uso de insecticidas en cultivos agrícolas y su riesgo potencial para las aves en la región pampeana. *El hornero*, 26(1), 55–64.
 35. Bhaskar N, Shahani L y Bhatnagar P. (2014). Biochemical and histological alterations induced by a formulation of dicofol in the embryonic liver of *Gallus domesticus*. *Toxicological y Environmental Chemistry*, 96(9), 1394–1401. <https://doi.org/10.1080/02772248.2014.950267>
 36. Bhaskar N, Shahani L y Bhatnagar P. (2016). Toxicological implications of a commercial formulation of deltamethrin (Decis®) in developing chick embryo. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(2), 369–378. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1071647>
 37. Bickham JW y Smolen MJ. (1994). Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology. *Environmental Health Perspectives*, 102(12), 25–28. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102s1225>
 38. Bissoni E. (2000). Cría de la codorniz. Ed. Albatros. Buenos Aires, Argentina
 39. BLI: Bird Life International. (2018). State of the world's birds: taking the pulse of the planet. Ed. BLI Press. Cambridge, Reino Unido.

40. BLI: BirdLife International. (2008). State of the world's birds: Indicators for our changing world. Cambridge, Reino Unido. Disponible en: <http://www.birdlife.org/sowb>
41. Boatman ND, Brickle NW, Hart JD, Milsom TP, Morris AJ y Murray AW. (2004). Evidence for the indirect effects of pesticides on farmland birds. *Ibis*, 146, 131–143.
42. Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 543(3), 251–272. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2)
43. Bolognesi C, Carrasquilla G, Volpi S, Solomon KR y Marshall EJP. (2009). Biomonitoring of Genotoxic Risk in Agricultural Workers from Five Colombian Regions: Association to Occupational Exposure to Glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72(15–16), 986–997. <https://doi.org/10.1080/15287390902929741>
44. Bonassi S y Au WW. (2002). Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 511(1), 73–86.
45. Bosch B, Gorla N y Aiassa D. (2011). Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 3(6), 155–163.
46. Boshoven J, Tognelli M, Abraham EM, Bárcena JR, Claver S, Debandi G y Villalba R. (2001). El desierto del monte: la reserva de biosfera de Ñacuñán. Ed. Triunfar. Argentina.
47. Braun EJ. (1998). Comparative renal function in reptiles, birds, and mammals. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 7(2), 62–71. [https://doi.org/10.1016/S1055-937X\(98\)80044-3](https://doi.org/10.1016/S1055-937X(98)80044-3)
48. Brealey CJ, Walker CH y Baldwin BC. (1980). A-esterase activities in relation to the differential toxicity of pirimiphos-methyl to birds and mammals. *Pesticide Science*, 11(5), 546–554. <https://doi.org/10.1002/ps.2780110512>
49. Brodeur JC, Poletta GL, Simoniello MF, Carriquiriborde P, Cristos DS, Pautasso N, Paravani E, Poliserpi MB, D'Andrea MF, Gonzalez PV, Aca VL y Curto AE. (2021). The problem with implementing fish farms in agricultural regions: A trial

- in a pampean pond highlights potential risks to both human and fish health. *Chemosphere*, 262, 128408. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128408>
50. Bujdud León AN y Pereda Solís ME. (2019). Inhibición de la butirilcolinesterasa en el gorrión casero expuesto a malatión. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35(4), 831–837. <https://doi.org/10.20937/RICA.2019.35.04.05>
 51. Burger J y Gochfeld M. (1999). On developing bioindicators for human and ecological health. *Environmental Monitoring and Assessment*, 66, 23–46.
 52. Burger J y Gochfeld M. (2004). Marine birds as sentinels of environmental pollution. *EcoHealth*, 1(3), 263- 274. <https://doi.org/10.1007/s10393-004-0096-4>
 53. Butinof M, Fernández RA, Lerda D, Lantieri MJ, Filippi I y Díaz Mdelp. (2019). Biomonitorio en exposición a plaguicidas y su aporte en vigilancia epidemiológica en agroaplicadores en Córdoba, Argentina. *Gaceta Sanitaria*, 33(3), 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2017.12.002>
 54. Cairns MA, Maguire CC, Williams BA y Bennett JK. (1991). Brain cholinesterase activity of bobwhite acutely exposed to chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10(5), 657–664. <https://doi.org/10.1002/etc.5620100512>
 55. Çakıcı Ö. (2015). Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufotesvariabilis* (Anura: Bufonidae). *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(3), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2014.12.003>
 56. Campbell T. (2015). *Exotic Animal Hematology and Cytology*. 4th Edition. Ed. Wiley Blackwell. Nueva York, Estados Unidos.
 57. Cano Salinas L, Rodríguez Laguna R, Valdez Lazalde JR, Acevedo Sandoval OA y Beltrán Hernández RI. (2017). Detección del crecimiento urbano en el estado de Hidalgo mediante imágenes Landsat. *Investigaciones Geográficas*, (92). <https://doi.org/10.14350/rig.52339>
 58. Cardoso RS, Takahashi-Hyodo S, Peitl P, Ghilardi-Neto T y Sakamoto-Hojo ET. (2001). Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei, and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 21(6), 431–439. <https://doi.org/10.1002/tcm.1030>
 59. Carrasco KR, Tilbury KL y Myers MS. (1990). Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2123–2136.

<https://doi.org/10.1139/f90-237>

60. Carriquiriborde P, Díaz J y Ronco AE. (2005). Evaluación del impacto de pesticidas asociados al cultivo de soja RR sobre poblaciones de peces mediante estudios de campo. III Congreso Argentino de Limnología, Buenos Aires, Argentina.
61. Carson R. (2002). *Silent Spring*. Ed. Houghton Mifflin Harcourt. San Francisco, Estados Unidos.
62. CASAFE: Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (2017). Estadísticas toxicológicas. Recuperado de: <https://www.casafe.org/estadisticas-toxicologicas/>. Ultimo acceso: 06-11-2020
63. Cavalli M, Baladrón AV, Isacch JP, D'Amico V y Bó MS. (2018). Leukocyte profiles and body condition of free-living Burrowing Owls (*Athene cunicularia*) from rural and urban areas in the Argentinean Pampas. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 26(1), 45–51. <https://doi.org/10.1007/BF03544414>
64. Cengiz EI. (2006). Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22(2), 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.03.006>
65. Centro Provincial de Información y Asesoramiento Toxicológico de Mendoza. (2018). Departamento de Toxicología - Ministerio de Salud - Gobierno de Mendoza. Recuperado de: <http://webs.uolsinectis.com.ar/aldosergio/>. Ultimo Acceso 06-11-2020.
66. Ceyca Contreras JP. (2015). Huevos y embriones de aves marinas como biomonitores de contaminación por mercurio (Hg) y cadmio (Cd) en la costa de Sinaloa, México. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Mexico.
67. Ceyca JP, Torres-Bugarín O, Castillo-Guerrero JA y Betancourt-Lozano M. (2014). Seabird Embryos as Biomonitoring Agents of Micronucleogenic Genotoxic Agents: Potential Application for the Coasts of Mexico. *Avian Biology Research*, 7(4), 223–234. <https://doi.org/10.3184/175815514X14162211300859>
68. Chamberlain DE, Fuller RJ, Bunce RGH, Duckworth JC y Shrubbs M. (2000). Changes in the abundance of farmland birds in relation to the timing of agricultural intensification in England and Wales. *Journal of Applied Ecology*, 37(5), 771–788. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2000.00548.x>
69. Chaudhary S, Ansari MS, Abbas MN, Kausar S, Iqbal R, Saleem R. (2017). Toxic

Effects of Chlorpyrifos on 12th Day Desi Chick Embryo (*Gallus gallus domesticus*). *The Nucleus*, 54(2), 136–140.

70. Cheong HSJ, Seth I, Joiner MC y Tucker JD. (2013). Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 28(4), 433–440. <https://doi.org/10.1093/mutage/get020>
71. Chuvieco E. (2015). Teledetección ambiental. La observación de la tierra desde el espacio. Editorial Planeta S. Barcelona, España.
72. Cid FD, Fernández NC, Pérez-Chaca MV, Pardo R, Caviedes-Vidal E y Chediack JG. (2018). House sparrow biomarkers as lead pollution bioindicators. Evaluation of dose and exposition length on hematological and oxidative stress parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 154, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.040>
73. Cid F, Anton R y Caviedesvidal E. (2007). Organochlorine pesticide contamination in three bird species of the Embalse La Florida water reservoir in the semiarid midwest of Argentina. *Science of The Total Environment*, 385(1–3), 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.07.004>
74. Cīrule D, Krama T, Vrublevska J, Rantala MJ y Krams I. (2012). A rapid effect of handling on counts of white blood cells in a wintering passerine bird: a more practical measure of stress? *Journal of Ornithology*, 153(1), 161–166. <https://doi.org/10.1007/s10336-011-0719-9>
75. Clark NJ, Wells K, Dimitrov D y Clegg SM. (2016). Co-infections and environmental conditions drive the distributions of blood parasites in wild birds. *Journal of Animal Ecology*, 85(6), 1461–1470. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12578>
76. Clark P. (2015). Observed variation in the heterophil to lymphocyte ratio values of birds undergoing investigation of health status. *Comparative Clinical Pathology*, 24(5), 1151–1157. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-2052-1>
77. Clark P, Boardman W y Raidal S. (2009). Atlas of clinical avian hematology. John Wiley ySons.
78. Cobos VM, Mora MA y Escalon G. (2006). Inhibición de colinesterasa plasmática en el zorzal pardo (*Turdusgrayi*), expuesto a diazinón en cultivos de papaya maradol en Yucatán, México. *Reista de Toxicología*, 23,17- 21.

79. Cobos VM, Mora MA, Escalona G, Calme S y Jiménez J. (2010). Variation in plasma cholinesterase activity in the clay-colored robin (*Turdusgrayi*) in relation to time of day, season, and diazinon exposure. *Ecotoxicology*, 19(2), 267–272. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0409-z>
80. Cordi B, Fossi C y Depledge M. (1997). Temporal biomarker responses in wild passerine birds exposed to pesticide spray drift. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(10), 2118–2124. <https://doi.org/10.1002/etc.5620161019>
81. Costa PM y Costa MH. (2012). Development and application of a novel histological multichrome technique for clam histopathology. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(3), 411–414. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.04.013>
82. Cotín Martínez J. (2012). *Birds as bioindicators of pollution in aquatic and terrestrial environments*. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
83. Cotter PF. (2014). An examination of the utility of heterophil-lymphocyte ratios in assessing stress of caged hens. *Poultry Science*, 94(3), 512–517. <https://doi.org/10.3382/ps/peu009>
84. Cuenca P y Ramírez V. (2004). Environmental mutagenesis and use of biomarkers in cancer risk prediction. *Revista de Biología Tropical*, 52(3), 585–590.
85. Cuervo P, Quero M y Gorla N. (2011). Conocimiento citogenético de las aves de Argentina. *Ornitología Neotropical*, 22, 517–537.
86. Curry S y Weintraub RA. (1996). Nature of the residue in livestock: metabolism of carbosulfán in lactating goats (FMC study No. 151GOA94M1). FMC Corporation. Submitted to WHO by FMC Corporation.
87. D’Espósito R. (2005). Intoxicación de toros por clorpirifos. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría, 228 – 229. Santa Fe, Argentina.
88. Daszak P. Cunningham AA y Hyatt AD. (2001). Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*, 78(2), 103–116. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00179-0)
89. Davis AK. (2005). Effect of handling time and repeated sampling on avian white blood cell counts. *Journal of Field Ornithology*, 76(4), 334–338. <https://doi.org/10.1648/0273-8570-76.4.334>

90. Davis AK, Maney DL y Maerz JC. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22(5), 760–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>
91. De Mas E, Benzal J, Merino S, Valera F, Palacios MJ, Cuervo JJ y Barbosa A. (2015). Erythrocytic abnormalities in three Antarctic penguin species along the Antarctic Peninsula: biomonitoring of genomic damage. *Polar Biology*, 38(7), 1067–1074. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1667-2>
92. Devine GJ, Eza D, Ogusuku E y Furlong MJ. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental-Salud Publica*, 25(1), 74- 100.
93. Devyatkin AA, Revin VV, Yudanov MA, Kozlova OV y Samuilov VD. (2006). Effect of hydrogen peroxide on ejection of cell nucleus from pigeon erythrocytes and state of membrane lipids. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 141(2), 261–264. <https://doi.org/10.1007/s10517-006-0144-x>
94. Di Giacomo AS, Abril MS, Asociación Ornitológica del Plata, BirdLife International y Important Bird Area Programme. (2005). *Tareas importantes para la conservación de las aves en la Argentina: sitios prioritarios para la conservación de la biodiversidad*. Buenos Aires: Aves Argentinas/Asociación Ornitológica del Plata. Disponible en: <http://catalog.hathitrust.org/api/volumes/oclc/62212936.html>. Ultimo acceso: 22-03-2017
95. Dieterien-Lievre F. (1988). Birds. En Rowley AF, Rowley AF, Ratcliffe NA y Ratcliffe NA. *Vertebrate Blood Cells*. Ed. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido. pp. 257–336.
96. Donald PF, Green RE y Heath MF. (2001). Agricultural intensification and the collapse of Europe’s farmland bird populations. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1462), 25–29. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1325>
97. Dorough HW. (1968). Metabolism of Furadan (NIA-10242) in rats and houseflies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16(2), 319–325. <https://doi.org/10.1021/jf60156a035>
98. Dourado PLR, da Rocha MP da, Roveda LM, Raposo JL, Cândido LS y Cardoso CAL. (2016). Genotoxic and mutagenic effects of polluted surface water in the

- midwestern region of Brazil using animal and plant bioassays. *Genetics and Molecular Biology*, 40(1), 123–133. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2015-0223>
99. Driver CJ, Drown DB, Ligothke MW, Van Voris P, McVeety BD y Greenspan BJ. (1991). Routes of uptake and their relative contribution to the toxicologic response of Northern bobwhite (*Colinus virginianus*) to an organophosphate pesticide. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10(1), 21–33. <https://doi.org/10.1002/etc.5620100104>
 100. EFSA: European Food Safety Authority. (2009). Risk Assessment for Birds and Mammals: GD risk assessment for birds y mammals. *EFSA Journal*, 7. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1438>
 101. Egloff C, Crump D, Porter E, Williams KL, Letcher RJ, Gauthier LT y Kennedy SW. (2014). Tris(2-butoxyethyl)phosphate and triethyl phosphate alter embryonic development, hepatic mRNA expression, thyroid hormone levels, and circulating bile acid concentrations in chicken embryos. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 279(3), 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.06.024>
 102. Elliott JE, Wilson LK y Langelier KM. (1997). Secondary poisoning of birds of prey by the organophosphorus insecticide, phorate. *Ecotoxicology*, 6, 219- 231.
 103. Ellman GL, Courtney KD, Andres V y Featherstone RM. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
 104. EPA: Environmental Protection Agency. (2016). Interspecies Correlation Estimation. Disponible en: www3.epa.gov/ceampubl/fchain/webice/iceCalculate.html. Ultimo acceso 07-11-2018.
 105. Ewenson E, Zann R y Flannery G. (2001). Body condition and immune response in wild zebra finches: effects of capture, confinement and captive-rearing. *Naturwissenschaften*, 88(9), 391–394. <https://doi.org/10.1007/s001140100250>
 106. Fair JM, Paul E, Jones J, Clark AB, Davie C y Kaiser G. (2010). Guidelines to the use of wild birds in research. The Ornithological Council. Washington D.C., Estados Unidos.
 107. Fair J, Whitaker S y Pearson B. (2007). Sources of variation in haematocrit in birds: Haematocrit variation in birds. *Ibis*, 149(3), 535–552.

<https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2007.00680.x>

108. Fang X y El Naggar S. (1995). Carbosulfan rat metabolism study. Unpublished report No. 151RAT93M1. FMC Corporation.
109. FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1988). Manual sobre Elaboración y Empleo de las Especificaciones de la FAO para Productos Destinados a la Protección de las Plantas. Tercera versión revisada. Roma, Italia.
110. FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2017). Convenio de Rotterdam- Documento de orientación para la adopción de decisiones: Carbofurano. Rotterdam, Holanda.
111. FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2002). Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Disponible en: <http://www.fao.org/3/y3557s/y3557s00.htm#TopOfPage>. Último acceso: 03-06-2016
112. FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2000). Carbosulfan. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation97/Carbosul.PDF. Último acceso: 03-06-2016
113. FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2003). Pesticide Residues in Food. FAO plant production and protection paper 176. Disponible en: <https://www.fao.org/3/y5221e/y5221e00.htm#Contents>. Último acceso: 03-06-2016
114. Farhat A, Crump D, Bidinosti L, Boulanger E, Basu N, Hecker M y Head JA. (2020). An Early–Life Stage Alternative Testing Strategy for Assessing the Impacts of Environmental Chemicals in Birds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(1), 141–154. <https://doi.org/10.1002/etc.4582>
115. Fenech M. (2002). Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology*, 181–182, 411–416. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00480-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00480-8)
116. Fenech M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1–2), 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.05.028>
117. Fenech M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature*

- Protocols*, 2(5), 1084–1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
118. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125–132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>
119. Fenech M, Knasmueller S, Bolognesi C, Bonassi S, Holland N y Migliore L. (2016). Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 770, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.04.008>
120. Ferguson PW, Dey S, Jewfl A y Krieger A. (1984). Carbofuran Metabolism and Toxicity in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology*, 4, 14–21.
121. Fernandes TCC, Mazzeo DEC y Marin-Morales MA. (2007). Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.12.003>
122. Nish
123. Ferré DM, Quero AÁM, Hynes V, Saldeña REL, Lentini VR, Tornello MJ y Gorla NBM (2018b). Ensayo de micronúcleos de citoma bucal en trabajadores de fincas frutícolas que han aplicado plaguicidas alrededor de quince años. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(1), 23–33. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.01.02>
124. Ferré DM, Saldeña EL, Albarracín L, Neuilly V y Gorla NB. (2015). Inhibición de butirilcolinesterasa en dos perros intoxicados y confirmación analítica de carbofuran como agente causal. *Revista Veterinaria*, 26(1), 43. <https://doi.org/10.30972/vet.261248>
125. Ferré DM y Gorla NBM. (2019). Antiparasitarios en Producción Bovina y el riesgo de residuos en alimentos. Editorial UMaza, Mendoza.
126. Fildes K, Astheimer LB, Story P, Buttemer WA y Hooper MJ. (2006). Cholinesterase response in native birds exposed to fenitrothion during locust control operations in eastern Australia. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(11), 2964–2970. <https://doi.org/10.1897/05-585R.1>
127. Fleischli MA, Franson JC, Thomas NJ, Finley DL y Riley W. (2004). Avian

- Mortality Events in the United States Caused by Anticholinesterase Pesticides: A Retrospective Summary of National Wildlife Health Center Records from 1980 to 2000. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46(4), 542–550. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-3065-y>
128. Fokidis H, Greiner EC y Deviche P. (2008). Interspecific variation in avian blood parasites and haematology associated with urbanization in a desert habitat. *Journal of Avian Biology*, 39(3), 300–310. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2008.04248.x>
129. Fossi MC. (1994). Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, 102(12), 49–54. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102s1249>
130. Fowler BA. (2012). Biomarkers in Toxicology and Risk Assessment. In A. Luch (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Basel: Springer Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_16
131. Francis EA. (2017). Paramount Roles of Wild Birds as Bioindicators of Contamination. *International International Journal of Avian y Wildlife Biology*, 2(6), 194- 200. <https://doi.org/10.15406/ijawb.2017.02.00041>
132. Frixione MG y Rodríguez-Estrella R. (2020). Genotoxicity in American kestrels in an agricultural landscape in the Baja California peninsula, Mexico. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(36), 45755–45766. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10392-0>
133. Fry DM. (1995). Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 103(7), 165- 171.
134. Galíndez R, Basilio VD, Martínez G y Vargas D. (2009). Evaluación de la fertilidad y eclosión en la codorniz japonesa, *Zootecnia tropical*, 27(1), 007-018.
135. Garcês A, Pires I y Rodrigues P. (2020). Teratological effects of pesticides in vertebrates: a review. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 55(1), 75–89. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1660562>
136. García-Fernández AJ. (2014). Avian ecotoxicology. En *Encyclopedia of Toxicology*, 289–294. Elsevier <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00496-6>
137. García-Hernández J, Sapozhnikova YV, Schlenk D, Mason AZ, Hinojosa-Huerta O, Rivera-Díaz JJ. (2006). Concentration of contaminants in breeding bird eggs from the Colorado river Delta, Mexico. *Environmental Toxicology and Chemistry*:

An International Journal, 25(6), 1640-1647.

138. Garte S y Bonassi S. (2005). Linking toxicology to epidemiology: Biomarkers and new technologies—Special issue overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 592(2), 3–5. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.05.007>
139. Gayathri KL y Hegde SN. (2006). Alteration in haematocrit values and plasma protein fractions during the breeding cycle of female pigeons, *Columba livia*. *Animal Reproduction Science*, 91(1–2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.03.006>
140. Geiser F, Holloway JC, Körtner G, Maddocks TA, Turbill C y Brigham RM. (2000). Do Patterns of Torpor Differ between Free-ranging and Captive Mammals and Birds. In Heldmaier G y Klingenspor M (Eds.). Ed. Springer Berlin Heidelberg (pp. 95–102). Berlin, Alemania. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04162-8_10
141. Getzin LW. (1973). Persistence and Degradation of Carbofuran in Soil. *Environmental Entomology*, 2(3), 461–468. <https://doi.org/10.1093/ee/2.3.461>
142. Ghaffar A. (2021). Pesticide induced hematological, biochemical and genotoxic changes in fish: a review. *Agrobiological Records*, 3, 41–57. <https://doi.org/10.47278/journal.abr/2021.005>
143. Ghisi NdeC, de Oliveira EC, Fávaro LF, Silva de Assis HC y Prioli AJ. (2014). *In Situ* Assessment of a Neotropical Fish to Evaluate Pollution in a River Receiving Agricultural and Urban Wastewater. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93(6), 699–709. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1403-6>
144. Gibbons D, Morrissey C y Mineau P. (2015). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 103–118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>
145. Giesy JP y Solomon KR. (2014). *Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in Terrestrial and Aquatic Systems in the United States* (Vol. 231). Ed. Springer International Publishing. Berlin, Alemania. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0>
146. Goldstein MI, Lacher TE, Woodbridge B, Bechard MJ, Canavelli SB y Zaccagnini ME. (1999). Monocrotophos-Induced Mass Mortality of Swainson's

- Hawks in Argentina, 1995. *Ecotoxicology*, 8(3),201 – 214.
147. Gómez-Meda BC, Zamora-Perez AL, Luna-Aguirre J, González-Rodríguez A, Luisa Ramos-Ibarra M y Torres-Bugarín O. (2006). Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (*Aratingacanicularis*) related to genotoxic damage. *Avian Pathology*, 35(3), 206–210. <https://doi.org/10.1080/03079450600711003>
148. Gonçalves VF, Ribeiro PVA, de Souza Oliveira CF, Pires LP, Baesse CQ, Paniago LPM. (2020). Effects of urban proximity and the occurrence of erythroplastids in Antilophiagaleata. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(35), 44650–44655. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10057-y>
149. González-Escalante L, Mercado-Hernández R, González-Rojas JI y Bermúdez de León M. (2013). Plasma Cholinesterase Activity in the House Finch, *Carpodacus mexicanus*, and the House Sparrow, *Passer domesticus*, Collected from Pesticide-Exposed Agricultural Land. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(1), 9–11. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0864-8>
150. Gorla N. (2016). Los animales domésticos y silvestres como centinelas de salud ambiental. *Investigación, Ciencia y Universidad*. Ed UMaza. Mendoza, Argentina.
151. Gregory RD, van Strien A, Vorisek P, Gmelig Meyling AW, Noble DG, Foppen RPB y Gibbons DW. (2005). Developing indicators for European birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1454), 269–288. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1602>
152. Greywe D, Kreutz J, Banduhn N, Krauledat M, Scheel J y Schroeder KR. (2012). Applicability and robustness of the hen's egg test for analysis of micronucleus induction (HET-MN): Results from an inter-laboratory trial. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 747(1), 118–134. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.04.012>
153. Gupta RC. (2007). Organophosphates and carbamates. En RC Gupta (ed) *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. Academic Press. New York, Pp. 477-488
154. Gupta M, Bagchi G, Bandyopadhyay S, Sasmal D, Chatterjee T y Dey SN. (1982). Hematological changes produced in mice by Nuvacron or Furadan. *Toxicology*, 25(2–3), 255–260. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(82\)90034-8](https://doi.org/10.1016/0300-483X(82)90034-8)
155. Gupta RC. (1994). Carbofuran toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental*

- Health*, 43(4), 383–418. <https://doi.org/10.1080/15287399409531931>
156. Hamburger V y Hamilton HL. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental dynamics*, 195, 231–272.
157. Hamid A, Yaqub G, Ahmed SR y Aziz N. (2017). Assessment of human health risk associated with the presence of pesticides in chicken eggs. *Food Science and Technology*, 37(3), 378–382. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.11616>
158. Hamza-Chaffai A. (2014). Usefulness of bioindicators and biomarkers in pollution biomonitoring. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 3, 19–26.
159. Hatch MI y Smith RJ. (2010). Repeatability of hematocrits and body mass of Gray Catbirds. *Journal of Field Ornithology*, 81(1), 64–70. <https://doi.org/10.1111/j.1557-9263.2009.00261.x>
160. Hellou J, Lebeuf M y Rudi M. (2013). Review on DDT and metabolites in birds and mammals of aquatic ecosystems. *Environmental Reviews*, 21(1), 53–69. <https://doi.org/10.1139/er-2012-0054>
161. Henriksen R, Rettenbacher S y Groothuis TGG. (2011). Prenatal stress in birds: Pathways, effects, function and perspectives. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews*, 35(7), 1484–1501. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.04.010>
162. Hernández AF, Parrón T, Tsatsakis AM, Requena M, Alarcón R y López-Guarnido O. (2013). Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology*, 307, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.06.009>
163. Hill EF y Fleming WJ. (1982). Anticholinesterase poisoning of birds: Field monitoring and diagnosis of acute poisoning. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1(1), 27–38. <https://doi.org/10.1002/etc.5620010105>
164. Hill EF y Mendenhall VM. (1980). Secondary poisoning of barn owls with famphur, an organophosphate insecticide. *The Journal of Wildlife Management*, 44(3), 676–681.
165. Hiraga T, Ohyama K, Hashigaya A, Ishikawa T, Muramoto W y Kitagawa H (2008). Lead exposure induces pycnosis and enucleation of peripheral erythrocytes in the domestic fowl. *The Veterinary Journal*, 178(1), 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.06.023>
166. Hoffman DJ. (1990). Embryotoxicity and Teratogenicity of Environmental

- Contaminants to Bird Eggs. En Ware GW (Eds.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Ed. Springer. New York, Estados Unidos. pp. 39–89. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3416-6_2
167. Hoffman DJ. (2003). *Handbook of ecotoxicology* (2nd ed.). Ed. Boca Raton: Lewis Publishers. Nueva York, Estados Unidos.
168. Hoffman DJ, Smith GJ y Rattner BA. (1993). Biomarkers of contaminant exposure in common terns and black-crowned night herons in the Great Lakes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(6), 1095–1103. <https://doi.org/10.1002/etc.5620120615>
169. Hoffman DJ y Albers PH. (1984). Evaluation of potential embryotoxicity and teratogenicity of 42 herbicides, insecticides, and petroleum contaminants to mallard eggs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 13(1), 15–27. <https://doi.org/10.1007/BF01055642>
170. Holm L, Blomqvist A, Brandt I, Brunström B, Ridderstråle Y y Berg C. (2006). Embryonic exposure to O,P'-DDT causes eggshell thinning and altered shell gland carbonic anhydrase expression in the domestic hen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(10), 2787. <https://doi.org/10.1897/05-619R.1>
171. Holmes SB y Boag PT. (1990). Inhibition of brain and plasma cholinesterase activity in zebra finches orally dosed with fenitrothion. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(3), 323–334. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090308>
172. Horowitz IH, Yanco EG, Landau S, Nadler-Valency R, Anglister N, Bueller-y Rosenzweig Aal. (2016). Whole Blood Cholinesterase Activity in 20 Species of Wild Birds. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 30(2), 122–126. <https://doi.org/10.1647/2014-044>
173. Hunter SR y Powers LR. (1980). Raptor Hematocrit Values. *The Condor*, 82(2), 226. <https://doi.org/10.2307/1367482>
174. Huss D, Poynter G y Lansford R. (2008). Japanese quail (*Coturnix japonica*) as a laboratory animal model. *Lab Animal*, 37(11), 513–519. <https://doi.org/10.1038/labani1108-513>
175. Hussain R, Khan A, Mahmood F, Rehan S y Ali F. (2014). Clinico-hematological and tissue changes induced by butachlor in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 109, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.01.005>

176. Hwa Yun B, Guo J, Bellamri M y Turesky RJ. (2020). DNA adducts: Formation, biological effects, and new biospecimens for mass spectrometric measurements in humans. *Mass Spectrometry Reviews*, 39(1–2), 55–82. <https://doi.org/10.1002/mas.21570>
177. Iknayan KJ y Beissinger SR. (2018). Collapse of a desert bird community over the past century driven by climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(34), 8597–8602. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805123115>
178. Iko WM, Archuleta AS y Knopf FL. (2003). Plasma cholinesterase levels of mountain plovers (*Charadrius montanus*) wintering in central California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(1), 119–125. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220115>
179. Ilyinskikh NN, Eremich AV, Ivanchuk II y Ilyinskikh EN. (1997). Micronucleus test of erythrocytes and lymphocytes in the blood of the Altai region residents living near the Semipalatinsk atomic proving ground. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 392(3), 223–228. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(97\)00066-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00066-1)
180. INCHEM: Internationally Peer Reviewed Chemical Safety Information. Wolterink G y van Hoeven Arentzen PH. (2003). Carbosulfan. Centre For Substances and Integrated Risk Assessment, National Institute of Public Health and the Environment. Holanda. Disponible en: <https://inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v2003pr02.htm>. Último acceso 04-03-2020
181. INCHEM: Internationally Peer Reviewed Chemical Safety Information. (2014). Chlorpyrifos. Disponible en: <https://inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0851.htm>. Último acceso 04-03-2020
182. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (2010). Recuperado de: <https://www.indec.gob.ar>. Último acceso 10-11-2020
183. Isacksson C. (2018). En Tietza DC (eds). Bird species. How they arise, modify and vanish. Chapter 13: Impact of urbanization on birds. Springer Open. Nueva York, Estados Unidos.
184. Isensee AR, Nash RG y Helling CS. (1990). Effect of Conventional vs. No-Tillage on Pesticide Leaching to Shallow Groundwater. *Journal of Environmental Quality*, 19(3), 434–440.

<https://doi.org/10.2134/jeq1990.00472425001900030014x>

185. Ismail A. (2012). Embryotoxicity and teratogenic potential of cypermethrin and diazinon insecticides on japanese quail chick-embryos (*Coturnix japonica*). *Journal of Plant Protection and Pathology*, 3(12), 1269–1286. <https://doi.org/10.21608/jppp.2012.84414>
186. Jerez S, Motas M, Benzal J, Diaz J y Barbosa A. (2013). Monitoring trace elements in Antarctic penguin chicks from South Shetland Islands, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, 69(1–2), 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.01.004>
187. John EM y Shaik JM. (2015). Chlorpyrifos: pollution and remediation. *Environmental Chemistry Letters*, 13(3), 269–291. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0513-7>
188. Johnston MS, Son TT y Rosenthal KL. (2007). Immune-mediated hemolytic anemia in an eclectus parrot. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(7), 1028–1031. <https://doi.org/10.2460/javma.230.7.1028>
189. Jones MP. (2015). Avian Hematology. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(3), 649–659. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.05.013>
190. Kalisińska E. (2019). Endothermic Animals as Biomonitors of Terrestrial Environments. En Kalisińska E (Ed.), *Mammals and Birds as Bioindicators of Trace Element Contaminations in Terrestrial Environments* (pp. 21–53). Cham: Springer International Publishing. Nueva York, Estados Unidos. https://doi.org/10.1007/978-3-030-00121-6_2
191. Kammon AM, Brar RS, Banga HS y Sodhi S. (2010). Patho-biochemical studies on hepatotoxicity and nephrotoxicity on exposure to chlorpyrifos and imidacloprid in layer chickens. *Veterinary archives* 10, 663- 672.
192. Kaneko JJ, Harvey JW y Bruss ML. (2008). Clinical biochemistry of domestic animals. Academic press.
193. Kapka-Skrzypczak L, Cyranka M, Skrzypczak M y Kruszewski M. (2011). Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure – state of the art. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 18(2), 293- 303.
194. Karlin UO, Karlin MS, Zapata RM, Coirini RO y Contreras AM. (2017). La Provincia Fitogeográfica del Monte: límites territoriales y su representación. *Multequina*, 26,63- 75.

195. Kertész V. (2001). Effect of heavy metals and PAH derivatives on embryonic development of birds. Doctoral dissertation, Doctoral Thesis (PhD), Szent István University, Gödöllő SzentIstván University. Hungria.
196. Khan SA, Shah SSA, Gulfam N, Khisroon M y Zahoor M. (2020). Toxicity evaluation of pesticide chlorpyrifos in male Japanese quails (*Coturnix japonica*). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(20), 25353–25362. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08953-4>
197. Kirschbaum AA, Seriani R, Pereira CDS, Assunção A, de Abessa DMS, Rotundo MM y Ranzani-Paiva MJT. (2009). Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 32(1), 151–154. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000007>
198. Klaassen CD y Watkins JB. (2005). Fundamentos de toxicología. 1er Edición. Ed. Interamericana. Madrid, España. ISBN: 84-486-0534-9.
199. Kleinjans JCS y van Schooten FJ. (2002). Ecogenotoxicology: the evolving field. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11(3–4), 173–179. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(01\)00115-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(01)00115-6)
200. Kostelecka-Myrcha A y Chołostiakow-Gromek J. (2001). Body Mass Dependence of the Haemoglobin Content to Surface Area Ratio of Avian Erythrocytes. *Acta Ornithologica*, 36 (2), 123–128. <https://doi.org/10.3161/068.036.0204>
201. Krams I, Vrublevska J, Cirule D, Kivleniece I, Krama T, Rantala MJ. (2012). Heterophil/lymphocyte ratios predict the magnitude of humoral immune response to a novel antigen in great tits (*Parus major*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular y Integrative Physiology*, 161(4), 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.12.018>
202. Krause JS, Németh Z, Pérez JH, Chmura HE, Ramenofsky M y Wingfield JC. (2016). Annual Hematocrit Profiles in Two Subspecies of White-Crowned Sparrow: A Migrant and a Resident Comparison. *Physiological and Biochemical Zoology*, 89(1), 51–60. <https://doi.org/10.1086/684612>
203. Kursá M y Bezrukov V. (2008). Health Status in an Antarctic Top Predator: Micronuclei Frequency and White Blood Cell Differentials in the South Polar Skua (*Catharacta maccormicki*). *Polarforschung*, 77(1), 1–5.
204. Latorre M, López González E, Siroski P y Poletta G. (2015). Basal frequency of

- micronuclei and hematological parameters in the Side-necked Turtle, *Phrynopshilarii*. *Acta Herpetologica*, 31-37 Pages. https://doi.org/10.13128/ACTA_HERPETOL-14988
205. Legler M y Kummerfeld N. (2017). Butyrylcholinesterase blood plasma concentrations of Common Swifts (*Apusapus*). *Comparative Clinical Pathology*, 26(4), 767–771. <https://doi.org/10.1007/s00580-017-2444-0>
 206. Lehel J, Szemerédy G, Szabó R, Major L, Grúz A y Budai P. (2021). Model study on chicken embryos to investigate potential teratogenic risk of wild birds due to pesticide and environmental contaminant (preprint). Research Square: In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-517851/v1>
 207. Leighton FA. (1993). The toxicity of petroleum oils to birds. *Environmental Reviews*, 1(2), 92–103. <https://doi.org/10.1139/a93-008>
 208. Li D, Huang Q, Lu M, Zhang L, Yang Z, Zong M y Tao L. (2015). The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis. *Chemosphere*, 135, 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.024>
 209. López González EC, Larriera A, Siroski PA y Poletta GL. (2017). Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 136, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.035>
 210. López González EC, Siroski PA y Poletta GL. (2019). Genotoxicity induced by widely used pesticide binary mixtures on *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman). *Chemosphere*, 232, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.218>
 211. Maceda-Veiga A, Figuerola J, Martínez-Silvestre A, Viscor G, Ferrari N y Pacheco M. (2015). Inside the Redbox: Applications of haematology in wildlife monitoring and ecosystem health assessment. *Science of the Total Environment*, 514, 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.004>
 212. Mahmood I, Imadi SR, Shazadi K, Gul A y Hakeem KR. (2016). Effects of Pesticides on Environment. In Hakeem KR, Akhtar MS y Abdullah SNA (Eds.), *Plant, Soil and Microbes* (pp. 253–269). Cham: Springer International Publishing. Nueva York, Estados Unidos https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13

213. Mañosa S, Mateo R y Guitart, R. (2000). A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the ebro delta biota and wildlife. *Environmental Monitoring and Assessment* . Kluwer Academic Publishers. Holanda. 187–205.
214. March GJ. (2014). *Agricultura y plaguicidas : un análisis global* .FADA - Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina. Rio Cuarto, Argentina
215. Marin M. (2011). Sobre la biología reproductiva de la diuca (*diuca diuca*) en Chile central. *Ornitología Neotropical*, 22, 369 – 378.
216. Marshall K y Heatley JJ. (2020). Passerine Birds. In Heatley JJ y Russell KE (Eds.), *Exotic Animal Laboratory Diagnosis*. Ed. Wiley. Berlin, Alemania. pp. 565–583. <https://doi.org/10.1002/9781119108610.ch28>
217. Martin PA. (1990). Effects of carbofuran, chlorpyrifos and deltamethrin on hatchability, deformity, chick size and incubation time of Japanese quail (*Coturnix japonica*) eggs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(4), 529–534. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090417>
218. Martínez- Haro M, Viñuela J y Mateo R. (2007). Exposure of birds to cholinesterase-inhibiting pesticides following a forest application for tick control. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(3), 347–349. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.11.011>
219. Martínez Quintanilla MC, Torres Bugarín O, Martínez Guerrero JH, Delgado León TG, Salas Pacheco JM y Pereda Solís ME. (2017). Relación heterófilo/linfocito, frecuencia espontánea de eritrocitos micronucleados y prolongaciones nucleares en el ganso nevado (*Chen caerulescens*): Una propuesta como posible biomonitor de estrés y genotóxicos ambientales. *Huitzil, Revista Mexicana de Ornitología*, 18(1). <https://doi.org/10.28947/hrmo.2017.18.1.268>
220. Matson KD. (2006). Are there differences in immune function between continental and insular birds? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273, 2267–2274. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3590>
221. Matsumoto ST, Mantovani MS., Malagutti MIA, Dias AL, Fonseca IC y Marin-Morales MA. (2006). Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, 29(1), 148–158. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000100028>

222. Maul JD y Farris JL. (2004). The Effect of Sex on Avian Plasma Cholinesterase Enzyme Activity: A Potential Source of Variation in an Avian Biomarker Endpoint. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(2). <https://doi.org/10.1007/s00244-004-3142-x>
223. Maxwell MH. (1993). Avian blood leucocyte responses to stress. *World's Poultry Science Journal*, 49(1), 34–43. <https://doi.org/10.1079/WPS19930004>
224. Mazerolle DF y Hobson KA. (2002). Physiological ramifications of habitat selection in territorial male ovenbirds: consequences of landscape fragmentation. *Oecologia*, 130(3), 356–363. <https://doi.org/10.1007/s00442-001-0818-z>
225. Melo KM, Alves IR, Pieczarka JC, David JAdeO, Nagamachi CY y Grisolia CK. (2013). Profile of micronucleus frequencies and nuclear abnormalities in different species of electric fishes (Gymnotiformes) from the Eastern Amazon. *Genetics and Molecular Biology*, 36(3), 425–429. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013005000032>
226. Meneely GA y Wyttenbach CR. (1989). Effects of the organophosphate insecticides diazinon and parathion on bobwhite quail embryos: Skeletal defects and acetylcholinesterase activity. *Journal of Experimental Zoology*, 252(1), 60–70. <https://doi.org/10.1002/jez.1402520109>
227. Messina S, Edwards DP, Eens M y Costantini D. (2018). Physiological and immunological responses of birds and mammals to forest degradation: A meta-analysis. *Biological Conservation*, 224, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.06.002>
228. Miller DA. (2014). Pesticides. Ed. Greenhaven Publishing LLC. Nueva York, Estados Unidos.
229. Mineau P. (1993). *The hazard of carbofuran to birds and other vertebrate wildlife*. Ed. Canadian Wildlife Service. Ottawa, Canadá.
230. Mineau P. (2005). A Review and Analysis of Study Endpoints Relevant to the Assessment of “Long Term” Pesticide Toxicity in Avian and Mammalian Wildlife. *Ecotoxicology*, 14(8), 775–799. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0028-2>
231. Mineau P, Porter S y Meteyer C. U. (2011). Carbofuran: Toxicity, Diagnosing Poisoning and Rehabilitation of Poisoned Birds. En Richards N (Ed.), *Carbofuran and Wildlife Poisoning*. Chichester, Reino Unido. pp. 19–38.

<https://doi.org/10.1002/9781119998532.ch2>

232. Minias P, Włodarczyk R y Meissner W. (2018). Leukocyte profiles are associated with longevity and survival, but not migratory effort: A comparative analysis of shorebirds. *Functional Ecology*, 32(2), 369–378. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12991>
233. Mitidiero Stachissini Arcain B, Gross MC, Frasson Furtado D y Grade CVC. (2021). Embryotoxic effects of Rovral® for early chicken (*Gallus gallus*) development. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 84(15), 632–648. <https://doi.org/10.1080/15287394.2021.1924331>
234. Mitra A, Chatterjee C y Mandal FB. (2011). Synthetic Chemical Pesticides and Their Effects on Birds. *Research Journal of Environmental Toxicology*, 5(2), 81–96. <https://doi.org/10.3923/rjet.2011.81.96>
235. Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O y Roig B. (2011). Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(6), 2265–2303. <https://doi.org/10.3390/ijerph8062265>
236. Mo L, Zheng X, Sun Y, Yu L, Luo X y Xu X. (2018). Selection of passerine birds as bio-sentinel of persistent organic pollutants in terrestrial environment. *Science of The Total Environment*, 633, 1237–1244. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.311>
237. Moraes TGV, Romao JM, Teixeira RSC y Cardoso WM. (2008). Effects of egg position in artificial incubation of Japanese quail eggs (*Coturnix japonica*). *Animal Reproductión*, 5(1), 50- 54.
238. Müller C, Jenni-Eiermann S y Jenni L. (2011). Heterophils/Lymphocytes-ratio and circulating corticosterone do not indicate the same stress imposed on Eurasian kestrel nestlings: H/L-ratio and corticosterone in kestrel nestlings. *Functional Ecology*, 25(3), 566–576. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01816.x>
239. Narosky T, Yzurieta D y Matarasso H. (2010). Aves de Argentina y Uruguay. Guía de identificación/ Birds of Argentina and Uruguay. A fieldguide. Ed. Vazquez Mazzini, Buenos Aires, Argentina.
240. Narváez C, Ríos JM, Píriz G, Sanchez-Hernandez JC y Sabat P. (2016). Subchronic exposure to chlorpyrifos affects energy expenditure and detoxification capacity in juvenile Japanese quails. *Chemosphere*, 144, 775–784.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.060>

241. Negri RL. (2018). Res. SENASA 670/18 Ref. Carbofuran, carbosulfan, diazinon, aldicarb y dicofol y sus productos formulados - Prohibición de importación. Cámara Argentina de Comercio y Servicios. Buenos Aires, Argentina.
242. Newman MC. (2019). *Fundamentals of ecotoxicology: The Science of Pollution*. Ed. CRC Press. Nueva York, Estados Unidos.
243. Newman SH, Piatt JF y White J. (1997). Hematological and Plasma Biochemical Reference Ranges of Alaskan Seabirds: Their Ecological Significance and Clinical Importance. *Colonial Waterbirds*, 20(3), 492- 504. <https://doi.org/10.2307/1521600>
244. Nishi K y Hundal SS. (2015). Chlorpyrifos Induced Histological and Biochemical changes in the Liver and Kidney Tissues of female Wistar rats. *International Journal of Advanced Research*, 3(5), 8.
245. Norte AC, Ramos JA, Sousa JP y Sheldon BC. (2009). Variation of adult Great Tit *Parus major* body condition and blood parameters in relation to sex, age, year and season. *Journal of Ornithology*, 150(3), 651- 660. <https://doi.org/10.1007/s10336-009-0387-1>
246. Nunes B. (2011). The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology. En Whitacre DM (Ed), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Ed. Springer. New York, Estados Unidos. pp. 29–59. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8453-1_2
247. Odetti LM, López González EC, Romito ML, Simoniello MF y Poletta GL. (2020). Genotoxicity and oxidative stress in *Caiman latirostris* hatchlings exposed to pesticide formulations and their mixtures during incubation period. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 193, 110312. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110312>
248. Ohlendorf HM, Hoffman DJ, Saiki MK y Aldrich TW. (1986). Embryonic mortality and abnormalities of aquatic birds: Apparent impacts of selenium from irrigation drainwater. *Science of The Total Environment*, 52(1–2), 49–63. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(86\)90104-X](https://doi.org/10.1016/0048-9697(86)90104-X)
249. Oropesa AL, Gravato C, Sánchez S y Soler F. (2013). Characterization of plasma cholinesterase from the White stork (*Ciconia ciconia*) and its in vitro inhibition by anticholinesterase pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 97, 131–

138. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.022>
250. Oropesa AL, Sánchez S y Soler F. (2017). Characterization of plasma cholinesterase activity in the Eurasian Griffon Vulture *Gyps fulvus* and its *in vitro* inhibition by carbamate pesticides. *Ibis*, 159(3), 510–518. <https://doi.org/10.1111/ibi.12476>
251. Ortiz-Santaliestra ME, Alcaide V, Camarero PR, Mateo R y Mougeot F. (2020). Egg Overspray with Herbicides and Fungicides Reduces Survival of Red-Legged Partridge Chicks. *Environmental Science y Technology*, 54(19), 12402–12411. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04203>
252. Otieno PO, Lalah JO, Virani M, Jondiko IO y Schramm KW. (2010). Carbofuran and its Toxic Metabolites Provide Forensic Evidence for Furadan Exposure in Vultures (*Gyps africanus*) in Kenya. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84(5), 536–544. <https://doi.org/10.1007/s00128-010-9956-5>
253. Ots I, MurumÄgi A y HÕrak P. (1998). Haematological health state indices of reproducing Great Tits: methodology and sources of natural variation: Great Tit health state indices. *Functional Ecology*, 12(4), 700–707. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1998.00219.x>
254. Owen JC, Cornelius EA, Arsnoe DA y Garvin MC. (2013). Leukocyte Response to Eastern Equine Encephalomyelitis Virus in a Wild Passerine Bird. *Avian Diseases*, 57(4), 744–749. <https://doi.org/10.1637/10574-051513-Reg.1>
255. Owen JC y Moore FR. (2006). Seasonal differences in immunological condition of three species of thrushes. *The Condor*, 108(2), 389. [https://doi.org/10.1650/0010-5422\(2006\)108\[389:SDIICO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1650/0010-5422(2006)108[389:SDIICO]2.0.CO;2)
256. Paithane KT. (2012). Histopathological changes due to induced dimethoate in the liver of freshwater fish *Channa punctatus* from river Shivana, Aurangabad (m.s) India. *The Ecoscan: An international quarterly journal of environmental sciences*, 1, 213–217.
257. Pandian C, Thangapandiyan M, Omprakash AV, Thyagarajan D y Babu M. (2012). Effect of season on haematological profile and erythrocyte indices in White Leghorn layers. *Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 8(6), 389-392.
258. Parga ML, Pendl H y Forbes NA. (2001). The Effect of Transport on Hematologic Parameters in Trained and Untrained Harris's Hawks (*Parabuteounicinctus*) and

- Peregrine Falcons (*Falco peregrinus*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 15(3), 162–169. [https://doi.org/10.1647/1082-6742\(2001\)015\[0162:TEOTOH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1647/1082-6742(2001)015[0162:TEOTOH]2.0.CO;2)
259. Parker ML y Goldstein MI. (2000). Differential Toxicities of Organophosphate and Carbamate Insecticides in the Nestling European Starling (*Sturnus vulgaris*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(2), 233–242. <https://doi.org/10.1007/s002440010100>
260. Parmar TK, Rawtani D y Agrawal YK. (2016). Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science*, 9(2), 110–118. <https://doi.org/10.1080/21553769.2016.1162753>
261. Paustenbach D y Galbraith D. (2006). Biomonitoring and Biomarkers: Exposure Assessment Will Never Be the Same. *Environmental Health Perspectives*, 114(8), 1143–1149. <https://doi.org/10.1289/ehp.8755>
262. Pavlak M, Vlahović K, Jerčić J, Dovč A y Župančić Ž. (2005). Age, sexual and seasonal differences of haematological values and antibody status to *Chlamydophila sp.* in feral and racing pigeons (*Columba livia* forma domestica) from an urban environment (Zagreb, Croatia). *European Journal of Wildlife Research*, 51(4), 271–276. <https://doi.org/10.1007/s10344-005-0110-3>
263. Peebua P, Kruatrachue M, Pokethitiyook P y Kosiyachinda P. (2006). Histological Effects of Contaminated Sediments in MaeKlong River Tributaries, Thailand, on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Science Asia*, 32(2), 143. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2006.32.143>
264. Pérez-Iglesias JM, Ruiz de Arcaute C, Nikoloff N, Dury L, Soloneski S, Natale GS y Larramendy ML. (2014). The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation GlacoxanImida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.002>
265. Peterson ME y Talcott PA. (2013). Small animal toxicology. Elsevier Health Sciences. Washington, Estados Unidos.
266. Pinto FE, Neto EP, de Andrade TU, Endringer DC y Lenz D. (2016). Novel data for free-living saffron finch (*Sicalis flaveola*): reference hematological value and body mass. *Comparative Clinical Pathology*, 25(2), 465–468. <https://doi.org/10.1007/s00580-015-2212-y>

267. Poletta GL, Kleinsorge E, Paonessa A, Mudry MD, Larriera A y Siroski PA. (2011). Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed *in ovo* to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4), 852–859. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.12.005>
268. Poletta, GL, Larriera A, Kleinsorge E y Mudry MD. (2008). *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 650(2), 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.12.001>
269. Pollock C. (2016). The Canary in the Coal Mine. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 30(4), 386–391. <https://doi.org/10.1647/1082-6742-30.4.386>
270. Pórfido OD, Butler E, de Titto E, Issaly P y Benítez R. (2014). *Los Plaguicidas en la República Argentina* (Ministerio de Salud de la Nación.). Buenos Aires, Argentina.
271. Potti J. (2007). Variation in the hematocrit of a passerine bird across life stages is mainly of environmental origin. *Journal of Avian Biology*, 38(6), 726–730. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0908-8857.04073.x>
272. Powers LV y Stowe DM. (2020). Pigeons and Doves. En J. J. Heatley y K. E. Russell (Eds.), *Exotic Animal Laboratory Diagnosis* (1st ed., pp. 543–564). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119108610.ch27>
273. Prosser P y Hart ADM. (2005). Assessing Potential Exposure of Birds to Pesticide-Treated Seeds. *Ecotoxicology*, 14(7), 679–691. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0018-4>
274. Puliafito E, Guevara M, Puliafito C, Gantuz M, Inzirillo R. (2000). Contaminación atmosférica en Mendoza. Uso de la tecnología SIG como herramienta de diagnóstico y pronóstico. X Congreso Nacional de Cartografía. 37–49. Disponible en: http://lidecc.cs.uns.edu.ar/~nbb/ccm/downloads/Clases/Literatura/EP_IGM_2000.pdf
275. Pushpanjali PAK, Prasad RL, Prasad A, Singh SK, Kumar A y Jadha SB. (2005). *In ovo* embryotoxicity of α -endosulfan adversely influences liver and brain metabolism and the immune system in chickens. *Pesticide Biochemistry and*

- Physiology*, 82(2), 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2004.09.004>
276. Quadri-Adrogué A, Miglioranza KSB, Copello S, Favero M y SecoPon JP. (2019). Pelagic seabirds as biomonitors of persistent organic pollutants in the Southwestern Atlantic. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110516. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110516>
277. Quero AAM, Ferré DM, Zarco A, Cuervo PF y Gorla NBM. (2016). Erythrocyte micronucleus cytome assay of 17 wild bird species from the central Monte desert, Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(24), 25224–25231. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7638-5>
278. Quero AAM, Muñoz I, Ferré DM y Gorla NBM. (2018). Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos con coloración secuencial Giemsa-naranja de acridina en el gato doméstico (*Felis domesticus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(3), 800–807. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i3.14769>
279. Quero AAM, Zarco A, Landa FB y Gorla NBM. (2019). Plasma cholinesterase activity in wild birds from undisturbed woodlands in the central monte desert. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(8), 1692 – 1700. <https://doi.org/10.1002/etc.4458>
280. Quirós L, Ruiz X, Sanpera C, Jover L y Piña B. (2008). Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (N.E. Spain). *Environmental Pollution*, 155(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.10.030>
281. Ragnarsdottir KV. (2000). Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. *Journal of the Geological Society*, 157(4), 859–876. <https://doi.org/10.1144/jgs.157.4.859>
282. Raimondo S, Mineau P y Barron MG. (2007). Estimation of Chemical Toxicity to Wildlife Species Using Interspecies Correlation Models. *Environmental Science y Technology*, 41(16), 5888–5894. <https://doi.org/10.1021/es070359o>
283. Ralph CJ, Geupel GR, Pyle P, Martin TE, DeSante DF y Milá B.(1996). Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres. Pacific Southwest Research Station, Albany.
284. Ramírez JA y Lacasaña M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales*,4(2), 67–75.

285. Ratcliffe DA. (1970). Changes Attributable to Pesticides in Egg Breakage Frequency and Eggshell Thickness in Some British Birds. *The Journal of Applied Ecology*, 7(1), 67. <https://doi.org/10.2307/2401613>
286. Remsen JV. (2015). The South American Classification Committee of the American Ornithologists' Union: a new classification of the birds of South America. *Neotropical Birding*, 21–23.
287. Richards SM. (2000). Chlorpyrifos: exposure and effects in passerines and anurans. Dissertation in Texas Tech University, EEUU.
288. Richardson RJ, Moore TB, Kayyali US, Fowke JH y Randall JC. (1993). Inhibition of Hen Brain Acetylcholinesterase and Neurotoxic Esterase by Chlorpyrifos *in Vivo* and Kinetics of Inhibition by Chlorpyrifos Oxon *in Vitro* : Application to Assessment of Neuropathic Risk. *Toxicological Sciences*, 20(3), 273–279. <https://doi.org/10.1093/toxsci/20.3.273>
289. Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, de BemArizi M, Bernardi GF y Dias RD. (2006). Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicology and Teratology*, 28(4), 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2006.05.001>
290. Robbio RD. (2021). Estado del desarrollo embrionario de la codorniz común (*Coturnixcoturnix*). Tesis para optar al título de veterinario. Universidad Juan Agustín Maza. Mendoza, Argentina.
291. Robitzki A, Mack A, Hoppe U, Chatonnet A y Layer PG. (1997). Regulation of Cholinesterase Gene Expression Affects Neuronal Differentiation as Revealed by Transfection Studies on Reaggregating Embryonic Chicken Retinal Cells. *European Journal of Neuroscience*, 9(11), 2394–2405. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01656.x>
292. Rodríguez-Valero MI y Alonso-Sarria F. (2019). Clasificación de imágenes Landsat-8 en la Demarcación Hidrográfica del Segura. *Revista de Teledetección*, (53), 33- 44. <https://doi.org/10.4995/raet.2019.11016>
293. Romao J, Moraes T, Teixeira R, Cardoso W y Buxade C. (2008). Effect of egg storage length on hatchability and weight loss in incubation of egg and meat type Japanese quails. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 10(3), 143–147. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2008000300001>
294. Roy C. (2005). Plasma b-esterase activities in european raptors. *Journal of*

Wildlife Diseases, 41(1), 184–208.

295. Ruiz G, Rosenmann M, Novoa FF y Sabat P. (2002). Hematological parameters and stress index in rufous-collared sparrows dwelling in urban environments. *The Condor*, 104(1), 162- 166. [https://doi.org/10.1650/0010-5422\(2002\)104\[0162:HPASII\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1650/0010-5422(2002)104[0162:HPASII]2.0.CO;2)
296. Ruvalcaba-Ortega I, Bermúdez de León M, Mendiola-Castillo S, González-Escalante L, Canales-del-Castillo R, Mercado-Hernández R. (2017). Evaluation of Plasma Cholinesterase Activity in Native Birds from Pesticide-Exposed Agricultural Lands. *Rangeland Ecology y Management*, 70(5), 584–588. <https://doi.org/10.1016/j.rama.2017.03.003>
297. Sahoo A, Sahu SK, Sharmila M y Sethunathan N. (1990). Persistence of carbamate insecticides, carbosulfan and carbofurano in soils as influenced by temperature and microbial activity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 44(6), 948–954. <https://doi.org/10.1007/BF01702188>
298. Sahu CR y Ghatak S. (2002). Effects of Dimecron on Developing Chick Embryo: Malformations and other Histopathological Changes. *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C*, 31(1), 15–20. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0264.2002.00355.x>
299. Saldeña EL, Hynes V, Ferré DM, Quero AÁM, Neuilly V y Gorla NBM. (2017). Evento de Intoxicación en Perros de Zona Urbana mediante Cebos Contaminados con Aldicarb. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(3), 514- 521. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i3.12849>
300. Sellier N, Brillard JP, Dupuy V y Bakst MR. (2006). Comparative staging of embryo development in chicken, turkey, duck, goose, guinea fowl, and Japanese quail assessed from five hours after fertilization through seventy-two hours of incubation. *Journal of Applied Poultry Research*, 15(2), 219-228.
301. Samet Y, Agengui L y Abdelhédi R. (2010). Anodic oxidation of chlorpyrifos in aqueous solution at lead dioxide electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 650(1), 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2010.08.008>
302. Sandoval-Herrera N, Paz Castillo J, Herrera Montalvo LG y Welch KC. (2021). Micronucleus Test Reveals Genotoxic Effects in Bats Associated with Agricultural Activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(1), 202–207. <https://doi.org/10.1002/etc.4907>

303. Santarpia L, Grandone I, Contaldo F y Pasanisi F. (2013). Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 4(1), 31–39. <https://doi.org/10.1007/s13539-012-0083-5>
304. Santos CSA, Loureiro S, Sotillo A, Müller W, Stienen EWM, De Neve L. (2019). Assay optimisation and age-related baseline variation in biochemical markers in Lesser Black-backed gulls. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.084>
305. Saraswati TR y Tana S. (2015). Development of Japanese Quail (*Coturnix Coturnix Japonica*) Embryo. *International Journal of Science and Engineering*, 8(1), 38- 41.
306. Satoh T. (2006). Global Epidemiology of Organophosphate and Carbamate Poisonings. En *Toxicology of Organophosphate y Carbamate Compounds*. Ed. Elsevier. pp. 89–100 <https://doi.org/10.1016/B978-012088523-7/50009-0>
307. Schalm's OW, Jain NC y Carroll EJ. (2010). *Veterinary Hematology*. Ed. Lea and Febrieger. Phidelpia, Estados Unidos.
308. Schaumburg LG, Poletta GL, Siroski PA y Mudry MD. (2012). Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.06.023>
309. Schindler SL, Gildersleeve RP, Thaxton JP y McRee DI. (1987). Hematological response of hemorrhaged Japanese quail after blood volume replacement with saline. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 87(4), 933–945. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(87\)90017-X](https://doi.org/10.1016/0300-9629(87)90017-X)
310. Schoeters G y Hoogenboom R. (2006). Contamination of free-range chicken eggs with dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls. *Molecular Nutrition y Food Research*, 50(10), 908–914. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500201>
311. Schwaiger J, Wanke R, Adam S, Pawert M, Honnen W y Tribskorn R. (1997). The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6(1), 75–86. <https://doi.org/10.1023/A:1008212000208>
312. Scope A, Filip T, Gabler C y Resch F. (2002). The Influence of Stress from Transport and Handling on Hematologic and Clinical Chemistry Blood Parameters of Racing Pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Diseases*, 46(1),

- 224–229. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0224:TIOSFT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0224:TIOSFT]2.0.CO;2)
313. Seriani R, França JG, Lombardi JV, Brito JM y Ranzani-Paiva MJT. (2015). Hematological changes and cytogenotoxicity in the tilapia *Oreochromis niloticus* caused by sub-chronic exposures to mercury and selenium. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(1), 311–322. <https://doi.org/10.1007/s10695-014-9984-x>
314. Sharaf S, Khan A, Khan MZ, Aslam F, Saleemi MK y Mahmood F. (2010). Clinico-hematological and micronuclear changes induced by cypermethrin in broiler chicks: Their attenuation with vitamin E and selenium. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(4), 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.05.002>
315. Shepherd GL y Somers CM. (2012). Adapting the buccal micronucleus cytome assay for use in wild birds: Age and sex affect background frequency in pigeons. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53(2), 136–144. <https://doi.org/10.1002/em.21673>
316. Rodriguez Silveira ED, Benvindo-Souza M, Assis RA, dos Santos CGA, de Lima Amorim NP, Borges RE. (2021). Micronucleus and different nuclear abnormalities in wild birds in the Cerrado, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(10), 14279–14287. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16845-4>
317. Simon A, Thomas DW, Bourgault P, Blondel J, Perret P y Lambrechts MM. (2005). Between-population differences in nestling size and hematocrit level in blue tits (*Parus caeruleus*): a cross-fostering test for genetic and environmental effects. *Canadian Journal of Zoology*, 83(5), 694–701. <https://doi.org/10.1139/z05-059>
318. Skarphedinsdottir H, Gunnarsson K, Gudmundsson GA y Nfon E. (2010). Bioaccumulation and Biomagnification of Organochlorines in a Marine Food Web at a Pristine Site in Iceland. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(3), 800–809. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9376-x>
319. Slotkin TA, Seidler FJ, Ryde IT y Yanai J. (2008). Developmental neurotoxic effects of chlorpyrifos on acetylcholine and serotonin pathways in an avian model. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(5), 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2008.02.005>
320. Smith EE y Bush M. (1978). Haematologic parameters on various species of strigiformes and falconiformes. *Journal of Wildlife Diseases*, 14(4), 447–450.

<https://doi.org/10.7589/0090-3558-14.4.447>

321. Solomon KR, Giesy JP, Kendall RJ, Best LB, Coats JR, Dixon KR. (2001). Chlorpyrifos: Ecotoxicological Risk Assessment for Birds and Mammals in Corn Agroecosystems. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 7(3), 497–632. <https://doi.org/10.1080/20018091094510>
322. Souto HN, de Campos Júnior EO, Campos CF, Rodrigues TS, Pereira BB y Morelli S. (2018). Biomonitoring birds: the use of a micronuclei test as a tool to assess environmental pollutants on coffee farms in southeast Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(24), 24084–24092. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2466-4>
323. Speit G, Autrup H, Crebelli R, Henderson L, Kirsch-Volders M, Madle S. (2000). Thresholds in genetic toxicology — concluding remarks. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 464(1), 149–153. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00176-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00176-X)
324. Stevenson RD. (2005). EcoPhysiology and Conservation: The Contribution of Endocrinology and Immunology- Introduction to the Symposium. *Integrative and Comparative Biology*, 45(1), 1–3. <https://doi.org/10.1093/icb/45.1.1>
325. Stončius D. (2003). Spontaneous micronuclei in embryos of the Black-headed Gull (*Larusridibundus L.*) populations. *Ekologija*, 1, 63–66.
326. Stončius D y Lazutka JR. (2003). Spontaneous and benzo[a]pyrene-induced micronuclei in the embryos of the black-headed gull (*Larusridibundus L.*). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 538(1–2), 31–39. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00092-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00092-5)
327. Stone WB. (1979). Poisoning of wild birds by organophosphate and carbamate pesticides. *New York Fish and Game Journal* 26(1), 37-47.
328. Story P y Cox M. (2001). Review of the effects of organophosphorus and carbamate insecticides on vertebrates. Are there implications for locust management in Australia? *Wildlife Research*, 28(2), 179. <https://doi.org/10.1071/WR99060>
329. Strum KM, Hooper MJ, Johnson KA, Lanctot RB, Zaccagnini ME y Sandercock BK. (2010). Exposure of Nonbreeding Migratory Shorebirds to Cholinesterase-Inhibiting Contaminants in the Western Hemisphere. *The Condor*, 112(1), 15–28. <https://doi.org/10.1525/cond.2010.090026>

330. Stuber MJ, Hooper MJ y Belthoff JR. (2018). Examination of Pesticide Exposure In Burrowing Owls Nesting In Agricultural And Nonagricultural Areas In the Morley Nelson Snake River Birds of Prey National Conservation Area, Idaho. *Journal of Raptor Research*, 52(2), 191–206. <https://doi.org/10.3356/JRR-17-18.1>
331. Sukop M y Cogger CG. (1992). Adsorption of carbofuran, metalaxyl, and simazine: Koc evaluation and relation to soil transport. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 27(5), 565–590. <https://doi.org/10.1080/03601239209372801>
332. Sultatos LG y Murphy SD. (1983). Hepatic microsomal detoxification of the organophosphates paraoxon and chlorpyrifos oxon in the mouse. *Drug Metabolism and Disposition*, 11(3), 232-238.
333. Summers-Smith JD. (2003). The decline of the House Sparrow: a review. *British Birds*, 8, 439- 446.
334. Takei Y, Okawara Y y Kobayashi H. (1988). Water intake induced by water deprivation in the quail *Coturnix coturnix japonica*. *Journal of Comparative Physiology B*, 158(5), 519–525. <https://doi.org/10.1007/BF00692559>
335. Taparia N, Mathur P y Shahani L. (2014). Effect of an Environmental Pollutant- Marshal, Carbamate Insecticide on the Development of Avian Embryo. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(4), 283-289.
336. Tecles F, Subiela SM y Cerón JJ. (2001). Influencia de diversas condiciones analíticas en la determinación de colinesterasa en sangre entera mediante el método de Ellman. *Anales de veterinaria de Murcia*, 17, 68- 80.
337. Testai E, Buratti FM y di Consiglio E. (2010). Chlorpyrifos. En Handbook of Pesticide Toxicology. 3er edición. Elsevier. Burlington, Estados Unidos.
338. Thomas P y Fenech M. (2011). Buccal Micronucleus Cytome Assay. In V. V. Didenko (Ed.), *DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo* (Vol. 682, pp. 235–248). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-409-8_17
339. Thompson HM. (1999). Esterases as Markers of Exposure to Organophosphates and Carbamates. *Ecotoxicology*, 8, 369- 384.
340. Thompson HM, Walker CH y Hardy AR. (1991). Changes in activity of avian serum esterases following exposure to organophosphorus insecticides. *Archives of*

- Environmental Contamination and Toxicology*, 20(4), 514–518.
<https://doi.org/10.1007/BF01065841>
341. Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R y Polasky S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(6898), 671–677.
<https://doi.org/10.1038/nature01014>
342. Timchalk C. (2010). Organophosphorus insecticide pharmacokinetics. En Kryeger R (ed). Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. Academic Press. pp. 1409-1433.
343. Tolbert PE, Shy CM y Allen JW. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 271(1), 69–77.
[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(92\)90033-I](https://doi.org/10.1016/0165-1161(92)90033-I)
344. Tomazelli J, Rodrigues GZP, Franco D, de Souza MS, Burghausen JH, Panizzon J. (2021). *Potential Use of Distinct Biomarkers (Trace Metals, Micronuclei and Nuclear Abnormalities) in a Heterogeneous Sample of Birds in Southern Brazil*. (preprint). *Research Square: In Review*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-306006/v1>
345. Trudeau SF y Sans Cartier GL. (2000). *Biochemical methods to determine cholinesterase activity in wildlife exposed to pesticides*. Ottawa: Minister of Public Works and Government Services Canada.
346. Tsarpali V, Kassara C, Barboutis C, Papadimitraki M, Kloukinioti M, Giokas S y Dailianis S. (2020). Assessing the seasonal and intrinsic variability of neurotoxic and cyto-genotoxic biomarkers in blood of free-living Eleonoras' falcons. *Science of The Total Environment*, 711, 135101.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135101>
347. Uggini GK, Patel PV y Balakrishnan S. (2012). Embryotoxic and teratogenic effects of pesticides in chick embryos: A comparative study using two commercial formulations. *Environmental Toxicology*, 27(3), 166–174.
<https://doi.org/10.1002/tox.20627>
348. Uggini GK y Suresh B. (2013). Genotoxic effects of two different classes of insecticide in developing chick embryos. *Toxicological y Environmental Chemistry*, 95(6), 992–1005. <https://doi.org/10.1080/02772248.2013.828888>
349. USEPA: United State Environmental Protection Agency. (2016). Rachel Carson.

Disponible en: <https://archive.epa.gov/epa/aboutepa/rachel-carson.html>. Último acceso 11-09-2021

350. USEPA: United States Environmental Protection Agency. (2020). CADDIS. Volumen 2. Disponible en: <https://www.epa.gov/caddis-vol2/insecticides>. Último acceso 12-11-2019
351. van der Meer E y van Oers K. (2015). Gender and Personality Differences in Response to Social Stressors in Great Tits (*Parus major*). *PLOS ONE*, *10*(5), e0127984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127984>
352. van der Oost R, Beyer J y Vermeulen NPE. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *13*(2), 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
353. Van Leeuwen CJ, Grootelaar EMM y Niebeek G. (1990). Fish embryos as teratogenicity screens: A comparison of embryotoxicity between fish and birds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *20*(1), 42–52. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(90\)90045-7](https://doi.org/10.1016/0147-6513(90)90045-7)
354. Varga T, Cravedi JP, Fuzesi I y Varnagy L. (2002). Residues of fenitrothion in chick embryos following exposure of fertile eggs to this organophosphorus insecticide. *Revue de Médecine Vétérinaire*. Disponible en: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR2002001454>
355. Várnagy L y Budai P. (1995). Agrochemical hygiene. Ed. Mezőgazda Publishing. Budapest, Hungría.
356. Vaughan-Higgins R, Vitali S, Reiss A, Besier S, Hollingsworth T y Smith G. (2016). Development of reference ranges for plasma total cholinesterase and brain acetylcholinesterase activity in free-ranging carnaby's black-cockatoos (*Calyptorhynchus latirostris*). *Journal of Wildlife Diseases*, *52*(3), 592–598. <https://doi.org/10.7589/2015-02-047>
357. Viana LF, Suárez YR, Cardoso CAL, Solórzano JCJ, Crispim BdoA, Grisolia A B y Lima-Junior SE. (2018). Erythrocyte Nuclear Abnormalities in *Astyanax lacustris* in Response to Landscape Characteristics in Two Neotropical Streams. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *75*(2), 327–334. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0476-8>
358. Villamil Lepori EC, Bovi Mitre G y Nasseta M. (2013). Situación actual de la

- contaminación por plaguicidas en Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 25- 43.
359. Vinkler M, Schnitzer J, Munclinger P, Votýpka J y Albrecht T. (2010). Haematological health assessment in a passerine with extremely high proportion of basophils in peripheral blood. *Journal of Ornithology*, 151(4), 841–849. <https://doi.org/10.1007/s10336-010-0521-0>
360. Vleck CM, Vortalino N y Vleck D. (2000). Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living Adelie penguins'. *The Condor*, 102, 392- 400. <https://doi.org/10.1023/A:1008212000208>
361. Walker CH, Sibly RM y Peakall DB. (2005). Principles of ecotoxicology. CRC press. Washington, Estados Unidos
362. Ware GW y Whitacare DM. (2004). An Introduction to Insecticides. Ed. Radcliffe's IPM World Textbook. 4th edition. University of Minnesota. Disponible en: <https://ipmworld.umn.edu/ware-intro-insecticides>
363. WHO: World Health Organization. (1990). Public Health impact of pesticides used in agriculture. Ed. WHO. Geneva, Suiza.
364. Wikelski M y Cooke SJ. (2006). Conservation physiology. *Trends in Ecology y Evolution*, 21(1), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.10.018>
365. Williams RJ, Holladay SD, Williams SM y Gogal RM. (2017). Environmental Lead and Wild Birds: A Review. In de Voogt P (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Cham: Springer International Publishing. pp. 157–180) https://doi.org/10.1007/398_2017_9
366. Włodarczyk R, Podlaszczuk P, Kaczmarek K, Janiszewski T y Minias P. (2018). Leukocyte profiles indicate nutritional, but not moulting stress in a migratory shorebird, the Common Snipe (*Gallinago gallinago*). *Journal of Ornithology*, 159(2), 345–354. <https://doi.org/10.1007/s10336-017-1516-x>
367. Wobeser G, Bollinger T, Leighton FA, Blakley B y Mineau P. (2004). Secondary poisoning of eagles following intentional poisoning of coyotes with anticholinesterase pesticides in western Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(2), 163–172. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.2.163>
368. Wolf Th, Niehaus-Rolf C y Luepke NP. (2003). Investigating genotoxic and hematotoxic effects of N- nitrosodimethylamine, N -nitrosodiethylamine and N -nitrosodiethanolamine in the hen's egg–micronucleus test (HET–MN). *Food and*

- Chemical Toxicology*, 41(4), 561–573. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00281-8](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00281-8)
369. Wolf T, Niehaus-Rolf C y Luepke NP. (2002). Some new methodological aspects of the hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 514(1–2), 59–76. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00317-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00317-5)
370. Wolf T y Luepke NP. (1997). Formation of micronuclei in incubated hen's eggs as a measure of genotoxicity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 394(1–3), 163–175. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(97\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00136-8)
371. Worek F, Koller M, Thiermann H y Szinicz L. (2005). Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. *Toxicology*, 214(3), 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.012>
372. Yancheva V. (2016). Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. *Applied Ecology and Environmental Research*, 14(1), 47–75. https://doi.org/10.15666/aeer/1401_047075
373. Zaccagnini ME. (2013). Porqué monitoreo ecotoxicológico de diversidad de aves en sistemas productivos?. Larrea (ed.). INTA Expone. Buenos Aires, Argentina.
374. Zúñiga-González G, Torres-Bugarín O, Luna-Aguirre J, González-Rodríguez A, Zamora-Perez A y Gómez-Meda BC. (2000). Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 467(1), 99–103. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00021-8)
375. Zúñiga-González G, Torres-Bugarín O, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ibarra MLR y Martínez-González S. (2001). Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutation Research*, 494, 161- 167.
376. Zwarg T, Prioste F, Thijl Vanstreels RE, Dos Santos RJ y Matushima ER. (2012). Normal Plasma Cholinesterase Activity of Neotropical Falconiformes and Strigiformes. *Journal of Raptor Research*, 46(2), 201–207. <https://doi.org/10.3356/JRR-11-50.1>