



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Ciencias Veterinarias

**Evaluación del efecto genotóxico producido por
exposición a formulaciones comerciales de
Cipermetrina, Clorpirifos, Endosulfán, Glifosato y
mezclas de las mismas, en etapas tempranas del
desarrollo de *Caiman latirostris***

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad Nacional del Litoral en el
área de Ciencias Veterinarias

Lic. López González Evelyn C.

Director: Méd. Vet. Larriera Alejandro.

Co-director: Dr. Siroski Pablo A.

Año: 2016

Resumen

Caiman latirostris (yacaré overo) es una de las dos especies del género *Caiman* (Crocodylia, Alligatoridae) que habitan en Argentina, siendo los únicos representantes de este Orden en nuestro país. Gran parte del hábitat en su distribución natural está siendo afectado por el avance de la frontera agrícola, quedando los mismos como ambientes fragmentados, rodeados de grandes extensiones de cultivos. Los embriones y las crías son los individuos más vulnerables de la población, con las mayores probabilidades de afección por plaguicidas.

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

Los resultados obtenidos demostraron que estas formulaciones, en concentraciones similares a las recomendadas para su uso a campo, inducen daño genotóxico evidenciado principalmente por el test de micronúcleos y, en ciertos casos, por otras anormalidades nucleares. El crecimiento no se vio afectado en la mayoría de los casos. Las mezclas no mostraron mayor efecto que los compuestos por separado, aunque algunos de sus componentes evidenciaron interacciones entre ellos. En base a estos hallazgos, es necesario profundizar la evaluación de los efectos de plaguicidas, particularmente de mezclas complejas, mediante biomarcadores de distinto punto final que nos permita identificar las condiciones reales de exposición en las que se encuentra esta especie en su ambiente natural.

**Evaluation of genotoxic effect produced by commercial formulations of
Cypermethrin, Chlorpyrifos, Endosulfan, Glyphosate and their mixtures, in
Caiman latirostris early developmental stages**

Abstract

Caiman latirostris (broad snouted-caiman) is one of the two species of the genus *Caiman* (Crocodylia, Alligatoridae) that occur in Argentina, being the only representatives of the *Crocodyles* in our country. An important part of its habitat in their natural distribution is being affected by the agricultural frontier expansion. Many of these places remain as fragmented environments, surrounded by large extensions of crops. Embryos and neonates are the most vulnerable stages in the population, with high probability of suffering of pesticide contamination.

During the development of this Thesis, different assays were conducted under sub-chronic exposure controlled conditions in embryos and neonates of *C. latirostris*, in order to determine the effect of commercial formulations of pesticides based on-Endosulfan (END), Cypermethrin (CYP), Chlorpyrifos (CPF) and Glyphosate (GLY), as well as complex mixtures of these formulations widely used in the region.

The results showed that these formulations, at concentrations similar to those recommended for crop application, induce genotoxic damage evidenced mainly by the micronucleus test and, in certain cases, by other nuclear abnormalities. Growth was not affected in most of the assays conducted. The mixtures showed similar effects than those of the compounds separately, although in some mixtures, certain interactions were observed among their components.

Based on these findings, it is necessary further evaluate the effects of pesticides, particularly complex mixtures, through biomarkers of different endpoints that allows us to identify the real exposure conditions of this species in its natural environment.

Agradecimientos:

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

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

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

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

-A mi Co-director Dr. Pablo A. Siroski y a la Dra. Gisela L. Poletta, por darme la oportunidad de desarrollar esta línea tan interesante de investigación, por ser mis guías, consejeros y por seguir confiando en mí.

-A mis compañeras de equipo y experimentales: Lic. Ma. Agustina Latorre y Ma. Laura Romito, que también formaron parte de esto.

-A la Lic. Ma. Soledad Moleón por su colaboración y predisposición para todo siempre.

-A toda mi familia por alentarme a estudiar siempre a pesar de todo.

-A Gonzalo, por acompañarme en todo momento, animarme y no dejarme bajar los brazos nunca.

-A todos mis amigos por siempre estar.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
CAPÍTULO 1. Introducción general	4
1.1 El cultivo de soja transgénica en Argentina y la problemática ambiental.....	5
1.2 Plaguicidas asociados a la soja GM: Consideraciones toxicológicas y clasificación.....	9
1.2.1 Herbicidas.....	14
1.2.1.1 Glifosato.....	18
1.2.2 Insecticidas.....	20
1.2.2.1 Cipermetrina.....	21
1.2.2.2 Endosulfán.....	23
1.2.2.3 Clorpirifos.....	25
1.3 Biomarcadores.....	26
1.3.1 Generalidades y clasificación.....	26
1.3.2 Biomarcadores de Genotoxicidad.....	28
1.3.2.1 Test de Micronúcleos (MN) y otras Anormalidades nucleares (ANs).....	30
1.3.3 Daño genotóxico por plaguicidas.....	33
1.4 <i>Caiman latirostris</i>	35
1.4.1 Características de la especie y distribución geográfica.....	35
1.4.2 Programa de Monitoreo y Autorepoblamiento de <i>Caiman latirostris</i> con fines de Manejo.....	38
1.4.3 Situación actual de la especie.....	42
1.4.4 <i>Caiman latirostris</i> como centinela de contaminación por plaguicidas..	42
1.5 Hipótesis y Objetivos.....	43
1.5.1 Hipótesis.....	43
1.5.2 Objetivo general.....	43
1.5.3 Objetivos específicos.....	44
CAPÍTULO 2. Evaluación del efecto genotóxico de formulaciones comerciales de Cipermetrina, Clorpirifos, Endosulfán y Glifosato en embriones de <i>Caiman latirostris</i> (Etapa 1)	45
2.1 Introducción.....	46
2.2 Materiales & métodos.....	48
2.2.1 Compuestos químicos.....	48

2.2.2 Huevos de <i>Caiman latirostris</i>	49
2.2.3 Ensayos de exposición embrionaria (<i>in ovo</i>).....	50
2.2.3.1 Exposición embrionaria por Topicación (sobre la cáscara del huevo).....	51
2.2.3.1.1. Ensayos de exposición embrionaria por topicación a las formulaciones comerciales de Cipermetrina, Endosulfán y Glifosato.....	52
2.2.3.1.2. Ensayos de exposición embrionaria por topicación a formulación comercial de Clorpirifos.....	55
2.2.3.2 Exposición embrionaria por Pulverización (sobre material de nido).....	56
2.2.4 Obtención de muestras de sangre.....	58
2.2.5 Variables registradas.....	59
2.2.6 Análisis estadístico.....	60
2.3 Resultados.....	61
2.4 Discusión y conclusiones generales del capítulo.....	75

CAPÍTULO 3. Evaluación del efecto genotóxico de formulaciones comerciales de Cipermetrina, Clorpirifos, Endosulfán y Glifosato en neonatos de

<i>Caiman latirostris</i> (Etapa 2).....	83
3.1 Introducción.....	84
3.2 Materiales & métodos.....	84
3.2.1 Compuestos químicos.....	84
3.2.2 Ejemplares de <i>Caiman latirostris</i>	85
3.2.3 Obtención de muestras de sangre.....	85
3.2.4 Ensayos de exposición de neonatos (<i>in vivo</i>).....	86
3.2.4.1 Ensayo de exposición de neonatos de <i>Caiman latirostris</i> por inmersión a las formulaciones comerciales de Cipermetrina, Endosulfán y Glifosato.....	88
3.2.4.2 Ensayo de exposición de neonatos de <i>Caiman latirostris</i> por inmersión a la formulación de Clorpirifos.....	90
3.2.5 Análisis estadístico.....	90
3.3 Resultados.....	91
3.4 Discusión y conclusiones generales del capítulo.....	99

CAPÍTULO 4. Ensayos de exposición a mezclas de formulaciones comerciales

de Cipermetrina, Clorpirifos, Endosulfán y Glifosato en embriones y neonatos de <i>Caiman latirostris</i>	106
4.1 Introducción.....	107
4.2 Materiales & métodos.....	108
4.2.1 Compuestos químicos.....	108
4.2.2 Ejemplares de <i>Caiman latirostris</i>	108
4.2.3 Ensayos de exposición a mezclas de plaguicidas formulados.....	108
4.2.3.1 Ensayos de exposición embrionaria (<i>In ovo</i> : por topicación y por pulverización).....	108
4.2.3.1.1 Por topicación sobre la cáscara de huevos.....	109
4.2.3.1.2 Por pulverización sobre el material de nido.....	109
4.2.3.2 Ensayos de exposición de neonatos (<i>In vivo</i>).....	111
4.2.3.2.1 Evaluación de neonatos expuestos a mezclas de tres formulaciones.....	111
4.2.3.2.2 Evaluación de neonatos expuestos a mezclas de dos formulaciones.....	112
4.2.4 Variables registradas.....	113
4.2.5 Análisis estadístico.....	113
4.3 Resultados	114
4.4 Discusión y conclusiones generales del capítulo.....	120
CAPÍTULO 5. Discusión y Conclusiones finales	127
5.1 Discusión general.....	128
5.2 Conclusiones finales y proyecciones.....	133
Bibliografía citada	135

ANEXO I

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1.1: Superficie Sembrada según cultivos. Total Nacional 2011/2012. Modificado a partir de: Scalabrini Ortíz, 2013.....	5
Figura 1.2: Mapa de producción de soja en Argentina, por provincia. <u>Fuente:</u> Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA), 2013.....	6
Figura 1.3: Producción de soja total en Argentina (toneladas), 1970 a 2016. <u>Fuente:</u> SIIA MAGyP.....	7
Figura 1.4: Principales países productores de soja en el mundo (campana 2015/2016). Modificado a partir de: INTA, 2016.....	8
Figura 1.5: Fechas de siembra y cosecha de la soja de 1ra. y soja de 2da. en Argentina. <u>Fuente:</u> Scalabrini Ortiz, 2013.....	9
Figura 1.6: Estructura molecular de Glifosato.....	19
Figura 1.7: Estructura molecular de Cipermetrina.....	22
Figura 1.8: Estructura molecular de Endosulfán y sus isómeros α - y β endosulfán.....	23
Figura 1.9: Estructura molecular de Clorpirifos.....	25
Figura 1.10: Formación de micronúcleos (MN) por evento clastogénico o aneugénico.	31
Figura 1.11: Imágenes de algunas de las anomalías nucleares analizadas en eritrocitos de sangre periférica de <i>Caiman latirostris</i>	33
Figura 1.12: Modelo esquemático de inducción de daño genético, incluyendo los efectos pre-mutagénicos, mutagénicos y cromosómicos por la exposición a plaguicidas.....	35
Figura 1.13: Ejemplar adulto de <i>Caiman latirostris</i>	36
Figura 1.14: Mapa de la distribución geográfica de <i>Caiman latirostris</i> y <i>C. yacare</i> en Argentina (Larriera y col., 2008).....	37
Figura 1.15: Distribución geográfica de <i>Caiman latirostris</i> y <i>C. yacare</i> en Sudamérica (Larriera y col., 2008).....	37
Figura 1.16: Cosecha de huevos de <i>Caiman latirostris</i> en ambiente natural y sala de incubación artificial.....	40
Figura 1.17: Individualización en ejemplar de <i>Caiman latirostris</i> mediante cortes en verticilos caudales.....	40
Figura 1.18: Imagen aérea de los invernáculos acondicionados para crianza de yacarés; zona de cría del “Proyecto Yacaré”, Provincia de Santa Fe.....	41

Figura 2.1: a) Imagen satelital de la Reserva Natural Manejada “El Fisco” (30°11'26"S, 61°0'27"O; Dpto. San Cristóbal, centro-norte de la Provincia de Santa Fe, Argentina), Área Natural Protegida (Ley 12.930, 2008); b) Imagen de la laguna principal (“Laguna Fisco”), donde se colectan los huevos de <i>Caiman latirostris</i> . Tomada de Google Earth.....	50
Figura 2.2: Imagen de topicación de las soluciones sobre la cáscara del huevo de <i>Caiman latirostris</i>	51
Figura 2.3: Imagen de la aplicación de las soluciones a evaluar por pulverización sobre el material de nido de <i>Caiman latirostris</i>	57
Figura 2.4: Extracción de sangre de la vena espinal en neonato de <i>Caiman latirostris</i> , siguiendo la técnica de Myburgh y col. (2014).....	59
Figura 2.5: Frecuencia de micronúcleos (FMN) y de otras anomalías nucleares observados en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> en los diferentes grupos experimentales del primer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE1).....	63
Figura 2.6: Frecuencia de micronúcleos (FMN) observados en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> en los diferentes grupos experimentales del segundo ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE2)..	64
Figura 2.7: Frecuencia de micronúcleos (FMN) en los diferentes grupos experimentales del tercer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE3).....	66
Figura 2.8: Frecuencia de micronúcleos (FMN) en los diferentes grupos experimentales del cuarto ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE4).....	67
Figura 2.9: Relación concentración-efecto: Frecuencia de micronúcleos (FMN) en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> - formulación comercial de Glifosato PanzerGold® (500, 750 y 1000 µg/huevo).....	71
Figura 2.10: Relación concentración-efecto: brotes nucleares (BN) en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> -formulación de Glifosato PanzerGold® (500, 750 y 1000 µg/huevo).....	72
Figura 2.11: Relación concentración-efecto: Frecuencia de micronúcleos (FMN) en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> -formulación comercial de Clorpirifos Lorsban 48E® (10y 100 µg/huevo).....	73
Figura 2.12: Frecuencia de micronúcleos (FMN) y de células binucleadas (BIN) observados en eritrocitos de neonatos de <i>Caiman latirostris</i> en los diferentes grupos experimentales del ensayo de pulverización sobre	

el material de nido.....	73
Figura 3.1: Ensayo de Exposición de Neonatos de <i>Caiman latirostris</i> por inmersión.....	86
Figura 3.2: Frecuencia de micronúcleos (FMN), brotes nucleares (BN) y núcleos excéntricos (NE), observados en eritrocitos de neonatos de <i>Caiman latirostris</i> en los diferentes grupos experimentales del primer ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN1).....	93
Figura 3.3: Frecuencia de micronúcleos (FMN) y de núcleos excéntricos (NE), observados en eritrocitos de neonatos de <i>Caiman latirostris</i> en los diferentes grupos experimentales del tercer ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN3).....	95
Figura 3.4: Relación concentración-efecto: Frecuencia de micronúcleos (FMN) en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> -formulación comercial de Glifosato PanzerGold® (2,5 mg/L y 5 mg/L).....	97
Figura 3.5: Relación concentración-efecto: media de anomalías nucleares totales (ANT) presentes en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> – formulación comercial del herbicida Glifosato Roundup Full II® (2,5 mg/L y 5 mg/L).....	98
Figura 3.6: Relación concentración-efecto Frecuencia de micronúcleos (FMN) -concentraciones de la formulación comercial de Clorpirifos: Lorsban 48E® (0,5 µg/L y 1 µg/L).....	99
Figura 4.1: Frecuencia de micronúcleos (FMN), brotes nucleares (BN) y muescas (MU), observados en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> en los diferentes grupos experimentales del ensayo de exposición de neonatos por inmersión a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas de a pares (EENM ₃).....	119

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1.1: Superficie sembrada, cosechada, producción y rendimiento de soja en Argentina (Período 2005 a 2016).....	5
Tabla 1.2: Clasificación toxicológica según la OMS, IARC y USEPA de los plaguicidas más utilizados en cultivos extensivos de Argentina	13
Tabla 2.1: Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el primer ensayo de exposición embrionaria de <i>Caiman latirostris</i> por topicación (EEE1) a las formulaciones comerciales de Cipermetrina, Endosulfán y Glifosato.....	53
Tabla 2.2: Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el segundo ensayo de exposición embrionaria de <i>Caiman latirostris</i> por topicación (EEE2) a las formulaciones comerciales de Cipermetrina, Endosulfán y Glifosato.....	54
Tabla 2.3: Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el tercer ensayo de exposición embrionaria de <i>Caiman latirostris</i> por topicación (EEE3) a la formulación comercial de Clorpirifos.....	55
Tabla 2.4: Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el cuarto ensayo de exposición embrionaria de <i>Caiman latirostris</i> por topicación (EEE4) a la formulación comercial de Clorpirifos.....	56
Tabla 2.5: Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el ensayo de exposición embrionaria de <i>Caiman latirostris</i> por pulverización (sobre el material de nido) a las formulaciones comerciales de Cipermetrina, Clorpirifos y Glifosato.....	58
Tabla 2.6: Media \pm EE de la frecuencia de micronúcleos y de otras anormalidades nucleares, observadas en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> para los distintos grupos experimentales del primer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE1).....	62
Tabla 2.7: Frecuencia de cada categoría de anomalía nuclear (media \pm EE) observadas en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> en los diferentes grupos experimentales del segundo ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE2).....	65
Tabla 2.8: Frecuencia (media \pm EE) de anomalías nucleares (excepto MN) observadas en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> en los distintos grupos experimentales del tercer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE3).....	66
Tabla 2.9: Frecuencia de cada anomalía nuclear (media \pm EE; excepto MN)	

observadas en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> en los distintos grupos experimentales del cuarto ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE4).....	67
Tabla 2.10: Parámetros de tamaño corporal (media ± EE) en neonatos de <i>Caiman latirostris</i> en los distintos grupos experimentales del primer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE1).....	68
Tabla 2.11: Parámetros del crecimiento (media ± EE) observados al nacer, a los 3 y 6 meses de edad en <i>Caiman latirostris</i> , en los distintos grupos experimentales del segundo ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE2).....	69
Tabla 2.12: Parámetros de tamaño corporal al nacer (media ± EE) en <i>Caiman latirostris</i> observados en los distintos grupos experimentales del tercer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE3).....	70
Tabla 2.13: Parámetros de tamaño corporal al nacer (media ± EE) en <i>Caiman latirostris</i> observados en los distintos grupos experimentales del cuarto ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE4).....	70
Tabla 2.14: Frecuencia de diferentes anomalías nucleares (excepto MN) observadas en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> (media ± EE) para los distintos grupos experimentales en el ensayo de pulverización sobre el material de nido.....	74
Tabla 2.15: Parámetros de tamaño corporal (media ± EE) al nacer en <i>Caiman latirostris</i> observados en los distintos grupos experimentales del ensayo de pulverización sobre el material de nido.....	75
Tabla 3.1: Grupos experimentales y concentraciones (inicial y final) aplicadas en el primer ensayo de exposición de neonatos de <i>Caiman latirostris</i> por inmersión a las formulaciones comerciales de Cipermetrina, Endosulfán y Glifosato (EEN1).....	88
Tabla 3.2: Grupos experimentales y concentraciones (inicial y final) aplicadas en el segundo ensayo de exposición de neonatos de <i>Caiman latirostris</i> por inmersión a las formulaciones comerciales de Cipermetrina, Endosulfán y Glifosato (EEN2).....	89
Tabla 3.3: Grupos experimentales y concentraciones (inicial y final) aplicadas en el tercer ensayo de exposición de neonatos de <i>Caiman latirostris</i> por inmersión a la formulación de Clorpirifos (EEN3).....	90
Tabla 3.4: Frecuencia de micronúcleos y de otras anomalías nucleares	

(media \pm EE) observadas en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> en los diferentes grupos experimentales del primer ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN1).....	92
Tabla 3.5: Frecuencia de micronúcleos y de cada anomalía nuclear en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> (media \pm EE) para los distintos grupos experimentales del segundo ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN2).....	94
Tabla 3.6: Frecuencia de micronúcleos y de otras anomalías nucleares observadas en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> (media \pm EE) en los diferentes grupos de experimentación del tercer ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEE3).....	95
Tabla 3.7: Parámetros de Crecimiento (media \pm EE) evaluados en <i>Caiman latirostris</i> en los distintos grupos de experimentación del primer ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN1).....	96
Tabla 3.8: Parámetros de Crecimiento (media \pm EE) evaluados en <i>Caiman latirostris</i> en los distintos grupos de experimentación del segundo ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN2).....	97
Tabla 3.9: Parámetros de Crecimiento (media \pm EE) evaluados en <i>Caiman latirostris</i> en los distintos grupos de experimentación del tercer ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN3).....	99
Tabla 4.1: Grupos experimentales del ensayo de exposición embrionaria de <i>Caiman latirostris</i> a mezclas por topicación (EEEMt) con las formulaciones comerciales de Glifosato, Cipermetrina y Clorpirifos.....	109
Tabla 4.2: Grupos experimentales del ensayo de exposición embrionaria de <i>Caiman latirostris</i> a mezclas por pulverización (EEEMp) con las formulaciones comerciales de Glifosato, Cipermetrina y Clorpirifos.....	110
Tabla 4.3: Grupos experimentales aplicados en el primer ensayo de exposición de neonatos de <i>Caiman latirostris</i> por inmersión a Mezclas con las formulaciones comerciales de Glifosato, Cipermetrina y Endosulfán (EENM ₁).....	111
Tabla 4.4: Grupos experimentales del segundo ensayo de exposición de neonatos en <i>Caiman latirostris</i> por inmersión a Mezclas con las formulaciones comerciales de Glifosato, Cipermetrina y Clorpirifos (EENM ₂).....	112
Tabla 4.5: Grupos experimentales del tercer ensayo de exposición de neonatos de <i>Caiman latirostris</i> por inmersión a Mezclas de las formulaciones comerciales de Glifosato+Clorpirifos; Cipermetrina+Glifosato;	

Clorpirifos+Cipermetrina (EENM ₃).....	113
Tabla 4.6: Frecuencia de micronúcleos y de otras anomalías nucleares (media ± EE) observados en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> en el primer ensayo de exposición embrionaria a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas por topicación (EEEM _{t1}).....	114
Tabla 4.7: Frecuencia de micronúcleos y de otras anomalías nucleares (media ± EE) observados en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> en la repetición del ensayo de exposición embrionaria a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas por topicación (EEEM _{t2})....	115
Tabla 4.8: Frecuencia de micronúcleos y de cada anomalía nuclear (media ± EE) observados en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> del ensayo de exposición embrionaria a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas por pulverización (EEEM _p).....	115
Tabla 4.9: Parámetros de tamaño corporal (medias ± EE) evaluados en individuos recién nacidos de <i>Caiman latirostris</i> en cada ensayo de exposición embrionaria a Mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas (EEEM)	116
Tabla 4.10: Frecuencia de micronúcleos y de otras anomalías nucleares (medias ± EE) observadas en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> en los ensayos de exposición de neonatos por inmersión a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas 1 y 2 (EENM ₁ y EENM ₂).....	117
Tabla 4.11: Parámetros de crecimiento (final – inicial; medias ± EE) evaluados en animales de <i>Caiman latirostris</i> en los Ensayos de exposición de neonatos por inmersión a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas 1 y 2 (EENM ₁ y EENM ₂).....	118
Tabla 4.12: Frecuencia de micronúcleos y de otras anomalías nucleares (medias ± EE) observadas en eritrocitos de <i>Caiman latirostris</i> en los diferentes grupos experimentales del ensayo de exposición de neonatos por inmersión a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas de a pares (EENM ₃).....	119
Tabla 4.13: Parámetros de tamaño (final – inicial) evaluados en animales de <i>Caiman latirostris</i> del tercer ensayos de exposición de neonatos por inmersión a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas (EENM ₃).....	120

ABREVIATURAS:

AC: aberraciones cromosómicas

AMPA: ácido aminometil fosfónico

ANOVA: análisis de la varianza

ANs: anormalidades nucleares

ANT: anormalidades nucleares totales

BIL: núcleo bilobulado

BIN: eritrocito binucleado

BN: brote nuclear

°C: grado centígrado

CL50: concentración letal 50

CASAFE: Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes

CAS: Chemical Abstract Service Number Registered

CIP: cipermetrina

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

cm: centímetro

CN: control negativo

CP: control positivo

CPF: clorpirifos

CV: control vehículo

DL50: dosis letal 50

EC: ensayo cometa

EE: error estándar

EEE: ensayo de exposición embrionaria

EEEM: ensayo de exposición embrionaria a la mezcla

EEN: ensayo de exposición de neonatos

EENM: ensayo de exposición de neonatos a la mezcla

ECP: ensayo a corto plazo

ELP: ensayo a largo plazo

END: endosulfán

EO: estrés oxidativo

FANs: frecuencia de anormalidades nucleares

FMN: frecuencia de micronúcleo

g: gramo

GLI: glifosato

GM: genéticamente modificado

ha.: hectárea

ICH: intercambio de cromátidas hermanas

ID: índice de daño

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

Kg: kilogramo

L / l: litro

LHC: longitud hocico-cloaca

LT: longitud total

M: mezcla compleja de formulados comerciales

mg: miligramo

ml: mililitro

MN: micronúcleo

MU: muesca

NE: núcleo excéntrico

NL: núcleo lobulado

NRC: National Research Council (USA)

NV: núcleo vacuolado

OMS: Organización Mundial de la Salud (en inglés WHO: World Health Organization)

ONU: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (en inglés
FAO: Food and Agriculture Organization)

p.a.: principio activo

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

POEA: surfactante polioxietileno-amina

PY: Proyecto Yacaré

RDC: ruptura de doble cadena

RR: Roundup Ready®

RSC: ruptura de simple cadena

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

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

µg: microgramo

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

µl: microlitro

USEPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 EL CULTIVO DE SOJA TRANSGÉNICA EN ARGENTINA Y LA PROBLEMÁTICA AMBIENTAL

Originalmente el cultivo de soja (*Glycine max L.*) se introdujo en nuestro país, a mediados de los años sesenta como una opción productiva proveedora de proteínas para la alimentación animal, a instancias del programa de desarrollo de oleaginosas promovido por el Estado Nacional. Ese rol experimental ha quedado en el pasado y en la actualidad el cultivo de soja es el más relevante de toda la producción agropecuaria nacional (INTA, 2016; **Fig. 1.1** y **Tabla 1.1**).

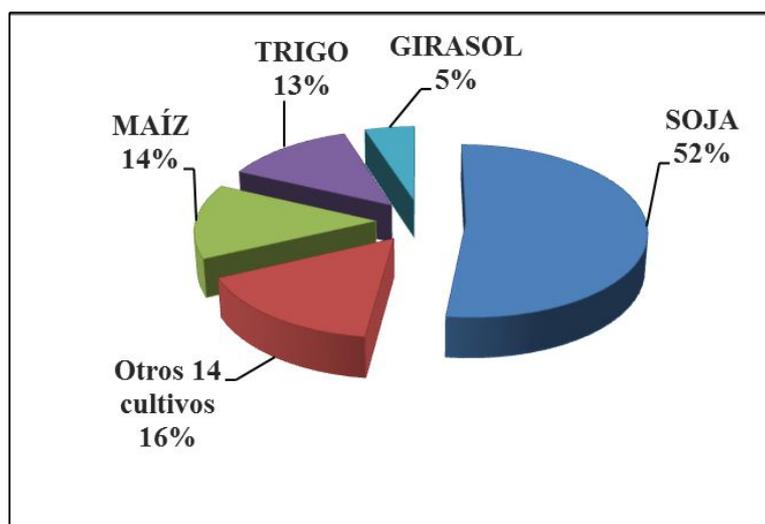


Fig. 1.1 Superficie sembrada según cultivos en Argentina. Total Nacional 2011/2012. Modificado a partir de: Scalabrini Ortíz, 2013.

Tabla 1.1 Superficie sembrada, cosechada, producción y rendimiento de soja en Argentina (Período 2005 a 2016)

Campaña	Superficie Sembrada (ha)	Superficie Cosechada (ha)	Producción (tn)	Rendimiento (kg/ha)
2005/06	15.393.474	15.130.038	40.537.363	2.679
2006/07	16.141.337	15.981.264	47.482.786	2.971
2007/08	16.608.935	16.389.509	46.238.893	2.821
2008/09	18.042.895	16.771.003	30.989.469	1.848
2009/10	18.343.940	18.130.799	52.675.466	2.905
2010/11	18.902.259	18.764.850	48.888.538	2.605
2011/12	18.670.937	17.577.320	40.100.196	2.281
2012/13	20.035.572	19.418.825	49.306.201	2.539
2013/14	19.781.812	19.252.552	53.397.715	2.774
2014/15	19.792.100	19.334.915	61.398.272	3.176
2015/16*	20.300.000	19.500.000	58.500.000	3.000

Fuente: INTA, 2016. Informe estadístico del mercado de soja.

CAPÍTULO 1

Desde mediados de la década de los '90 se produjo en el sector agropecuario nacional una revolución tecnológica comandada por el cultivo de soja y sustentada sobre la siembra directa y las semillas genéticamente modificadas, desplazando los cultivos tradicionales junto con aquellos productores que no adoptaron los nuevos métodos productivos (Carrasco et al., 2012).

Este importante cambio agrario se produce con la introducción de la primer semilla genéticamente modificada (GM), la soja transgénica producida por la empresa Monsanto, resistente al herbicida glifosato (GLI) y conocida como soja RR o Roundup Ready®, ya que la formulación de GLI más utilizada a nivel mundial es Roundup®. La soja RR fue aprobada para su uso en Argentina en 1996 y se ha expandido rápidamente, al igual que en otros países del mundo, aumentando el uso de plaguicidas y de las zonas de cultivo (**Fig. 1.2**), incluso en provincias donde nunca se había cultivado previamente (Arregui et al., 2010).

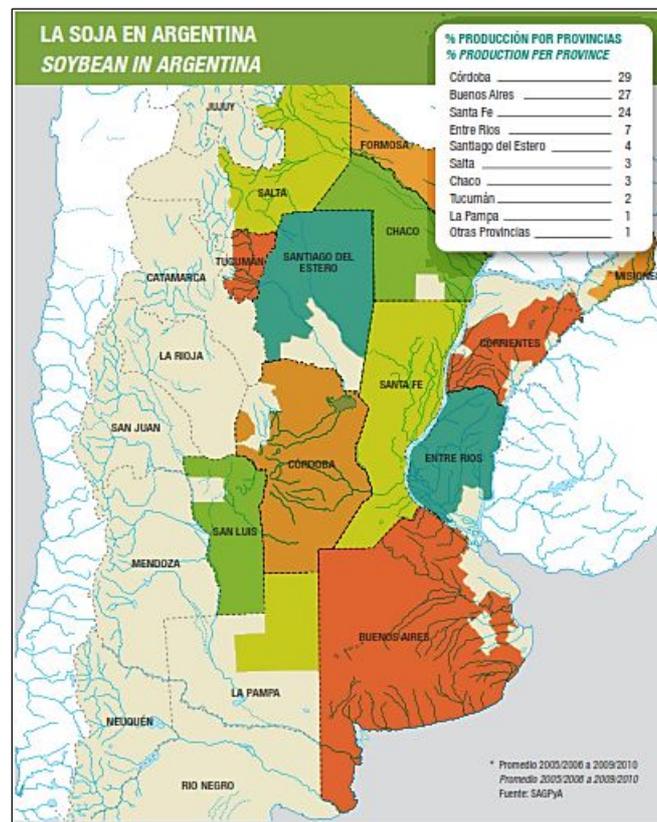


Fig. 1.2 Mapa de producción de soja en Argentina, por provincia.

Fuente: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA), 2013.

Como se mencionó previamente, la principal propiedad de la soja RR es ser resistente al GLI, un herbicida total o de amplio espectro que elimina todas las malezas en cualquier momento del ciclo sin afectar la planta de soja, lo cual implica una reducción importante de costos por la eliminación de las labores e insumos asociados con la aplicación de herbicidas

CAPÍTULO 1

selectivos de pre y post-emergencia, que requerían las variedades convencionales (Reboratti, 2010). La otra innovación importante, por la que con frecuencia se argumenta que la soja RR es sostenible ambientalmente, fue la adopción de la siembra directa, un método que evita el arado y minimiza el laboreo con el fin de conservar el suelo intacto antes de la siembra, que se realiza con máquinas preparadas especialmente para tal fin. La semilla se siembra directamente en el suelo a la profundidad requerida con una remoción mínima de la tierra, y las malezas se controlan con herbicidas (a base de GLI) en lugar de utilizarse métodos mecánicos. Las supuestas ventajas de la siembra directa son que disminuye la evaporación y la escorrentía del agua, la erosión del suelo y el empobrecimiento de la capa superficial. Entre las desventajas se mencionan la compactación del suelo y el aumento de la acidez (Antoniou et al., 2010).

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

La producción de soja se incrementó en proporciones sin precedentes, con cultivos que aumentaron de un área de 38.000 hectáreas en 1970 a más de 20 millones de hectáreas en la actualidad, con una producción que se estima en 59 millones de toneladas de las cuales el 100% es soja GM (GEA, 2016, **Fig. 1.3**), y con el evidente aumento en el uso de plaguicidas y fertilizantes (Maganasco y Di Paola, 2015).

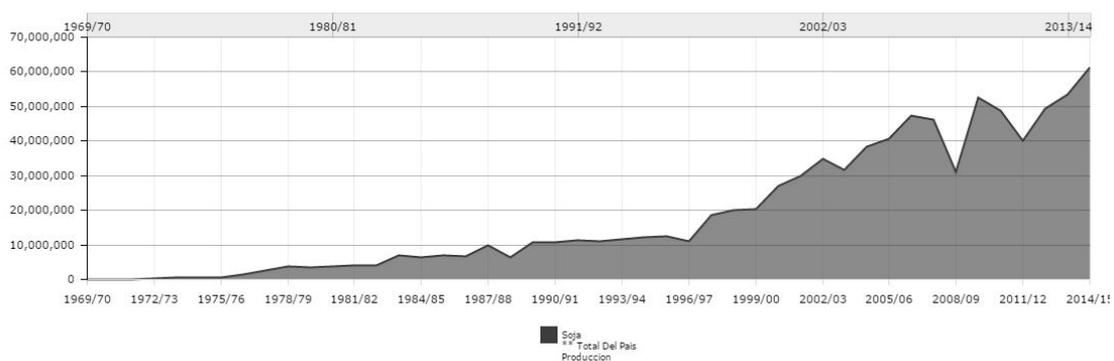


Fig. 1.3 Producción de soja total en Argentina (toneladas), 1970 a 2016. Fuente: SIIA MAGyP.

La propagación continua de la labranza cero con soja GM y el uso asociado de formulaciones de GLI, han creado preocupaciones generalizadas sobre los efectos a largo plazo de estas prácticas sobre el suelo, los cuerpos de agua, la biodiversidad y las comunidades rurales. Asimismo, el cultivo de soja es el principal impulsor de la

CAPÍTULO 1

deforestación y la pérdida de hábitat en Argentina y otros países de la región (Urcola et al., 2015).

Como consecuencia social, este sistema ha ocasionado la expulsión de trabajadores del sistema agropecuario, contribuyendo así al crecimiento de los índices de desocupación y a la destrucción de las economías regionales (Fisher et al., 2015).

El avance de la frontera agrícola sobre montes nativos y las yungas, en especial en las provincias del Chaco, Santiago del Estero y Salta, ha ocasionado la destrucción de ecosistemas boscosos y la consecuente pérdida de biodiversidad. Esto implica el aumento del riesgo de desertificación, lo que se profundiza con el hecho de que la soja, al ser una oleaginosa altamente consumidora de los nutrientes del suelo (una producción agrícola basada en "tiempos económicos" y no en "tiempos naturales"), no deja lugar al restablecimiento del mismo. Este avance también compromete los procesos naturales involucrados en el recurso hídrico (regulación de aguas superficiales y del subsuelo, modificación de los procesos de intercepción, infiltración y evapotranspiración) (González, 2015).

El aumento de los cultivos transgénicos ha dado lugar a una amplia investigación sobre el impacto potencial de este tipo de sistema de producción en el medio ambiente. La soja GM, se ha convertido en un monocultivo que reemplazó a los cultivos convencionales, siendo el principal productor mundial EE.UU. (33%) seguido por Brasil (31%), en tercer lugar Argentina (18%), luego China (4%), Paraguay (3%) y finalmente India (2%) (**Fig. 1.4**; INTA, 2016).

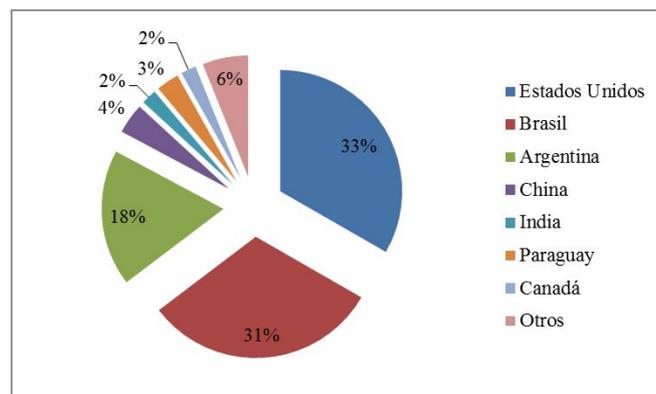


Fig. 1.4 Principales países productores de soja en el mundo (campaña 2015/2016). Modificado a partir de: INTA, 2016.

En Argentina, la campaña de soja se inicia en septiembre con la siembra de los suelos y finaliza en mayo con la cosecha. Algunos establecimientos productores de trigo (mayoritariamente el sudeste de la provincia de Buenos Aires) incluyen la producción de

CAPÍTULO 1

soja conocida como soja de 2da., en su sistema de rotación de cultivos. En este caso la época de siembra se inicia en noviembre-enero y la cosecha se extiende hasta julio y suele tener un rendimiento menor a la soja de 1ra. por sembrarse tardíamente a su época óptima (Fig. 1.5).



Fig. 1.5 Fechas de siembra y cosecha de la soja de 1ra. y soja de 2da. en Argentina
Fuente: Scalabrini Ortiz, 2013.

El control químico mediante plaguicidas es la herramienta de control de plagas más difundida en Argentina y en el mundo. Los plaguicidas son considerados como uno de los principales factores que intervienen en la contaminación del medio ambiente del mundo actual. Sin embargo, la formulación de nuevos y potentes plaguicidas es cada vez mayor, debido a la resistencia de las plagas, los controles de higiene y la gran necesidad humana de más alimentos como consecuencia del crecimiento poblacional (Mostafalou y Abdollahi, 2013).

1.2 PLAGUICIDAS ASOCIADOS A LA SOJA GM: CONSIDERACIONES TOXICOLÓGICAS Y CLASIFICACIÓN

El artículo 2 del *Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas* (ONU/OMS, 2015), define como *plaguicida* a “cualquier sustancia o mezcla de sustancias con ingredientes químicos o biológicos destinados a repeler, destruir o controlar cualquier plaga o a regular el crecimiento de las plantas”.

En general, podemos decir que los plaguicidas son productos químicos utilizados para combatir o controlar animales, plantas y hongos considerados plagas, cuando por su cantidad, pueden ocasionar daño a los cultivos, la salud o el ambiente. Por lo tanto, es muy

CAPÍTULO 1

importante el rol de las autoridades tanto sanitarias como agropecuarias y de la población en general en la comercialización, manejo, uso y control de los plaguicidas.

La toxicidad es la capacidad de una sustancia o sus productos metabólicos de causar, por acción física o físico-química, en determinadas dosis, un daño a la salud de los organismos. Las clases toxicológicas se definen en base a la Dosis Letal Media (DL50) de cada sustancia y su formulación. La DL50 es usada con frecuencia como un indicador general de la toxicidad aguda de una sustancia, es la cantidad de tóxico capaz de matar al 50% de la población en estudio. Se expresa en mg por kg de peso vivo debiendo constar la especie, el sexo y la vía de absorción (Magnasco, 2015).

Cuando se trata de plaguicidas en aire o agua se hace referencia a la Concentración Letal Media (CL50), la cual debe ir acompañada por el tiempo de exposición, y es importante considerar su toxicidad a corto y mediano plazo, que ocurre repetidamente durante varias semanas o meses (toxicidad subcrónica) pero sobre todo a largo plazo, que ocurre repetidamente por meses o años (toxicidad crónica). La exposición subcrónica puede durar diferentes períodos de tiempo y dicha definición depende del ciclo de vida de la especie en estudio, pero 90 días es la duración más común de la prueba, mientras que los estudios de exposición a largo plazo o crónicos se realizan por períodos de exposición superiores a 3 meses (Eaton y Gilbert, 2008). Los ensayos se realizan con animales en experimentación e interesa conocer las posibilidades cancerígenas, los efectos mutagénicos, los efectos teratogénicos o alteraciones en la reproducción, el metabolismo y mecanismos de eliminación, la neurotoxicidad, posibles efectos retardados y la potenciación (Carballo y Mudry, 2006).

La OMS, clasifica los plaguicidas principalmente según su peligrosidad, en base a su toxicidad aguda en estudios con animales, entendiendo ésta como su capacidad de generar daño a la salud cuando se producen una o múltiples exposiciones en un tiempo relativamente corto, según sea el producto formulado comercializado en forma sólida o líquida. Esta clasificación se basa sólo en la DL50 aguda, por vía oral o dérmica de las ratas, y no tiene en cuenta los riesgos que pueden derivar de la exposición prolongada, la persistencia ambiental o bioacumulación tanto de su principio activo (p.a.) como de los metabolitos resultantes de su descomposición. Se clasifican en las siguientes clases: extremadamente peligroso (Ia), muy peligroso (Ib), moderadamente peligroso (II), poco peligroso (III), normalmente no ofrecen peligro bajo uso normal (IV, a veces no clasificados) (OMS, 2009).

Los *Plaguicidas Extremadamente Peligrosos*, son aquellos que representan riesgos agudos o crónicos particularmente elevados para la salud o el medio ambiente, de acuerdo con los

CAPÍTULO 1

sistemas de clasificación internacionalmente aceptados, como los de la OMS o el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), o por figurar en acuerdos o convenciones internacionales pertinentes con carácter vinculante. Además, podrán considerarse muy peligrosos y tratarse como tales aquellos plaguicidas que, en condiciones de uso en un país, parezca que ocasionan un daño grave o irreversible para la salud o el medio ambiente (ONU/OMS, 2015).

Cuando se hace referencia a una formulación, la toxicidad no es la misma que la del p.a. Debemos tener en cuenta que si el producto comercial es una mezcla de p.a., la OMS aconseja requerir al formulador la DL50 real, oral y dérmica, obtenida por experimentación con ese producto comercial; o clasificarlo de acuerdo al constituyente más riesgoso de la mezcla como si éste constituyera el total de la concentración. Aunque se debe tener en cuenta que la toxicidad puede verse incrementada por los fenómenos de sinergismo o potenciación. Los coadyuvantes, sobre todo los solventes, aumentan la toxicidad de una manera difícil de cuantificar (Coalova et al., 2013).

Los plaguicidas formulados se componen de dos partes, una representada por el p.a. o ingrediente activo, y otra constituida por los surfactantes, también denominados "inertes" o inactivos, por su falta de acción biocida. El p.a. corresponde al químico que actuará controlando la plaga, mientras que los ingredientes inertes corresponderán a los aditivos tales como vehículos, emulsionantes, tensoactivos o adyuvantes que se agregan al p.a. para mejorar sus propiedades físicas y químicas, que ayudan a transportar y facilitar la penetración del p.a. en el organismo blanco, aquel para el cual fue diseñado el plaguicida (INTA, 2015).

Existe una enorme diversidad de sustancias utilizadas como formulación de plaguicidas, la USEPA tiene registradas más de 1.500 sustancias activas en alrededor de 50.000 plaguicidas comerciales diferentes. En Argentina el volumen comercializado de plaguicidas refleja un incremento sostenido, habiendo aumentado un 92% entre los años 1998 y 2007 (Coalova et al., 2013; CASAFE, 2016). Este incremento viene dado por la intensificación en la práctica de monocultivos y la aplicación continua de las mismas formulaciones, que llevan a la aparición de resistencias en los organismos que se pretenden controlar. De esta manera, los productores suelen incrementar tanto la cantidad de aplicaciones como las dosis de aplicación, y con el objeto de disminuir costos en las aplicaciones de plaguicidas, los productores raramente aplican un solo producto, sino por lo contrario, aplican mezclas complejas de insecticidas, o insecticidas y herbicidas, tanto por la aplicación de distintos plaguicidas en simultáneo como por la presencia de aditivos en cada una de las formulaciones comerciales (Ronco et al., 2008; Coalova et al., 2013). Las formulaciones a

CAPÍTULO 1

base del herbicida GLI se utilizan en forma obligada para el cultivo de soja transgénica, que corresponde a la totalidad de la soja sembrada en nuestro país. Los principales insecticidas asociados a la soja son productos formulados basados en el piretroide cipermetrina (CIP), el organofosforado clorpirifos (CPF) y, al menos hasta la actualidad, el organoclorado endosulfán (END). La clasificación toxicológica de los mismos según la OMS, USEPA y IARC se presenta en la tabla (**Tabla 1.2**). Estos productos son evaluados en un proceso regulatorio, basado en los criterios y normas de registro de la OMS. A lo largo de este proceso, se presentan estudios detallados sobre el impacto del producto en la salud y el ambiente para que pueda ser aprobado y comercializado. Se realizan estudios de toxicidad aguda oral, dérmica e inhalatoria, toxicidad subcrónica para las mismas vías, estudios de toxicidad crónica (desarrollo de malformaciones o cáncer) y ecotoxicidad. En Argentina, estos estudios son presentados al Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), que luego de un análisis pormenorizado, otorga la autorización para uso y comercialización del producto. Los requisitos necesarios para obtener esa autorización son similares a los de Europa, Estados Unidos y otros países del mundo. Más allá de la autorización regulatoria y para minimizar los riesgos a la salud y al ambiente, los productos fitosanitarios deben ser usados responsablemente y siguiendo las normas, principios y recomendaciones técnicas aplicables a la producción, procesamiento y transporte de alimentos, orientadas a asegurar la protección de la higiene, la salud humana y el medio ambiente, mediante métodos ecológicamente seguros, higiénicamente aceptables y económicamente factibles, otorgadas por los procedimientos de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), el cual tiene por objetivo el manejo y uso responsable durante todo el ciclo (usando los productos correctos, en las dosis adecuadas y siguiendo las recomendaciones presentes en las etiquetas de los productos), y hasta su eliminación y disposición final de envases (CASAFE, 2016).

CAPÍTULO 1

Tabla 1.2 Clasificación toxicológica según la OMS, IARC y USEPA de los plaguicidas más utilizados en cultivos extensivos de Argentina

Plaguicida	Compuesto	No. CAS	Clase química	OMS	IARC	USEPA	Cultivos donde se aplican
Insecticida	Cipermetrina	52315-07-8	Piretroide	Clase II	NL	Grupo C	Soja, maíz, trigo, girasol, algodón, cereales, cebada, alfalfa, frutales
	Clorpirifos	2921-88-2	Organofosforado	Clase II	NL	Grupo E	Soja, trigo, maíz, girasol, algodón, cebada, alfalfa, arroz, frutales
	Endosulfán	115-29-7	Organoclorado	Clase II	NL	NP	Soja, maíz, trigo, girasol, alfalfa, arroz, algodón, frutales
Herbicida	Glifosato	1071-83-6	Fosfonoglicina	Clase III	Grupo 2A	P	soja, maíz, trigo, girasol, algodón, arroz, trigo, frutales

OMS: Organización Mundial de la Salud (Clasificación toxicidad aguda)
 Clase II: Moderadamente peligroso
 Clase III: Producto poco peligroso
IARC: International Agency for Research on Cancer
 NL: No listado
 Grupo 2A: Probablemente carcinógeno para humanos
USEPA: United States Environmental Protection Agency (Carcinogenicidad)
 Grupo C: Posible carcinógeno humano
 Grupo E: Evidencia de no carcinogenicidad para humanos
 P: Probable carcinógeno
 NP: No probable

A pesar de ello, la problemática medioambiental derivada del uso de los plaguicidas es muy amplia y engloba muy diversos aspectos como el desequilibrio de los sistemas biológicos y deterioro ambiental, el desarrollo de resistencias a los plaguicidas, lo que obliga a utilizar mayores concentraciones o productos de mayor efectividad, o cócteles improvisados por parte de los productores al momento de pulverizar, y los posibles efectos tóxicos para los organismos no blanco. A esto se debe añadir la contaminación permanente producida por los residuos de plaguicidas o la toxicidad de los compuestos resultantes de su degradación química o metabólica, que en algunos casos pueden resultar tanto o más tóxicos que el compuesto original, cuyos efectos sinérgicos no están estudiados (Tomasoni, 2013).

Los plaguicidas pueden ser introducidos en la atmósfera por la deriva de la pulverización, la volatilización, y la erosión por el viento de partículas de suelo en los que son adsorbidos. En la atmósfera, los plaguicidas son distribuidos entre las partículas y las fases de vapor basado en la presión de vapor del producto químico, la temperatura ambiente, y concentración de partículas en suspensión (Tomasoni, 2013).

CAPÍTULO 1

Los ecosistemas acuáticos constituyen una de las áreas más susceptibles de vertido de los productos químicos que se utilizan en agricultura, pudiendo alcanzar a distintos recursos hídricos por deriva desde el lugar de aplicación, por arrastre de aguas superficiales o escorrentía, por lixiviación a través del suelo o por agua de lluvia y/o riego o directamente por fumigación. Junto con las características del cuerpo de agua, y las condiciones climáticas (temperatura, humedad, viento y precipitación) de cada región en particular, son factores que afectan a la contaminación de las aguas superficiales. La movilidad de los plaguicidas en el suelo y, por tanto, su transferencia a otros compartimentos ambientales, depende de una variedad de procesos dinámicos físicos, químicos y biológicos complejos, incluyendo desorción-sorción, volatilización, degradación química y biológica, absorción por las plantas, la escorrentía y la lixiviación. La formulación, persistencia, solubilidad, adsorción y volatilidad de los plaguicidas influyen sobre la potencial contaminación del agua. Respecto a la contaminación del suelo, se debe determinar cuan estrechamente se une el plaguicida a los componentes del suelo y cuan móviles son, además de considerar su persistencia. Las interacciones entre el plaguicida y el suelo dependen de las propiedades de ambos. Existen gran cantidad de trabajos que han establecido el movimiento de los plaguicidas. Estos compuestos, además de afectar a los organismos blanco, también afectan a otros seres vivos. Una vez que han ingresado en los organismos, estos compuestos pueden ocasionar importantes perturbaciones en el equilibrio metabólico y fisiológico (Arregui et al., 2010; Hang et al., 2010; Tomasoni, 2013; De Geronimo et al., 2014).

Los plaguicidas pueden clasificarse según su constitución química, su polaridad, su p.a. y/o blanco de acción, entre otros aspectos. Según su blanco de acción, son usualmente categorizados como herbicidas, insecticidas, fungicidas, acaricidas, rodenticidas, nematocidas, molusquicidas, avicidas, alguicidas y bactericidas. También son clasificados según la familia química a la cual pertenecen, la cual está basada en la estructura química, agrupándose en carbamatos, clorados, fosforados, compuestos inorgánicos, piretroides, tiocarbamatos, derivados de la urea, arsenicales, bipiridilos y muchos otros, por el modo de acción y por sus propiedades físico-químicas (CASAFE, 2016).

Argentina es un país mundialmente reconocido por su rol de proveedor de productos primarios agropecuarios. Según datos de la ONU (2015), respecto de la utilización de herbicidas por superficie arable por país, Argentina está en el segundo lugar de mayor utilización de herbicidas por hectárea en sus sistemas productivos (INTA, 2015).

1.2.1 HERBICIDAS

CAPÍTULO 1

Los herbicidas son productos fitosanitarios utilizados para controlar especies vegetales, no deseadas por su impacto negativo en la producción y rendimientos. No existe una única clasificación de herbicidas, ya que los mismos pueden ser agrupados según su naturaleza química, su mecanismo de acción, el momento de aplicación, entre otras. Cabe aclarar también que un mismo herbicida, puede ser englobado en diversas categorías de clasificación (CASAFE, 2010). No obstante, los mismos dividen en:

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

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

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

Preemergentes: se aplican antes de la nacencia del cultivo.

Postemergentes: se aplican después de la nacencia del cultivo.

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

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

Mecanismos de acción de los herbicidas

Una característica en común que pueden tener los herbicidas es que actúan sobre procesos fisiológicos de los vegetales, siendo su toxicidad sobre los animales muy baja en algunos casos.

Existen cuatro tipos de herbicidas:

I- Los que actúan sobre el proceso de fotosíntesis:

Se subdividen en cuatro grupos siendo los tres primeros los que actúan sobre la fase luminosa de la fotosíntesis: (a) Herbicidas que inhiben la transferencia de electrones. A este grupo de herbicidas corresponden las ureas, uracilos y triazinas. Son aplicados al suelo y absorbidos por las raíces, se transportan vía xilema a la parte aérea, llegan a los cloroplastos de las hojas y allí inhiben la fase luminosa. Cualquier planta puede ser afectada por este tipo de herbicidas; (b) Herbicidas que desacoplan la cadena de transporte de electrones. A este grupo de herbicidas pertenecen los Bipiridilos, moléculas con una carga

CAPÍTULO 1

permanente positiva en un átomo de Nitrógeno. Tienen la capacidad de capturar los electrones impidiendo la oxidación y formando radicales libres "superóxidos", oxidantes muy potentes que oxidan los lípidos insaturados de las membranas de los cloroplastos, perdiendo su estructura y función. Estas moléculas se formulan como bromuros y cloruros, son muy solubles y muy fácilmente absorbibles por las raíces. En la práctica se deben añadir vía foliar y no edáfica, ya que al tener carga positiva se absorben irreversiblemente sobre los coloides del suelo, mucho más que cualquier catión metálico, quedándose allí indefinidamente; (c) Herbicidas que impiden la formación de ATP. A este grupo pertenecen las acilanilidas, hidroxibenzonitrilos, dinitrofenoles, piridazinas, N-fenilcarbamatos. Los más importantes son los dinitrofenoles, moléculas con anillo aromático hidroxilado y con dos grupos nitro. Estas moléculas no sólo desacoplan la fosforilación oxidativa de la cadena de transporte fotosintético, sino que también lo hacen a nivel mitocondrial. Por tanto, pueden presentar una toxicidad importante para animales. De aquí que algunos se puedan usar como herbicidas y fungicidas; (d) Herbicidas que alteran la biosíntesis de carotenoides. Actúan en algún punto de la síntesis de licopeno. El más importante es el amino triazol.

II- Los que alteran la biosíntesis de metabolitos distintos a los carbohidratos:

Se subdivide en tres grupos:

(a) Herbicidas que alteran la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. La síntesis de aminoácidos aromáticos es imprescindible, ya que el triptófano y la fenilalanina son precursores de la lignina y de los compuestos aromáticos de la planta. Además, estos aminoácidos luego forman parte de proteínas. Un herbicida capaz de inhibir la síntesis de aminoácidos aromáticos es el glifosato; (b) Herbicidas que alteran la biosíntesis de la glutamina. Los inhibidores de la enzima glutamina sintetasa se cree que se fijan irreversiblemente al sitio catalítico de la enzima, lo cual produce una rápida acumulación de niveles altos de amoníaco y un agotamiento de la glutamina y de varios otros aminoácidos en las plantas. Estos efectos están acompañados de una rápida declinación de la fijación fotosintética de CO₂ y son seguidos por clorosis y desecación de los tejidos de las plantas; (c) Herbicidas que inhiben la síntesis de lípidos: a este grupo pertenecen los tiocarbamatos que inhiben la conversión de ácidos grasos de cadena corta en ácidos grasos de cadena larga. Como consecuencia, frenan el crecimiento del vegetal. Estas moléculas se pueden usar en tratamientos del suelo para semillas que estén germinando.

III- Herbicidas que alteran el crecimiento vegetal:

CAPÍTULO 1

Alteran la elongación y la división celular. Cuando se incorporan a una planta dan lugar a un crecimiento anormal del vegetal y, como consecuencia, originan deformaciones, falta de funcionalidad y la muerte de la planta. Se reconocen 4 grupos:

(a) Herbicidas que alteran la elongación celular. En las células meristemáticas sucede la elongación celular, por acción de las auxinas. Éstas, a altas concentraciones, tienen efectos herbicidas, originan elongación celular desmesurada con malformaciones en los ápices y la muerte del vegetal. A este grupo de herbicidas pertenecen los ácidos ariloxialcanoicos, de dos tipos, el ácido fenoxiacético y el ácido fenoxibutírico. No se usan demasiado ya que en su síntesis se liberan dioxinas. Son herbicidas foliares de contacto que actúan en el punto en que caen, no se traslocan. Esto permite controlar muchas malezas dicotiledóneas que poseen el ápice de crecimiento al descubierto, no protegido por hojas como en monocotiledóneas, lo que les da resistencia al tratamiento y genera selectividad morfológica.; (b) Herbicidas que inhiben la síntesis de giberelinas. Las giberelinas son fitohormonas responsables del crecimiento de la planta, ya que dan lugar a que los entrenudos tengan una determinada longitud. Si se inhibe la síntesis de giberelinas, la distancia de los entrenudos se acorta dando lugar al achaparramiento de la planta, además los pecíolos se acortan, y aumenta el aparato radicular. Todo esto provoca que la planta pierda funcionalidad y muera. El cloromequat (es una sal de amonio cuaternario) inhibe la síntesis de giberelinas; (c) Herbicidas capaces de inhibir la división celular. Hay muchos tipos, pero los más importantes son los N-fenil carbamatos y la Hidrazida maleica. Los N-fenilcarbamatos, son moléculas cuya estructura básica deriva del ácido carbámico. Son usados en el suelo y tienen poca movilidad, alteran la división celular ya que impiden que se produzca la organización correcta de las proteínas que forman parte de los microtúbulos del huso acromático; esto origina células con núcleos gigantes sin funcionalidad. Estos herbicidas afectan a células meristemáticas, impidiéndoles el engrosamiento, no hay diferenciación celular, la planta deja de crecer y muere.

IV- Herbicidas con otros mecanismos de acción:

(a) Herbicidas que provocan la disrupción de la membrana celular: Son los llamados "aceites minerales herbicidas". Son mezclas complejas de hidrocarburos de cadena larga que provienen de la destilación fraccionada del petróleo + fracción seca de la hulla. Al aplicarlos sobre la planta originan la disolución de la cutina ya que provocan su deshidratación y al penetrar en las células disuelven los lípidos de las membranas celulares, como consecuencia la planta muere. Se usan como herbicidas totales; también se usan como herbicidas selectivos en algunos cultivos. Fueron las primeras sustancias usadas como

herbicidas; (b) Herbicidas que actúan sobre pigmentos; (c) Herbicidas con actividad hormonal.

1.2.1.1 GLIFOSATO

El GLI [N-(fosfometil) glicina; CAS 1071-83-6], es el herbicida post-emergente y de amplio espectro más utilizado en todo el mundo. Fue introducido como un p.a. en el mercado por Monsanto, en 1974. Actúa específicamente en plantas y algunos microorganismos mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), que cataliza la formación de un precursor de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina) en vegetales que son esenciales para su supervivencia. Por el contrario, este modelo metabólico no existe en mamíferos (EXTOXNET, 1996), por lo cual originalmente se postulaba la falta de toxicidad de este compuesto en mamíferos.

Varias formulaciones diferentes de herbicidas a base de GLI están actualmente en uso, pero las formulaciones de Roundup® (Monsanto, Saint Louis, MO, USA) han sido cada vez más utilizadas debido a su estrecha asociación con plantas GM resistentes a GLI. Las diferentes formulaciones de Roundup® resultan de la asociación de sales de GLI con surfactantes, un componente importante del herbicida que permite que pase a través de la cutícula cerosa de las hojas de las plantas.

Tiene una masa molecular de 169,07 g y su fórmula molecular es $C_3H_8NO_5P$ (**Fig. 1.6**) Se presenta mayormente en las formulaciones como sal de isopropilamina (IPA), aunque puede encontrarse en otras formas como ácido o diversas contraiones, como es el caso del trimetilsulfonio. En estado puro se presenta como un sólido cristalino blanco, muy soluble en agua (12.000 mg/l, a 25°C) y poco soluble en solventes orgánicos. Su presión de vapor es despreciable. Es un compuesto anfótero y se puede encontrar formando compuestos iónicos distintos en función del pH del medio (EXTOXNET, 1996).

Los principales metabolitos son el ácido aminometil fosfónico (AMPA) y glioxilato, son sustancias muy polares y que finalmente se degradan a dióxido de carbono, amoníaco y fosfato (Aparicio et al., 2013; Ronco et al., 2016).

CAPÍTULO 1

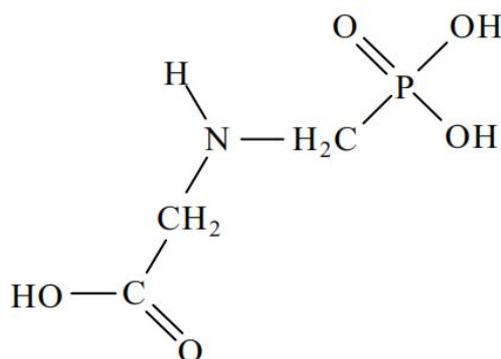


Fig. 1.6 Estructura molecular de Glifosato.

Las formulaciones comerciales más comunes que hay en el mercado tienen como p.a. distintas concentraciones de sales:

- sal isopropilamina (48 y 62%)
- sal dimetilamina (60,8%)
- sal potásica (43,8; 62 y 66,2%)
- sal amónica (40,5; 39,6; 74,7; 78 y 79%)

Dentro de las formulaciones con el nombre "Roundup" (comercializadas por Monsanto), que comprenden el 3,3% de las formulaciones comerciales disponibles, se ha mencionado que existe el coadyuvante denominado polioxietileno-amina (POEA) que podría tener efectos tóxicos más relevantes que el GLI en sí mismo. Los diferentes fabricantes de herbicidas en base a GLI no indican en sus etiquetas la presencia de estos "elementos inertes" (CONICET, 2009).

El GLI es usado en distintas oportunidades a través del ciclo del cultivo, generalmente antes de la siembra para generar un barbecho químico, así como en pre y post-emergencia.

Las dosis de aplicación recomendadas para el cultivo de soja RR varían dependiendo de las malezas presentes en los lotes y las diferentes formulaciones, siendo de 1,5 a 2,5 l o Kg/ha (SENASA).

El consumo de herbicidas a base de GLI en nuestro país aumentó ampliamente desde la introducción de organismos GM, se ha reportado que más de 197 millones de Kg de formulados de GLI fueron aplicados en el año 2014 (Lupi et al., 2015).

Por otra parte, el GLI fue recientemente reclasificado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2015; del inglés *International Agency for Research on*

CAPÍTULO 1

Cancer), como una sustancia cancerígena en el Grupo 2A (*probablemente carcinógeno para humanos*), y se evidencia la necesidad de realizar estudios principalmente sobre la salud humana, debido a "pruebas suficientes" en experimentos con animales.

1.2.2 INSECTICIDAS

Los insecticidas son sustancias o mezclas de sustancias químicas, orgánicas o inorgánicas, destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar el efecto de cualquier insecto (Achudume et al., 2012).

Los insecticidas pueden ejercer su acción sobre uno o diferentes de los estados de desarrollo del insecto y se pueden denominar ovocidas, larvicidas o adulticidas, si eliminan los huevos, la larva o el adulto, respectivamente.

Los insecticidas pueden llegar hasta el lugar donde realizan su acción fisiológica en el insecto (órgano blanco) por varias vías:

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

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

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

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

No sistémicos, ejercen su acción bloqueando las vías respiratorias o por envenenamiento.

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

Mecanismos de acción de los insecticidas:

Se pueden establecer dos tipos de insecticidas:

- I- Insecticidas convencionales
- II- Insecticidas bio-racionales.

CAPÍTULO 1

I- Convencionales

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

- a) los capaces de alterar la transmisión de impulsos nerviosos; este proceso es general en todos los animales. Al acelerarse la transmisión del impulso nervioso, los músculos se tensan, se reduce el oxígeno, colapsando los músculos y derivando en un infarto de miocardio, si disminuye la transmisión del impulso nervioso el organismo se detiene. A este grupo de insecticidas pertenecen los organofosforados, carbamatos y piretroides. Antiguamente, estaban incorporados también los organoclorados, que actualmente están prohibidos en su mayoría.
- b) los que forman complejos con metalo-enzimas
- c) los que bloquean la síntesis de quitina.
- d) los que son capaces de alterar la respiración del organismo, bloqueando enzimas o la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Actualmente no se usan.

II- Bioracionales

Estos insecticidas se caracterizan por tener una acción particular en cada insecto. Gran parte de estos insecticidas no son obtenidos por síntesis química.

Interfieren en procesos biológicos como por ejemplo mudas de larvas, crecimiento, apareamiento, puesta de huevos, la alimentación, la detección olfativa, otros productos evitan la eclosión de los huevos, también pueden considerarse como insecticidas bioracionales las feromonas, u otros productos que actúan de manera similar.

Otro grupo de insecticidas bioracionales son los denominados insecticidas biológicos, también llamados plaguicidas microbianos.

1.2.2.1 CIPERMETRINA

La CIP ((R,S)-alfa-ciano-3-fenoxibenzil (1RS)-cis,trans-3-(2,2-diclorovinil) 2,2-dimetilciclopropano -carboxilato / CAS 52315-07-8) es un insecticida sintético de la familia de los piretroides, clasificado como Clase II (moderadamente tóxico) por la USEPA. Presenta ocho isómeros, tiene un peso molecular de 416,31 g y su fórmula molecular es $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$ (**Fig. 1.7**). Es un líquido viscoso de color amarillo-marrón, con muy baja solubilidad en agua (0,01 mg/l, a 20°C) pero soluble en solventes orgánicos. Posee una presión de vapor de $1,9 \times 10^{-7}$ Pa (EXTOXNET, 1996). Se introdujo en el mercado en 1977

CAPÍTULO 1

como un concentrado emulsionable a ser usado contra una amplia gama de plagas de insectos (Achudume et al., 2012).

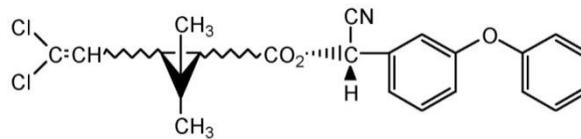


Fig. 1.7 Estructura molecular de Cipermetrina.

Las formulaciones de CIP, que incluyen generalmente una mezcla de isómeros, son utilizadas como insecticidas de amplio espectro. El modo de acción de los piretroides se debe a que causan una prolongación de la apertura de los canales de sodio neuronales dependientes de voltaje, lo que resulta en una transmisión continua del impulso nervioso por no existir una despolarización significativa. Las características de los distintos isómeros determinan el lugar de unión al canal de sodio y según el estereoisómero del que se trate la afinidad que tendrá con el mismo. La cipermetrina pertenece al grupo II dentro de los piretroides, por poseer un grupo ciano en posición alfa, teniendo al cloro como halógeno sustituyente, y afecta principalmente al sistema nervioso central (Krieger, 2010; Martins y Valle, 2012).

Referido a la toxicidad en mamíferos se lo ubica en el grupo de los neurotóxicos, siendo clasificado por su toxicidad aguda oral y dérmica como moderadamente tóxico. Es metabolizado y eliminado más lentamente por los peces que por mamíferos o aves, lo que explica la mayor toxicidad para los primeros (EXTOXNET, 1996).

Según la USEPA, es considerado como altamente tóxico en forma aguda para los invertebrados acuáticos y peces tanto marinos como de agua dulce, y también para las abejas (Biga, 2013).

Posee una persistencia moderada en los suelos y se degrada más rápidamente en aquellos con bajo contenido de materia orgánica. En condiciones aeróbicas, su vida media en suelo es de 4 días a 8 semanas y está sujeto a la degradación microbiana; siendo más persistente en condiciones anaeróbicas ya que la CIP no es soluble en agua y tiene una fuerte tendencia a adherirse a las partículas del suelo. Por tanto, es poco probable que cause contaminación de aguas subterráneas. Al contar con una muy baja solubilidad y baja presión de vapor, se adsorbe, y se asocia a material particulado en ambientes acuosos. Esto limita su movimiento particularmente en los suelos.

En solución acuosa neutra o ácida, la cipermetrina se hidroliza lentamente, la hidrólisis es más rápida a pH 9 (solución básica). Bajo temperaturas ambientales normales, es estable a

CAPÍTULO 1

hidrólisis con una vida media mayor a 50 días y presenta fotodegradación con una vida media mayor a 100 días. En las aguas superficiales las concentraciones de CIP disminuyen rápidamente debido a la adsorción a los sedimentos, partículas suspendidas, plantas y también, por degradación microbiana (EXTOXNET, 1996).

1.2.2.2 ENDOSULFÁN

El END [3-Oxido 6,7,8,9,10,10- hexacloro- 1,5,5a,6,9,9a- hexahidro-6,9- metano- 2,4,3- benzodioxatiepina / CAS 115-29-7 (isómero α , 959-98-8; isómero β , 33213-65-9)], es un insecticida organoclorado de tipo ciclodieno usado contra una amplia variedad de insectos y ácaros que atacan cultivos agrícolas y sectores relacionados, y actúa también como preservador de la madera. Su presión de vapor es de 1200 mPa a 80°C, presenta un peso molecular de 406,96 g y su fórmula molecular es $C_9H_6Cl_6O_3S$ (EXTOXNET, 1996; **Fig. 1.8**).

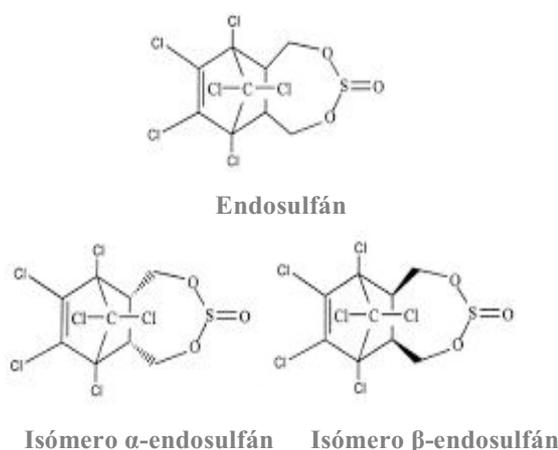


Fig. 1.8 Estructura molecular de Endosulfán y sus isómeros α - y β -endosulfán.

Fue sintetizado en 1956 y técnicamente se compone de una mezcla de dos formas moleculares (isómeros), α - y β -endosulfán, en relación 7:3 (EXTOXNET, 1996). Su modo de acción es mediante el antagonismo del neurotransmisor GABA (ácido gammaaminobutírico) por inhibición de sus receptores. Los receptores GABA operan incrementando la permeabilidad de los iones cloro de las neuronas, de manera que si se los inhibe, se impide el ingreso de los iones cloro a las neuronas, y por tanto se antagonizan los efectos "depresores" del GABA. Los ciclodienos parecen afectar a todos los animales de manera similar, se produce un incremento de la actividad del sistema nervioso (Harikrishnan y Usha, 2004; Betancur et al., 2015).

CAPÍTULO 1

Como la mayoría de los ciclodienos el END es muy persistente y estable en el ambiente. Se ha reportado la muy alta toxicidad del END para numerosos organismos de distintos niveles de organización, desde microorganismos hasta vertebrados incluyendo el hombre, debido al potencial que posee de bioacumularse y biomagnificarse dentro de las cadenas tróficas (EXTOXNET, 1996; Harikrishnan y Usha, 2004).

END se encuentra catalogado como el hidrocarburo clorado más extensamente usado a nivel mundial y actualmente es considerado como una de las causas más importantes de envenenamiento por plaguicida en muchos países. La persistencia ambiental de estas sustancias, y su amplia presencia en muchas regiones, se agrava por el transporte a largo alcance que ocurre de unos sitios a otros como resultado de la volatilización de estos materiales (Betancur et al., 2015). Debido a que es tóxico, bioacumulable y persistente, el uso del END ha sido prohibido en 82 países mientras en otros 12 no está permitido pero tampoco tiene prohibición legal. Por sus propiedades tóxicas, de bioacumulación y persistencia, el Programa de las Naciones Unidas para el Medioambiente (UNEP) lo incluyó en la lista de contaminantes orgánicos prohibidos (Convenio de Estocolmo sobre Compuestos Orgánicos Persistentes- POP's, 2011). En Argentina, se estableció un período de cinco años para la eliminación gradual desde la fecha de la resolución efectiva 511/2011 (SENASA, 2011), que incluye una prohibición total para el uso, importación, procesamiento (síntesis), formulación y comercialización del p.a. y los productos formulados, extendiendo así el uso legal hasta 2016. A pesar de ello, en el momento en el que este estudio se llevó a cabo, el END fue uno de los principales insecticidas utilizado para el control de plagas en Argentina, y existen reportes de que sus residuos y metabolitos se encuentran todavía en el ambiente (Ballesteros et al., 2014; Svartz et al., 2015; Astoviza et al., 2016).

El destino del END liberado en el medio ambiente es distinto para los dos isómeros y también depende del medio en el cual se deposita. El β -endosulfán es más persistente que su isómero alfa. El sulfato de END es el principal producto de la degradación de ambos isómeros, es igualmente tóxico y es por sí mismo más persistente en el medio ambiente que sus compuestos de origen. Puede descomponerse por fotólisis, hidrólisis y biodegradación. En la superficie de las plantas el END se degrada rápidamente en metabolitos, es inmóvil en el suelo, y persiste por más tiempo bajo condiciones de mayor acidez. Generalmente, no desciende hacia el agua subterránea, pero se ha comprobado que se escurre luego de las fumigaciones, y ha sido detectado en aguas subterráneas en estratos profundos. Posee una vida media que varía entre 60 (α -endosulfán) y 800 días (β -endosulfán). También se dan casos de contaminación por desviación y transporte de partículas. La aplicación de volumen ultra bajo puede desviarse hasta varios kilómetros del lugar de aplicación. Se ha detectado

CAPÍTULO 1

en lugares tan lejanos como el aire, el aguanieve y los lagos del Ártico, donde nunca ha sido utilizado. El β -endosulfán es más estable en el aire. En el agua no se disuelve fácilmente tiene una solubilidad muy baja, y una vida media de 35 a 150 días, se considera que presenta un alto potencial para bioacumularse en organismos acuáticos (EXTOXNET, 1996; Harikrishnan y Usha, 2004).

1.2.2.3 CLORPIRIFOS

El CPF (O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato / CAS 2921-88-2) es un plaguicida organofosforado clasificado como Clase II, moderadamente tóxico, de amplio uso en la agricultura. Tiene un peso molecular de 350,62 g y de fórmula molecular: $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ (**Fig. 1.9**) El p.a. es un sólido blanco cristalino, con baja solubilidad en agua (2 mg/l, a 25 °C) pero soluble en la mayoría de los solventes orgánicos. Posee una moderada presión de vapor (2,5 mPa a 25°C) (EXTOXNET, 1996).

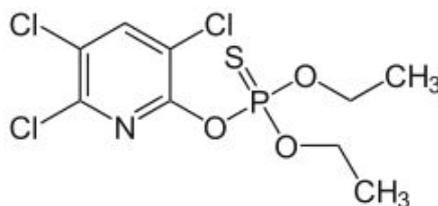


Fig. 1.9 Estructura molecular de Clorpirifos.

El CPF actúa sobre plagas principalmente por contacto, con alguna acción como veneno por vía oral. Afecta principalmente el sistema nervioso a través de la inhibición de la colinesterasa, enzima necesaria para el funcionamiento adecuado de los nervios (EXTOXNET, 1996).

En referencia a la toxicidad de mamíferos se lo ubica en el grupo de los inhibidores de la acetilcolinesterasa, siendo clasificado por su toxicidad aguda oral y dérmica como moderadamente tóxico. El envenenamiento con CPF puede afectar el SNC, el sistema cardiovascular, y el sistema respiratorio. También es un irritante de la piel y de los ojos. Es altamente tóxico para peces, anfibios e invertebrados acuáticos, mientras que en aves, presenta una toxicidad de moderada a muy alta. En mamíferos no presenta un potencial de bioacumulación significativo, pero si ingresa al organismo, una parte se almacena en los tejidos grasos y leche materna. La exposición repetida o prolongada a los organofosforados

CAPÍTULO 1

puede causar los mismos efectos que la exposición aguda incluyendo los síntomas tardíos (EXTOXNET, 1996).

El CPF es moderadamente persistente en suelo, su vida media es por lo general entre 60 y 120 días, pero puede variar entre 2 semanas y más de 1 año, dependiendo del tipo de suelo, clima, el contenido de materia orgánica y otras condiciones. Está sujeto a la degradación por luz UV, hidrólisis química y por microbios del suelo. Cuando se aplica a suelos húmedos, la vida media por volatilidad es de entre 45 a 163 horas. Se adsorbe fuertemente a las partículas del suelo y no es fácilmente soluble en agua. Por lo tanto, es inmóvil en suelos y es poco probable que se filtre para contaminar el agua subterránea. Su principal metabolito es el tricloropiridinol (TCP), se adsorbe débilmente a partículas en el suelo y parece ser moderadamente móvil y persistente. Los datos indican que este insecticida y sus metabolitos del suelo pueden acumularse en ciertos cultivos. La concentración y persistencia en agua pueden variar dependiendo del tipo de formulación. La volatilización es probablemente la principal vía de pérdida de CPF en agua. La vida media por volatilidad es de 3,5 y 20 días. Los residuos permanecen en la superficie de las plantas por aproximadamente 10 a 14 días (EXTOXNET, 1996; Mugni et al., 2012).

1.3 BIOMARCADORES

1.3.1 GENERALIDADES Y CLASIFICACIÓN

El Consejo Nacional de Investigación de Estados Unidos (National Research Council; NRC, 1987) define a los biomarcadores como "indicadores de eventos en sistemas o muestras biológicas", y se describen además como "herramientas que pueden utilizarse para aclarar la relación, si la hay, entre la exposición a xenobióticos y la enfermedad" (Musalli-Galante et al., 2013).

Un biomarcador, bioindicador o biocriterio, se define como una variable bioquímica, fisiológica o anatómica determinable en un organismo, cuya detección y/o magnitud indica la presencia de uno o varios contaminantes (Rodríguez, 2006). En forma general, se podría decir que los biomarcadores son utilizados para detectar una exposición, determinar las consecuencias biológicas de la exposición, detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, identificar a los individuos sensibles de una población y fundamentar la decisión de intervenir desde diferentes ámbitos, tanto a nivel individual como ambiental. Además, pueden poner en evidencia la ocurrencia de una exposición tóxica (a nivel molecular o celular) o de efectos adversos, o comportarse como indicadores de

CAPÍTULO 1

susceptibilidad de un individuo dado o una población ante una exposición (Carballo y Mudry, 2006).

Para la elección de un biomarcador, además de la naturaleza integrativa del impacto de los contaminantes, deben considerarse los siguientes aspectos:

-Especificidad: un biomarcador altamente específico es aquél que responde a un contaminante en particular, y por lo tanto indica inequívocamente su presencia, mientras que un biomarcador que se modifique de igual manera por efecto de una amplia gama de contaminantes es catalogado como inespecífico. Hasta el momento, se han establecido muy pocos biomarcadores de alta especificidad. En una situación intermedia, podría definirse a los biomarcadores relativamente específicos, que sufren cambios ante un grupo de contaminantes con un mecanismo de acción similar.

-Sensibilidad: un biomarcador sensible responderá antes de que se manifiesten efectos deletéreos en el organismo o en la población (tales como un descenso en la tasa de crecimiento o del potencial reproductivo). Esta respuesta temprana de los biomarcadores es esencial para predecir riesgos y definir un sistema biológico de alerta eficiente. En este sentido, resulta también muy útil que el biomarcador elegido muestre una fuerte dependencia tanto de la concentración de los contaminantes como del tiempo de exposición a los mismos, lo cual permitirá una predicción del riesgo poblacional muy precisa.

Los biomarcadores se clasifican en tres categorías: *biomarcadores de exposición, efecto y de susceptibilidad*

-Biomarcador de exposición: señala la presencia de una sustancia exógena o de sus metabolitos, o del producto de una interacción entre un agente xenobiótico con células o moléculas blanco, que puede ser medida en distintos compartimentos del organismo. Estos tipos de biomarcadores también se conocen como "dosímetros biológicos" o biomarcadores de dosis interna, y cuando miden el producto de la interacción con moléculas diana son considerados como "biomarcadores de dosis efectiva biológica" (Carballo y Mudry, 2006; Rodriguez, 2006).

Se obtienen midiendo su concentración en muestras apropiadas tales como orina, suero o sangre. De esta forma algunos marcadores se unen específicamente a moléculas biológicas, como en el caso de aductos de ADN y aductos de hemoglobina, señalando la presencia de la sustancia xenobiótica y su interacción con una macromolécula crítica.

Desde el punto de vista predictivo, los biomarcadores de exposición resultan los mejores para establecer alertas tempranas. Cuanto mayor distancia exista entre el biomarcador de exposición y el efecto deletéreo, mayor será el margen con que se cuenta para intentar

CAPÍTULO 1

remediar o revertir el potencial peligro que entraña la presencia de tal o cual contaminante (Rodríguez, 2006).

-Biomarcador de efecto: es un indicador de alteración bioquímica, fisiológica o genética, resultado de una exposición a un agente xenobiótico, y que dependiendo de su magnitud es reconocido como un daño o una enfermedad potencial o ya establecida (Rodríguez, 2006; Musalli-Galante et al., 2013).

Este tipo de biomarcadores pueden utilizarse con propósitos preventivos y son capaces de detectar respuestas biológicas tempranas. Sirven como señales de advertencia o indicadores tempranos de la enfermedad antes de la aparición de daño irreversible, pueden ser útiles para correlacionar la exposición a mutágenos y carcinógenos potenciales con las etapas iniciales en los procesos de carcinogénesis. Son ejemplos de este tipo los biomarcadores de genotoxicidad: alteraciones genéticas como rupturas de doble (RDC) y simple cadena (RSC), aberraciones cromosómicas (AC), formaciones de micronúcleos, anormalidades nucleares, entre otras alteraciones. Otro ejemplo son los biomarcadores de efecto bioquímico que proporcionan información sobre el daño oxidativo en el ADN y proteínas, alteraciones en una amplia gama de enzimas como las enzimas de reparación del ADN, y las proteínas de unión a metales, entre otros (Carballo y Mudry, 2006; Musalli-Galante et al., 2013).

Otros marcadores tempranos de daño celular son el índice mitótico y la cinética de proliferación celular, considerados como marcadores de citotoxicidad y citostaticidad respectivamente.

-Biomarcador de susceptibilidad: indican que un individuo es particularmente sensible a la exposición a una sustancia xenobiótica específica debido a factores heredados, constitución individual o influencias ambientales (factores inherentes y/o adquiridos) (Rodríguez, 2006; Musalli-Galante et al., 2013).

Dado que los marcadores biológicos pueden ser utilizados para clasificar y cuantificar exposiciones ambientales y efectos relacionados por métodos que pueden ser aplicados en genética toxicológica, cobran importancia los marcadores de genotoxicidad, siendo las moléculas blanco marcadores genéticos que reflejan cambios en su morfología o estructura molecular (Carballo y Mudry, 2006).

1.3.2 BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD

CAPÍTULO 1

Los biomarcadores de genotoxicidad son utilizados para identificar agentes inductores de daño al material genético en células germinales y somáticas. Son caracterizados como *biomarcadores de efecto* y proporcionan una base para la evaluación del riesgo potencial de exposición ambiental a agentes genotóxicos (físicos, químicos y/o biológicos). El área de estudio que utiliza estos marcadores para detectar distintos tipos de alteraciones relevantes para la salud incluyendo micro y macromutaciones, hasta carcinógenos potenciales se denomina Genética Toxicológica y abarca tres grandes sub-áreas (Carballo y Mudry, 2006):

-la *mutagénesis*: incluye a los distintos tipos de daño al material genético (mutación), los cuales pueden ser estables y heredables, y ocurrir en forma directa o indirecta. El agente se denomina mutágeno o clastógeno.

-la *carcinogénesis*: representa cambios irreversibles en una célula (transformación celular) e incluye tres diferentes etapas: iniciación, promoción y progresión. El agente es un carcinógeno.

-la *teratogénesis*: implica el daño inducido sobre el organismo durante su gestación, alteraciones en el embrión durante su desarrollo embrionario o embriogénesis. El agente es un teratógeno.

El diseño experimental en genética toxicológica se realiza en principio sobre la base de la clase y el tipo de agente que se desea evaluar: físico, químico o biológico. En el caso de los agentes químicos, es conveniente considerar su estructura para la elección del modelo experimental más adecuado que permita la óptima caracterización del posible efecto que se desea estudiar.

Existen dos tipos de ensayos para biomonitorio genotóxico: los Ensayos de Corto Plazo – ECP- o *Short Term Test*), y los de Largo Plazo –ELP- o *Long Term Test*. El tiempo que lleva la determinación del efecto adverso definirá si se trata de uno u otro (Carballo y Mudry, 2006):

Los ECP, no superan los tres meses y son frecuentemente utilizados para evaluar riesgo de mutagénesis o teratogénesis, permitiendo una detección rápida de los posibles efectos. Estos ensayos se pueden aplicar en forma secuencial en función de los resultados que se van obteniendo en diferentes ensayos de complejidad creciente, o como parte de una batería de ensayos llevados a cabo en forma simultánea de acuerdo a un diseño experimental previamente establecido. Esta última forma es la utilizada más frecuentemente y la aconsejada a nivel internacional a los fines comparativos.

Los ELP, se aplican para estudiar procesos de carcinogénesis, con un período de seguimiento mayor al anterior (a partir de los noventa días hasta más allá de los 5 años).

CAPÍTULO 1

En general se acepta la existencia de cuatro niveles de evaluación de daño genético en estudios "*in vitro*" e "*in vivo*" (Carballo y Mudry, 2006):

-Nivel primario, también conocido como bacteriano o molecular, permite la detección de mutaciones puntuales valiéndose de la utilización de ensayos en procariotas (ej: test de Ames).

-Nivel secundario o celular, donde se utilizan cultivos de células ya sea en monocapa (líneas celulares como: CHO, Hela, Vera, entre otras) o en suspensión (linfocitos a partir del cultivo de sangre periférica). Incluye como marcadores a la frecuencia de AC, intercambio de cromátides hermanas (ICH), retardo en anafase (RA), test de Micronúcleo (MN), Ensayo cometa (EC), entre otros.

-Nivel terciario, orgánico u orgánico, ensayos *in vivo*, utilizan el organismo entero. Comprenden análisis aplicados en plantas o animales incluyendo el hombre, estudiando los cambios en el organismo como un todo, permitiendo la evaluación de los efectos tanto del compuesto bajo estudio como de sus metabolitos. Se utilizan los mismos tipos de biomarcadores que los propuestos en el nivel secundario con la particularidad que en este caso, luego de ocurrida una exposición *in vivo* inducida experimentalmente.

-Nivel cuaternario o nivel epidemiológico: utiliza los análisis de carácter prospectivo y retrospectivo de poblaciones expuestas ambiental, accidental y ocupacionalmente o como consecuencia de estilos de vida (hábitos, ocupación, entre otros). En las evaluaciones emplea cualquiera de las técnicas mencionadas de los niveles secundario y terciario, siendo para este caso un nivel poblacional, y con un seguimiento a largo plazo.

1.3.2.1 TEST DE MICRONÚCLEOS (MN) Y OTRAS ANORMALIDADES NUCLEARES (ANs)

El test de MN es un ECP ampliamente utilizado en Genética Toxicológica que permite evaluar el potencial clastogénico/aneugénico de una sustancia. Así, en el caso de una evaluación de daño potencial *in vivo/in ovo* pueden utilizarse ensayos correspondientes a los niveles terciario y cuaternario (Mudry y Abrevaya, 2006).

El MN es un indicador indirecto de daño cromosómico, permite detectar los efectos de agentes mutagénicos que modifican la estructura y segregación de los cromosomas. Antes de la división celular, durante la fase S del ciclo celular, el material genético se replica para luego dividirse de manera equitativa y equilibrada en los núcleos de las dos células hijas. Si este proceso es interrumpido o los cromosomas se ven afectados por el ataque de agentes

CAPÍTULO 1

físicos, químicos o biológicos, que promueven disturbios en la maquinaria mitótica y falla en la segregación cromosómica, por lo que segmentos cromosómicos o cromosomas enteros pueden quedar separados del resto del material genético originando un "micronúcleo" o varios por célula, que son claramente reconocibles al microscopio óptico por coloración, tamaño y forma, y por estar cercanos al núcleo principal de la célula hija (Schmid, 1975; Mudry y Abrevaya, 2006).

Según Fenech et al. (2016), los MN se originan a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos y / o cromosomas enteros rezagados que son incapaces de unirse al huso mitótico y, al rodearse de membrana, se convierten en MN. Los fragmentos acéntricos son causados por fallas en la reparación de roturas de cadena de ADN que pueden ser inducidas por sustancias químicas que: (i) dañan el esqueleto fosfodiéster del ADN, y / o (ii) inhiben los mecanismos de respuesta al daño en el ADN o en la reparación de rupturas de cadenas de ADN y / o (iii) por causa de estrés en la replicación debido a la formación de aductos de ADN o por entrecruzamientos (en inglés, *cross-link*). Además, los MN procedentes de cromosomas enteros rezagados pueden ser inducidos por productos químicos que causan defectos en los centrómeros o en la maquinaria mitótica, conduciendo a una segregación inadecuada durante la anafase (**Fig. 1.10**).

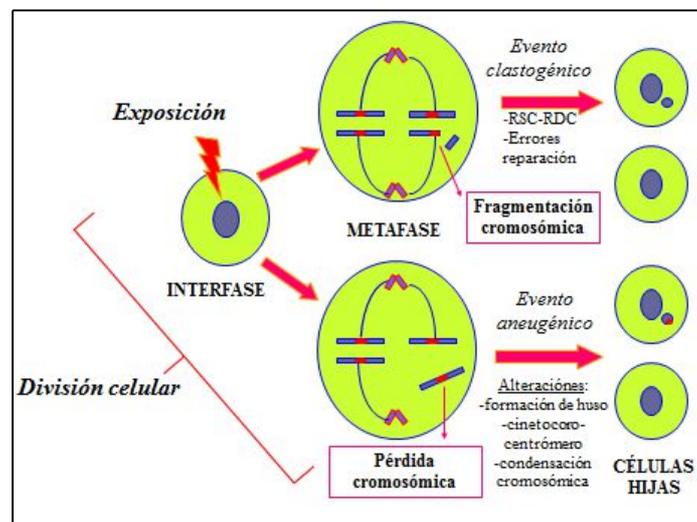


Fig. 1.10 Formación de micronúcleos (MN) por evento clastogénico o aneugénico. RSC: Rotura de simple cadena; RDC: Rotura de doble cadena. Tomado de: Curso de posgrado Toxicología Genética (FBCB/UNL), presentación Dra. Poletta GL, Santa Fe 2012.

La determinación de la frecuencia de MN (FMN) es utilizada como indicador de la acción de diferentes agentes sobre el material genético y la "maquinaria" asociada a la división celular (Schmid, 1975). Tanto los agentes aneugénicos como clastogénicos producen un incremento en la FMN. Los criterios adoptados para la identificación de MN se basan en

CAPÍTULO 1

Schmid (1975) y para eritrocitos de *C. latirostris* son los siguientes (Poletta et al., 2008a): (1) el tamaño del MN debe ser menor que un tercio del tamaño del núcleo principal, (2) el MN no debe solaparse con el núcleo principal y, si está en contacto con éste, los bordes de cada uno deben ser perfectamente distinguibles, y (3) el MN debe poseer el mismo color e intensidad de tinción que el núcleo principal (**Fig. 1.11**).

El análisis de MN es una herramienta valiosa para detectar un nivel de daño genético cuando todavía es reversible, para monitorear e identificar el efecto genotóxico de los contaminantes ambientales, así como para predecir y, probablemente, evitar las consecuencias de la exposición a ellos (Ghisi et al., 2016).

En los últimos años, numerosos estudios han descrito la presencia de otras ANs, y se ha considerado que son inducidas por diversos agentes genotóxicos.

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, 2000). Actualmente, muchas investigaciones incluyen a estas anomalías en las evaluaciones de genotoxicidad como un ensayo complementario al test de MN (Crupkin et al., 2013; Lajmanovich et al., 2014; Pollo et al., 2015; Perez-Iglesias et al., 2016; Schaumburg et al., 2016; Burella et al., 2016; López González et al., 2017).

Algunos autores opinan que estas anomalías morfológicas nucleares serían manifestaciones primarias anteriores a la formación de micronúcleos (Seriani et al., 2011; 2014; Cavas y Ergene-Gözükara, 2005; Pampalona et al., 2010; Fenech et al., 2011; Gökalp Muranlı y Güner, 2011). Las ANs como los *Buds* se originan de puentes nucleoplasmáticos, que pueden ocurrir debido a una mala reparación (*misrepair*) de roturas en el ADN, de las fusiones finales en telómeros, y también, cuando se produce la separación defectuosa de cromátidas hermanas en la anafase. Además, representan el proceso de eliminación de ADN amplificado, de reparación compleja del ADN y, posiblemente, el exceso de cromosomas para células aneuploides (Fenech et al., 2011; Seriani et al., 2011; López González et al., 2017).

Se aplicaron los criterios de identificación (clasificación) de las ANs utilizadas para pez (*Genyonemus lineatus*) según Carrasco et al. (1990) y para humanos en linfocitos de sangre periférica según Fenech (2000) considerando: muescas (MU, en inglés: *notched nuclei*; profundidad apreciable del núcleo que no contiene materiales nucleares, invaginación), brotes nucleares (BN, en inglés: *Buds*; evaginaciones), eritrocitos binucleados (BIN, células

con dos núcleos, en división), y la presencia de núcleos excéntricos (NE) (**Fig. 1.11**). Además, se tomaron en cuenta también las anomalías nucleares totales (ANT).

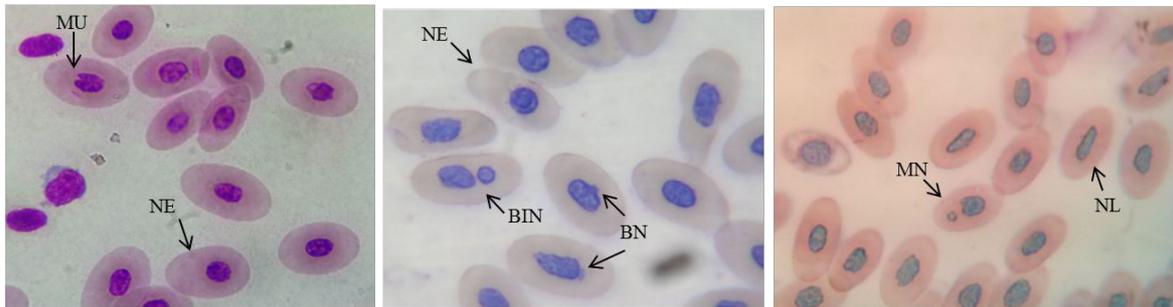


Fig. 1.11 Imágenes de algunas de las anomalías nucleares analizadas en eritrocitos de sangre periférica de *Caiman latirostris*. MN: Micronúcleo; MU: muesca; BN: brote nuclear; BIN: eritrocito binucleado; NL: núcleo lobulado; NE: núcleo excéntrico. 1000x.

1.3.3 DAÑO GENOTÓXICO POR PLAGUICIDAS

La determinación de la genotoxicidad de un agente determinado, requiere de la reunión suficiente de datos muy bien caracterizados mediante una batería de ensayos que detectan el daño al material genético (Carballo y Mudry, 2006). Los agentes genotóxicos actúan directa o indirectamente sobre el material genético (ADN), produciendo efectos detectables a concentraciones subletales. Los plaguicidas formulados que consisten en mezclas de sustancias químicas muy reactivas, actuando como agentes genotóxicos, pueden interactuar directamente con la maquinaria asociada a la molécula de ADN produciendo algún tipo de desequilibrio génico, originar distintos tipos de lesiones y causar cambios estructurales y/o funcionales en los compuestos moleculares de las células vivas, muerte celular y hasta distintas enfermedades de tipo neurodegenerativas (Carballo y Mudry, 2006; Mouchet et al., 2007; da Silva Zacarin, 2014).

La concentración de estos agentes genotóxicos en el ambiente, su vía de entrada y distribución en el organismo, los sistemas metabólicos en los tejidos en los cuales se distribuyen, la reactividad del compuesto y/o sus metabolitos con las moléculas "blanco", especialmente el ADN, la capacidad de la célula para rectificar o amplificar el daño, y la expresión de dicho daño, se encuentran directamente relacionados con la susceptibilidad y la capacidad de reparación o supresión de células anómalas en el organismo, que determinarán en última instancia, el grado de daño genético producido. Dicho daño puede iniciar una cascada de consecuencias biológicas en células específicas, en tejidos u órganos, en el organismo completo (afectando su sobrevivencia o su capacidad reproductiva), o en la población, dependiendo de si el daño ocurre en células somáticas o germinales. Las alteraciones genéticas están asociadas a la reducción del crecimiento

CAPÍTULO 1

corporal, desarrollo anormal, alteración de la tasa reproductiva, alteraciones en los mecanismos de defensa de los animales a los agentes causantes de infecciones, disminución de la sobrevivencia en todos los estados de vida: embriones, neonatos, juveniles y adultos (Carballo y Mudry, 2006).

Una gran variedad de estudios actuales sobre la exposición de organismos vertebrados no mamíferos a plaguicidas, han reportado una asociación positiva entre la exposición a estos químicos y el incremento de daño al material genético (**Fig. 1.12**), tal como la cuantificación por AC estructurales y/o numéricas, ICH, RSC y RDC, formación de MN y otras ANs, formación de aductos al ADN, estrés celular, entre muchos otros (Burlibasa y Gavrilá, 2012; Mostafalou y Abdollahi, 2013; Poletta et al., 2013; Babini et al., 2015; Dar et al., 2015; Lajmanovich et al., 2015; Schaumburg et al., 2016; Vieira et al., 2016).

Por este motivo, el monitoreo genotóxico resulta en una herramienta de gran utilidad para estimar el riesgo de daño genético por la exposición a plaguicidas y mezclas complejas de éstos durante períodos prolongados de tiempo en los ambientes naturales. Implica ver al individuo afectado como un todo y monitorear otras variables de valor diagnóstico, comparar con resultados de otras pruebas, y diagramar una batería mínima de ensayos a fin de caracterizar lo más estrictamente posible el riesgo genotóxico potencial del agente en estudio o mezcla de los mismos.

CAPÍTULO 1

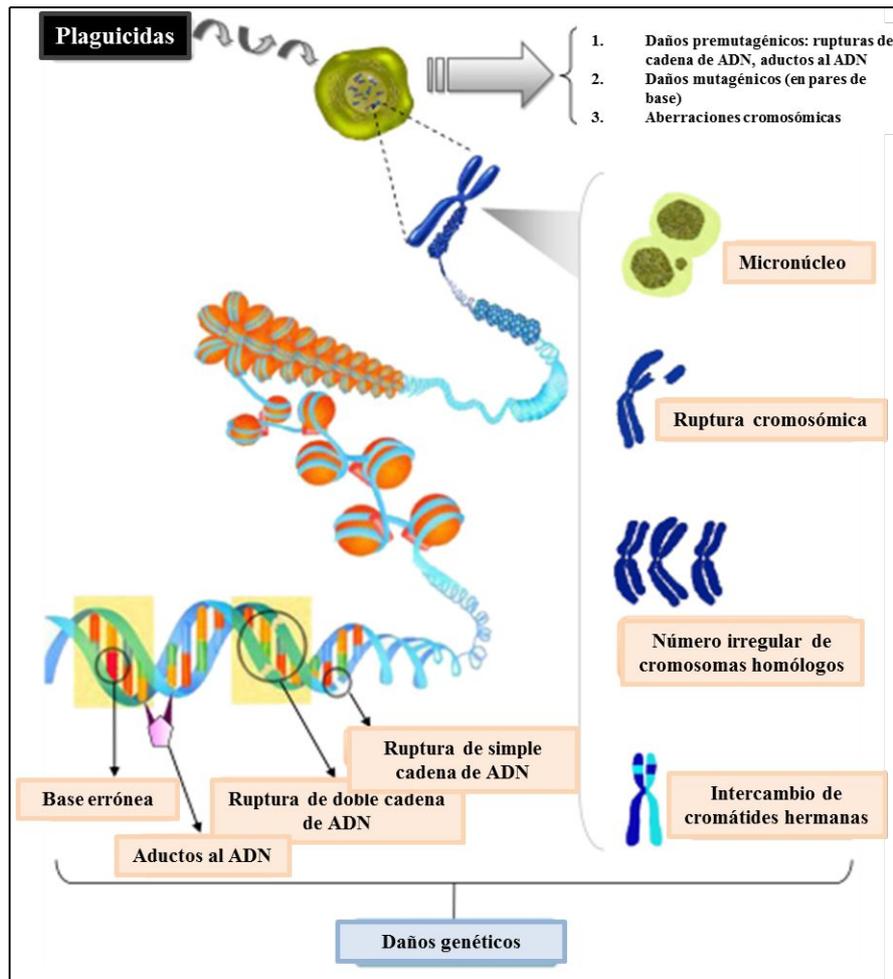


Fig. 1.12 Modelo esquemático de inducción de daño genético, incluyendo los efectos pre-mutagénicos, mutagénicos y cromosómicos por la exposición a plaguicidas. Modificado a partir de: Mostafalou y Abdollahi, 2013.

1.4 *Caiman latirostris*

1.4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El orden Crocodylia comprende 24 especies distribuidas en todo el mundo (CSG, 2016), diez de ellas se encuentran en Latinoamérica y dos especies del género *Caiman* (familia Alligatoridae) habitan en Argentina: *Caiman latirostris* (yacaré overo o ñato) y *C. yacare* (o yacaré negro). Ambas especies se pueden diferenciar basándose en las estructuras craneanas y escutelares entre otras características morfológicas y comportamentales. Generalmente, la existencia de los caimanes está indefectiblemente asociada al agua, aunque a diferencia de la mayoría de los Crocodylia, no son fáciles de observar en los grandes espejos o cursos de aguas limpias. El yacaré overo prefiere ambientes acuáticos de poca profundidad y casi siempre con abundante vegetación, lugares de muy difícil acceso para la mayoría de los predadores, incluido el hombre, y con una gran abundancia de

CAPÍTULO 1

alimento. El tamaño de los adultos para los machos está en el orden de los 2,60 m de longitud y unos 80 kg de peso (**Fig. 1.13**). Registros históricos citan animales de hasta 3,2 m (Larriera et al., 2008). Posee un cuerpo comprimido dorsoventralmente, la cola es musculosa y afilada lateralmente, y su piel es prácticamente impermeable y posee manchas que generan un efecto de camuflaje, lo cual los convierte en buenos nadadores perfectamente adaptados al hábitat donde viven. La ubicación dorsal de sus ojos y narinas les permite además, pasar desapercibidos tanto para potenciales presas como para predadores (Yanosky, 1990).



Fig. 1.13 Ejemplar adulto de *Caiman latirostris* (2 m de longitud aproximadamente). Barra= 10 cm.

En nuestro país, ambas especies habitan en simpatria en gran parte de su distribución, pero el rango de distribución de *C. latirostris* llega más al sur que *C. yacare*, por tener una mayor tolerancia climática y aparece en forma alopátrica en la zona más austral y occidental de la distribución (**Fig. 1.14** y **1.15**). Se ha registrado la presencia de *C. yacare* en Chaco, Corrientes, Formosa y Santa Fe, mientras que la distribución de *C. latirostris* además llega a Entre Ríos, Misiones, Salta y Jujuy. En Santa Fe, *C. latirostris* se distribuye en la llanura de inundación del río Paraná, en la cuenca del río Salado y la cuenca de los Saladillos (Siroski, 2004; Larriera et al., 2008).

CAPÍTULO 1



Fig. 1.14 Mapa de la distribución geográfica de *Caiman latirostris* y *C. yacare* en Argentina (Larriera et al., 2008). Barra = 100 Km.



Fig. 1.15 Distribución geográfica de *Caiman latirostris* y *C. yacare* en Sudamérica (Larriera et al., 2008).

CAPÍTULO 1

Debido a que se trata de una especie ectotérmica que habita regiones templadas, el yacaré overo muestra un ciclo estacional bien definido que depende de factores climáticos como la temperatura ambiente y el régimen hidrológico. En primavera, cuando la temperatura ambiental aumenta, comienzan a alimentarse con mayor frecuencia, hasta llegar al pico máximo de actividad, en el comienzo de la temporada reproductiva (Noviembre-Diciembre). Las hembras una vez fecundadas, construyen los nidos que son montículos de material vegetal, tierra, arena, ramas y deyecciones que actúan como incubadoras naturales por medio del calor del sol y la fermentación vegetal, produciendo una temperatura interior adecuada y relativamente constante (30-32°C) durante toda la incubación. La misma tiene una duración de aproximadamente 70 días a una temperatura promedio de 29-30 °C. Las posturas tienen lugar entre principios de diciembre y mediados de enero, con un promedio de 35 huevos (Larriera e Imhof, 2006). Los neonatos nacen con un tamaño aproximado de 22 cm de largo y un peso promedio de 40 gr. (Larriera et al., 2008).

Los cocodrilianos son uno de los componentes más valiosos de los humedales tropicales, son especies claves ya que mantienen la estructura y funcionamiento del ecosistema con sus actividades. Éstas incluyen la predación selectiva, el reciclado de nutrientes, y la manutención de refugios húmedos durante las sequías (Messel et al., 1995; Ross, 1998).

1.4.2 PROGRAMA DE MONITOREO Y AUTOREPOBLAMIENTO DE CAIMAN LATIROSTRIS CON FINES DE MANEJO

En el año 1990 se inicia en la provincia de Santa Fe, Argentina, un programa de manejo del yacaré overo conocido con el nombre de "Programa de Monitoreo y Autopoblamiento de *Caiman latirostris* con fines de Manejo" (luego "Proyecto Yacaré" -PY- Convenio Gob. de Santa Fe/MUPCN; Larriera, 1990), para la preservación de la especie y la explotación racional de productos de interés comercial.

Este programa está basado en la técnica de "rancheo" (del inglés: *ranching* o cosecha de huevos silvestres para su cría en granjas), que consiste en mantener los reproductores en la naturaleza, tomando sólo los huevos de ambientes naturales para su incubación artificial y retornando al medio silvestre, a los nueve meses de edad aproximadamente, un porcentaje de los animales nacidos y criados en cautiverio. Esta metodología de manejo se fundamenta en el factor crítico que representa la alta mortandad embrionaria y perinatal, evitando la pérdida natural de embriones y neonatos durante su primer año de vida. Como resultado del rancheo, una proporción equivalente o mayor de animales de la que hubiera sobrevivido en condiciones naturales es reintroducida al ecosistema de origen. El excedente es destinado a

CAPÍTULO 1

la obtención de cuero y carne con un enfoque de producción económica ambientalmente sustentable (Larriera, 1998).

Inicialmente, el objetivo del programa fue la recuperación poblacional del yacaré overo que en ese momento se encontraban en peligro de extinción (Larriera e Imhof, 2006). Gracias a la implementación de este programa, se logró una importante recuperación de las poblaciones naturales de *C. latirostris*, de manera que la especie fue transferida en el año 1997 del Apéndice I al II de CITES (Convención Internacional para el Tráfico de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres), permitiendo la comercialización de sus productos, siempre y cuando provinieran de programas de rancheo debidamente habilitados por los organismos de fiscalización en Argentina (Res 283/00, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación) (Larriera, 1998). Desde ese momento, la explotación comercial conservacionista de *C. latirostris* (Ley Provincial 11820; **Anexo I**) se convirtió en una alternativa de máximo interés para la provincia de Santa Fe, produciendo un retorno económico para quienes favorecieran la conservación del humedal. Estos programas involucran activamente a los pobladores locales en la conservación del recurso, ya que conviven con estas especies. Ellos intervienen en las diferentes tareas de desarrollo del programa como: el relevamiento de datos sobre las poblaciones naturales, en la identificación de los nidos, la cosecha de huevos, y la reintroducción de los animales en sus ambientes naturales. Todas estas actividades son compensadas a través de un incentivo económico, por lo que el desarrollo de estos programas no sólo representa un importante aporte a la economía regional sino que además, impacta positivamente sobre la concientización y el compromiso de los pobladores locales en la preservación del recurso y del ecosistema que las contiene. En el momento de la cosecha, los huevos son marcados en la parte superior de la cáscara, a fin de no alterar la posición en la que fueron puestos para no producir daño al embrión, ya que el mismo se fija a la parte superior de la membrana dentro de las 24 hs. después de la postura. Éstos son trasladados en contenedores plásticos con material orgánico proveniente del nido de origen hasta las instalaciones del PY, en la ciudad de Santa Fe, para su incubación artificial (**Fig. 1.16**) y posterior crianza de los pichones en ambientes controlados (temperatura de 30 ± 1 °C; y humedad constante del 95%) (Larriera et al., 2008).

CAPÍTULO 1



Fig. 1.16 Cosecha de huevos de *Caiman latirostris* en un ambiente natural (arriba izquierda) y sala de incubación artificial (35m²; derecha) a temperatura y humedad controladas (31 ± 1 °C y 95%) en instalaciones del Proyecto Yacaré, respetando posición de huevos y material de nido al momento de la cosecha.

Al nacer, los animales son marcados mediante un corte en los verticilos caudales correspondiente a una combinación de cortes que coinciden con el número de nido y año de cosecha, los cuales se relacionan con una serie de datos del lugar de origen, fecha de recolección, ambiente de nidificación, etc. (**Fig. 1.17**).



Fig. 1.17 Individualización en ejemplar de *Caiman latirostris* mediante cortes en verticilos caudales (flechas). Barra= 2 cm.

CAPÍTULO 1

Luego son trasladados a estructuras diseñadas con un sistema climatizado de invernáculos, compuestos de piletones con loza radiante para obtener el mayor crecimiento en el menor tiempo posible, bajo condiciones de crianza intensiva (**Fig. 1.18**), y en el que se suministra temperatura, agua, alimento y limpieza para alcanzar dichos objetivos.



Fig. 1.18 Imagen aérea de los invernáculos acondicionados para crianza de yacarés; zona de cría del "Proyecto Yacaré", Provincia de Santa Fe. Tomado de sitio web-Fb: "Proyecto Yacaré - Santa Fe, Argentina".

La alimentación se provee seis veces por semana *ad libitum* y consiste en una mezcla húmeda compuesta por 60% de cabezas de pollo molida y 40% de balanceado seco diseñado para reptiles (Larriera et al., 2008).

A los diez meses de edad, una fracción de los animales nacidos es reintroducida al lugar donde fueron cosechados los huevos, con un tamaño superior al que hubiesen alcanzado en los ambientes naturales. Esto los hace menos vulnerables a las adversidades climáticas y a los predadores, aumentando así su supervivencia. La fracción restante es destinada a la producción comercial de carne y cuero, sin poner en riesgo las poblaciones naturales de la especie manejada (Larriera, 1998). Para la liberación se respeta el origen de los nidos, es decir, los individuos son reintroducidos en sus ambientes naturales en el mismo sitio donde fueron cosechados los huevos que les dieron origen; esta actividad también es realizada en colaboración con los pobladores locales como parte de la actividad de conservación.

1.4.3 SITUACIÓN ACTUAL DE LA ESPECIE

Actualmente las poblaciones silvestres de *C. latirostris* en Argentina se encuentran recuperadas gracias a los controles internacionales y al estímulo brindado por los programas de uso sustentable. Sin embargo, una de las mayores problemáticas que impacta negativamente sobre estos programas y que, curiosamente, no está relacionada directamente con la caza furtiva ni con la utilización comercial, es la pérdida de hábitat como consecuencia de la fuerte intervención agrícola (Larriera, 2008).

La constante superposición de áreas de distribución natural con áreas de cultivos intensivos, y por ende, las continuas descargas de plaguicidas en cuerpos de agua donde se desarrollan estas especies, podrían impactar, a largo plazo, sobre su dinámica poblacional y su supervivencia en condiciones naturales.

Es indispensable la regulación inmediata de estas prácticas poco sostenibles para mitigar el deterioro de los ecosistemas y preservar los recursos naturales disponibles. La afectación de la tasa reproductiva de esta especie podría poner en juego no sólo los múltiples aspectos positivos logrados sobre los pobladores locales sino también generarían un retroceso/desestabilización poblacional de estas especies y su entorno.

Es necesario evaluar el impacto de los contaminantes en el medio y de este modo poder desarrollar estrategias sobre el uso sostenible de los recursos naturales basados principalmente en controlar los factores que puedan perjudicarlos.

1.4.4 *Caiman latirostris* COMO CENTINELA DE CONTAMINACIÓN POR PLAGUICIDAS

En los últimos años, los organismos centinelas se han convertido en una nueva herramienta para el seguimiento de los efectos biológicos e interacciones que ocurren entre los organismos y los contaminantes, y que actúan como señales de alerta temprana de los efectos de xenobióticos en la vida silvestre (Poletta et al., 2008a). Una especie centinela adecuada debe tener varias de las siguientes propiedades: ser fiel a su sitio; tener amplia distribución geográfica; alta disponibilidad/abundancia; facilidad de manipulación; longevidad; posibilidad de bioacumulación de sustancias tóxicas; estabilidad genética; características biológicas conocidas (Beeby, 2001; Rossi et al., 2015). En base a estas características, los reptiles constituyen excelentes modelos para el examen de sitios contaminados, y aunque su fisiología y ecología ha recibido considerable atención, muchos mecanismos y respuestas toxicológicas subyacentes aún no se han establecido y caracterizado completamente. Como resultado, muchas de las herramientas necesarias

CAPÍTULO 1

para iniciar el estudio de las respuestas y los mecanismos toxicológicos deben ser tomadas como referencia a partir de estudios en otros grupos taxonómicos (Mitchelmore et al., 2005).

Con respecto a la problemática que actualmente atraviesan las poblaciones naturales de *C. latirostris*, y como se desarrolló en la sección anterior (1.4.3), esta especie convive dentro de entornos agrícolas, recibiendo descargas directas de plaguicidas, por lo que, tanto los embriones, como las crías y los adultos, pueden estar expuestos a estos químicos complejos de manera continua (López González et al., 2017). Por este motivo, es necesario determinar el posible efecto de los plaguicidas a corto plazo antes de que el daño producido por estos compuestos sea irreversible para las poblaciones naturales, y por el peligro que actualmente atraviesan.

En estudios previos se ha demostrado que en condiciones de laboratorio, los plaguicidas utilizados en la agricultura predominante actúan negativamente sobre el desarrollo de los yacarés, ejerciendo modificaciones a nivel genético y también en los mecanismos de defensa ya que éstos pueden alterar algunos componentes del sistema inmune, con alteraciones a nivel multiorgánico (Poletta et al., 2009; 2011; 2013; en prensa; Latorre et al., 2013; 2016; López González et al., 2013; 2017; Burella et al., 2016; Siroski et al., 2016). Todas estas variaciones podrían influir en la susceptibilidad de los animales a los agentes causantes de diferentes tipos de infecciones y/o enfermedades, dando origen a un deterioro poblacional de estas especies.

1.5 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.5.1 HIPÓTESIS

"La exposición subcrónica de embriones y crías de *C. latirostris* a formulaciones comerciales de plaguicidas y mezclas complejas utilizadas en agricultura, posee efecto genotóxico, induciendo un incremento en la frecuencia de micronúcleos y de otras anomalías nucleares en eritrocitos de sangre periférica, además de efecto sobre el desarrollo normal de los individuos".

1.5.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar el posible daño genético en *C. latirostris* inducido por formulaciones comerciales de plaguicidas (Endosulfán, Cipermetrina, Clorpirifos y Glifosato) y mezclas complejas de las mismas, utilizadas en las prácticas agrícolas actuales que afectan las zonas de distribución geográfica natural de este reptil.

1.5.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1-Monitorear en condiciones experimentales, el efecto de formulaciones plaguicidas a base de los insecticidas Cipermetrina, Clorpirifos, Endosulfán, y del herbicida Glifosato, así como sus mezclas complejas, sobre el desarrollo pre y posnatal de *C. latirostris*.

2-Evaluar el potencial efecto genotóxico de los insecticidas Cipermetrina, Clorpirifos, Endosulfán, y del herbicida Glifosato y la mezcla, presentes en los ambientes naturales de *C. latirostris* mediante el test de Micronúcleo (MN) y otras anomalías nucleares (ANs).

3-Transmitir la información obtenida a la comunidad científica y a nuestra sociedad para favorecer el perfeccionamiento de las estrategias de conservación, manejo y concientización en el uso sustentable de ésta y otras especies de fauna silvestre y en animales domésticos que habitan en áreas circundantes a cultivos donde se aplican los plaguicidas en estudio.

CAPÍTULO 2

Evaluación del efecto genotóxico de formulaciones comerciales de Cipermetrina, Clorpirifos, Endosulfán y Glifosato en embriones de *Caiman latirostris* (Etapa 1)

2.1 INTRODUCCIÓN

La embriotoxicología o toxicología del desarrollo se define en su sentido más amplio, como el estudio o conjunto de estudios destinados a analizar todo efecto que interfiera en el desarrollo normal de un individuo, tanto antes como después del nacimiento. Incluye parámetros como reducción del peso corporal, retraso en el desarrollo y crecimiento posterior, toxicidad en órganos, muerte, abortos, defectos estructurales (teratogénicos), defectos funcionales, senescencia reproductiva temprana, acortamiento de la vida media, y el inicio de una enfermedad latente en adultos, como es el cáncer (IPCS, 2001).

El embrión en desarrollo es susceptible a la modulación por las condiciones ambientales, mostrando gran plasticidad. La exposición a sustancias tóxicas durante etapas críticas del desarrollo puede tener consecuencias graves y permanentes, lo cual puede afectar significativamente la supervivencia, crecimiento, y desarrollo de los organismos durante sus primeros estadios, o bien el daño puede manifestarse mucho más tarde durante otras etapas de la vida del mismo (Muller et al., 2007; Hamlin y Guillette, 2011). Este pueden implicar interacciones del agente exógeno con receptores endógenos, generación de intermediarios reactivos que reaccionan con el ADN o con proteínas, peroxidación lipídica, inhibición de enzimas, alteraciones de la membrana celular, entre otros tipos de daño (US RNC, 2000). La gravedad de la respuesta puede ser modulada por la tasa de absorción, el metabolismo, el momento en el cual se produce la exposición y la presencia de mezclas químicas, entre otros factores.

Los embriones de los reptiles están expuestos a los contaminantes a través de dos mecanismos principales: la transferencia materna durante la vitelogénesis o a través de los poros de la cáscara del huevo durante la incubación, por medio del material de nidificación, sustrato, agua o aire (Hopkins, 2005; Charruau et al., 2013; de Solla et al., 2014). Las membranas del huevo son permeables al agua y a los gases y por lo tanto existe un riesgo de entrada de contaminantes en formas volátiles o solubles hacia el interior, y de posterior asimilación por el embrión (Ortiz-Santaliestra y Egea-Serrano 2013).

La mayor parte de lo que se conoce sobre la exposición embrionaria a contaminantes en reptiles, es a través de estudios de residuos en cáscara de huevos, pero la ruta real de exposición generalmente no es identificada. En muchos casos, la transferencia materna es probablemente la vía más importante de exposición, algunos compuestos pueden ser bioacumulables y concentrarse en folículos y huevos antes del desove,

CAPÍTULO 2

existiendo, por lo tanto, un gran potencial de ser transferidos a la descendencia, lo cual puede afectar significativamente la supervivencia, crecimiento, y desarrollo de los mismos durante sus primeros estadios (Hopkin, 2005; Ortiz-Santaliestra y Egea-Serrano 2013). En el caso de *C. latirostris*, al igual que la mayoría de los cocodrilianos, la textura porosa de la cáscara de huevo permite el intercambio de sustancias líquidas y gaseosas entre el medio externo y el embrión durante el desarrollo. La parte superior es la zona de implantación del embrión, donde se inicia la banda opaca de calcificación, es zona de mayor irrigación y de poros más grandes, en la que se produce el mayor intercambio con el ambiente (Ferguson, 1981).

Se ha reportado que la estructura de la cáscara de los huevos del yacaré overo sufre modificaciones durante el transcurso de la incubación. Según Simoncini et al. (2014), la descomposición de la materia orgánica del nido genera un ambiente propicio para el desarrollo de diversos microorganismos que contribuyen a la modificación de la cáscara bajo condiciones naturales. El material orgánico de nidificación, más la humedad de las deyecciones de la hembra, y las precipitaciones ambientales, aumentaría el tamaño de los canales de los poros, incrementando el intercambio de distintas sustancias gaseosas y líquidas entre el embrión y el medio exterior, razón por la cual, cualquier tipo de compuesto pueda atravesarla (de Solla et al., 2014; Burella et al., 2016).

Numerosos estudios de laboratorio han reportado efectos de la exposición *in ovo* por topicación en diferentes reptiles y aves (Marco et al., 2004; Milnes et al., 2005; Sparling et al., 2006; Beldoménico et al., 2007; Muller et al., 2007; Poletta 2009; Uggini et al., 2010; Burella et al., 2016; Latorre et al., 2016; Schaumburg et al., 2016; López González et al., 2017) y también a través de pulverizaciones y/o aplicaciones sobre el material de nido (Cañas y Anderson, 2002; Mayne et al., 2005; Poletta et al., 2011; de Sola et al., 2014), tratando de simular exposiciones a diferentes compuestos derivados de las prácticas agrícolas.

Una de las principales causas de variabilidad ampliamente estudiada en parámetros analizados en especies de cocodrilianos, es el *efecto nido*. Este término fue definido por Verdade (1997) como la influencia de la carga genética y fenotípica transmitida por los reproductores al embrión y al contenido del huevo, asociado también a la influencia del entorno de incubación de los huevos. Así, las crías procedentes de distintos nidos de origen pueden mostrar posteriormente, diferencias en la respuesta frente a la exposición de condiciones ambientales variables (Webb et al., 1992).

CAPÍTULO 2

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

Por lo tanto, es necesario determinar en condiciones controladas, cuáles son los niveles de daño sobre el material genético producidos por formulaciones plaguicidas durante los períodos más críticos del desarrollo de *C. latirostris*, el estadio embrionario, para comprender el efecto real en las poblaciones naturales ambientalmente expuestas a estos compuestos.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue evaluado íntegramente y aprobado por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina (Acta N ° 04-12).

2.2.1 COMPUESTOS QUÍMICOS

Las formulaciones comerciales de plaguicidas utilizadas para este estudio fueron: (1) Roundup® Full II (RU; 66,2% p.a.), CAS No. 70901-12-1; (2) PanzerGold® (PANZ; 60,2% p.a.), CAS No. 1071-83-6; (3) Cipermetrina Atanor® (CIP; 25% p.a.), CAS No. 52315-07-8; (4) Endosulfán Galgofan® (END; 35% p.a.), CAS No. 115-29-7; y (5) Clorpirifos Lorsban 48E® (CPF; 48% p.a.), CAS No. 2921-88-2 (EXTOXNET, 1996).

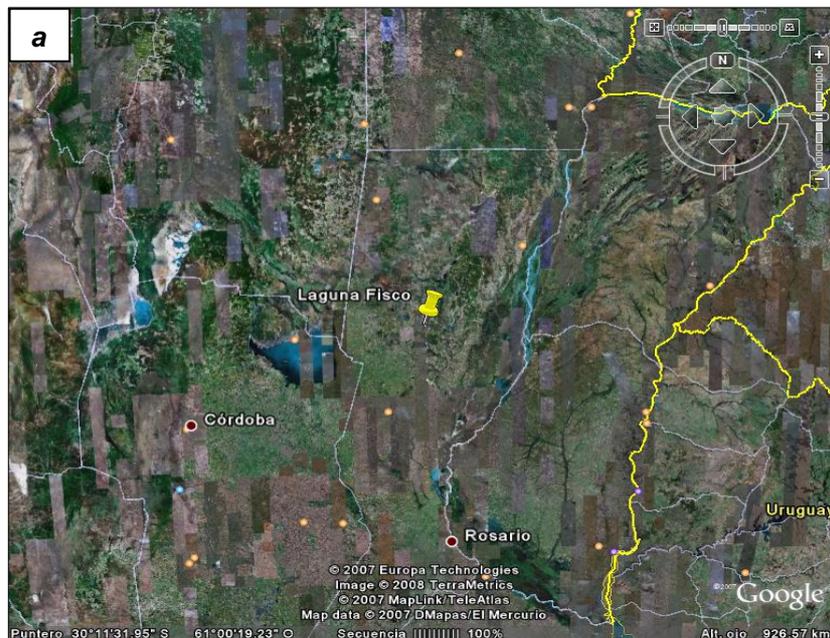
Debido a su baja solubilidad en agua, para END, CIP y CPF se utilizó etanol (C₂H₆O) como vehículo, incluyéndose un control vehículo (CV), además del control negativo correspondiente, para evaluar si producía algún efecto sobre los embriones.

La Ciclofosfamida [C₆H₄ (OCOCH₃) COOH, Fluka], CAS 6055-19-2, un agente alquilante indirecto conocido como sustancia genotóxica, se utilizó como control positivo (CP) en base a experimentos previos en la especie (Poletta et al., 2009).

2.2.2 HUEVOS DE *Caiman latirostris*

Se utilizaron huevos de *C. latirostris* cosechados en la naturaleza, en el marco de las actividades del programa de rancheo: "Proyecto Yacaré" (PY; convenio Gob. Santa Fe - MMA/MUPCN). Los nidos fueron recolectados de la Reserva Natural Manejada "El Fisco" ($30^{\circ}11'26''\text{S}$, $61^{\circ}0'27''\text{O}$; Dpto. San Cristóbal, Santa Fe, Argentina), Área Natural Protegida (Ley 12.930, 2008) que posee una extensión aproximada de 1800 ha. (**Fig. 2.1**). Este área fue seleccionada debido a que pertenece a la distribución natural de la especie y al hecho de que no se desarrollan en la misma actividades agrícolas y/o urbanas que sean fuente de contaminación. Por otra parte, toda el área lindante al Fisco es una zona ganadera donde no existen cultivos extensivos tratados con plaguicidas, por lo que el riesgo de contaminación por escorrentía, lixiviado o deriva es prácticamente nulo, lo cual asegura que los huevos no están expuestos ambientalmente a ningún xenobiótico previo al inicio de los ensayos experimentales. Este área ha sido empleada previamente como sitio control en diversos estudios de evaluación del efecto de plaguicidas realizados en la especie (Poletta et al., 2008a; 2009; 2011; Latorre et al., 2013; López González et al., 2013; 2017).

Los huevos cosechados se transportaron a las instalaciones del PY, Laboratorio de Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados (FHUC-UNL / MMA-MUPCN, Santa Fe), bajo procedimientos de rutina (Larriera e Imhof, 2006).



CAPÍTULO 2



Fig. 2.1 a) Imagen satelital de la Reserva Natural Manejada “El Fisco” (30°11'26"S, 61°0'27"O; Dpto. San Cristóbal, centro-norte de la provincia de Santa Fe, Argentina), Área Natural Protegida (Ley 12.930, 2008); **b)** Imagen de la laguna principal (“Laguna Fisco”), donde se colectan los huevos de *Caiman latirostris*. Tomada de Google Earth.

2.2.3 ENSAYOS DE EXPOSICIÓN EMBRIONARIA (*in ovo*)

Todos los huevos utilizados en los experimentos, fueron colectados dentro de los 4 días luego de su postura y, una vez en las instalaciones del PY, la viabilidad de los mismos fue determinada a través del análisis de la banda opaca de calcificación de la cáscara del huevo por ovoscopia: translucencia (Donayo et al., 2002). Para controlar el efecto nido, se emplearon huevos provenientes de diferentes nidos (Verdade, 1997).

La exposición de los huevos al contaminante se realizó en una única aplicación al inicio de la etapa embrionaria, dentro de 5 días siguientes a la postura, y teniendo en cuenta que el período del año de máxima aplicación de plaguicidas en áreas de distribución de la especie coincide con la temporada reproductiva de la misma (Poletta et al., 2009), como se desarrolló en el apartado 1.4.3.

Cada grupo experimental se colocó por separado en bandejas plásticas, utilizando vermiculita estéril como sustrato y cubriéndolos con material vegetal de nido (Larriera et al., 2008), proveniente de la zona control.

Posteriormente, todos los huevos se incubaron bajo condiciones controladas de temperatura ($31,5 \pm 0,5$ °C) y humedad (95%), en la sala de incubación artificial del PY, y se controlaron periódicamente con el fin de identificar y descartar aquellos que se tornaban no viables.

A medida que los pichones estuvieron listos para nacer, comenzaban a “llamar” con un sonido característico dentro de los huevos, los mismos fueron retirados de la incubadora y, cuando la eclosión no se produjo de manera espontánea durante las siguientes 24 hs., fueron asistidos en el nacimiento (Larriera et al., 2008). Si luego de

CAPÍTULO 2

72 hs. de nacido el primer neonato de un nido aún permanecían pichones de ese nido sin eclosionar, se abrieron los huevos y los pichones viables se ayudaron a nacer.

Una vez nacidos, los neonatos se individualizaron a través de cortes en los verticilos caudales, como se describió en el apartado **1.4.2**, correspondientes al número del nido y a la marca individual de cada pichón según orden de nacimiento.

2.2.3.1 EXPOSICIÓN EMBRIONARIA POR TOPICACIÓN (SOBRE LA CÁSCARA DEL HUEVO)

En estos ensayos se evaluó el efecto de formulaciones comerciales plaguicidas a base de CIP, CPF, END y GLI sobre el desarrollo prenatal de *C. latirostris*, mediante la exposición de embriones a los contaminantes por topicación, al inicio de la etapa embrionaria. Se cosecharon los huevos al inicio de la temporada reproductiva, como fue descrito previamente (**2.2.2**). Una vez en las instalaciones del PY, se realizaron ovoscopías para determinar la viabilidad de los huevos a utilizar.

Todas las soluciones de plaguicidas y soluciones control fueron aplicadas por topicación sobre la cáscara del huevo, en la zona de implantación del embrión, donde se inicia la banda opaca de calcificación, siguiendo el procedimiento descrito por Poletta et al. (2009; **Fig. 2.2**).



Fig. 2.2. Imagen de topicación de las soluciones sobre la cáscara del huevo de *Caiman latirostris* (volumen final aplicado 50 μ l).

CAPÍTULO 2

Las concentraciones aplicadas para estos ensayos fueron elegidas en base a concentraciones de referencia disponibles en la bibliografía y adaptadas al peso promedio de los huevos de *C. latirostris*, calculado en 70 g aproximadamente (Poletta et al., 2009). Para las formulaciones de GLI, se aplicaron concentraciones determinadas como efectivas de efecto genotóxico, en un estudio previo realizado en la especie con la formulación RU, por nuestro grupo de trabajo (Poletta et al., 2009). Para las formulaciones de END y CIP se tomaron como referencia antecedentes de otros estudios realizados en huevos de *C. latirostris* (END: Beldoménico et al., 2007) y en otras especies como aves y mamíferos (END: Sinha et al., 1997; CIP: Anwar et al., 2003; Patel et al., 2006), cubriéndose un rango amplio de concentraciones (1-1000 µg/huevo). En lo que respecta a la formulación de CPF no existían datos de dosis de referencia expresados por peso vivo, solo estudios en peces o renacuajos expuestos por inmersión (Widder et al., 2006; Ruiz de Arcaute et al., 2012; Vera-Candiotti et al., 2013; Paracampo et al., 2014) por lo que se decidió aplicar el mismo rango de concentraciones que para END y CIP.

Todas las soluciones de testeo y controles fueron aplicadas por topicación, en un volumen final de 50 µl.

Con el objetivo de evaluar la reproducibilidad de los resultados obtenidos en diferentes ensayos, cada uno se repitió en la temporada siguiente, por lo que se llevaron a cabo 4 ensayos de exposición embrionaria por topicación: en los ensayos de exposición embrionaria 1 y 2 (EEE1 y EEE2) se evaluaron las formulaciones de CIP, END y GLI, mientras que en los EEE3 y EEE4 se evaluó la formulación de CPF. En cada caso, la repetición de ensayos se realizó con diferencias menores que se detallan a continuación.

2.2.3.1.1 ENSAYOS DE EXPOSICIÓN EMBRIONARIA POR TOPICACIÓN A LAS FORMULACIONES COMERCIALES DE CIPERMETRINA, ENDOSULFÁN Y GLIFOSATO

Ensayo 1 (EEE1): Se evaluaron dos formulaciones del herbicida GLI: la formulación RU y la formulación PANZ a concentraciones de 500, 750 y 1000 µg/huevo, además de las formulaciones de los insecticidas CIP y END a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg/huevo. También se incluyeron los siguientes controles: negativo (CN: con agua destilada), vehículo (CV: con etanol) y positivo (CP: con Ciclofosfamida).

CAPÍTULO 2

Los huevos provenientes de 6 nidos (34 huevos de cada uno) cosechados de la Reserva Natural Manejada "El Fisco" (2.2.2), con un peso promedio de $69,82 \pm 4,89$ (g), fueron distribuidos en forma equitativa en 17 grupos experimentales de 12 huevos cada uno (6 en cada duplicado; N total= 204). En la **Tabla 2.1** se muestran los grupos experimentales y tratamientos aplicados en cada caso.

Luego de la topicación, los huevos fueron incubados en condiciones controladas, y una vez nacidos los pichones se tomaron muestras de sangre y se registraron las variables como se detalla luego en los apartados 2.2.4 y 2.2.5.

Tabla 2.1 Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el primer ensayo de exposición embrionaria de *Caiman latirostris* por topicación (EEE1) a las formulaciones comerciales de Cipermetrina, Endosulfán y Glifosato

Grupos experimentales	Compuestos	Concentraciones	N° huevos/nido	N
CN	Agua destilada	50 µl / huevo	2	12
CV	Etanol	50 µl / huevo	2	12
CP	Ciclofosfamida	700 µg / huevo	2	12
END1	Galgofan®, 35% p.a.	1 µg / huevo	2	12
END10		10 µg / huevo	2	12
END100		100 µg / huevo	2	12
END1000		1000 µg / huevo	2	12
CIP1	Atanor®, 25% p.a.	1 µg / huevo	2	12
CIP10		10 µg / huevo	2	12
CIP100		100 µg / huevo	2	12
CIP1000		1000 µg / huevo	2	12
RU500	Roundup®Full II, 66,2% p.a.	500 µg / huevo	2	12
RU750		750 µg / huevo	2	12
RU1000		1000 µg / huevo	2	12
PANZ500	PanzerGold®, 60,2% p.a.	500 µg / huevo	2	12
PANZ750		750 µg / huevo	2	12
PANZ1000		1000 µg / huevo	2	12

CN: Control negativo; CV: Control vehículo; CP: control positivo tratado con Ciclofosfamida (700 µg / huevo); END 1, 10, 100 y 1000 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de formulación de Endosulfan Galgofan®; CIP 1, 10, 100 y 1000 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de formulación de Cipermetrina Atanor®; RU 500, 750 y 1000 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®; PANZ 500, 750 y 1000 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Glifosato PanzerGold®; p.a.: principio activo; N° huevos/nido: número de huevos expuestos de cada nido por grupo experimental; N: número total de huevos por grupo de experimentación.

CAPÍTULO 2

Ensayo 2 (EEE2): Este ensayo corresponde a la repetición del EEE1 con la única diferencia de que en este caso, sólo se incluyó la formulación del herbicida a base de GLI RU, ya que no nos fue posible conseguir nuevamente la formulación PANZ.

Se utilizaron 112 huevos provenientes de 4 nidos (28 huevos de cada uno), cosechados de la Reserva Natural Manejada "El Fisco" (2.2.2), con un peso promedio de $64,98 \pm 4,26$ (g), se distribuyeron equitativamente en 14 grupos experimentales compuestos por 8 huevos (4 en cada duplicado; **Tabla 2.2**).

Tabla 2.2 Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el segundo ensayo de exposición embrionaria de *Caiman latirostris* por topicación (EEE2) a las formulaciones comerciales de Cipermetrina, Endosulfán y Glifosato

Grupos experimentales	Compuestos	Concentraciones	N° huevos/nido	N
CN	Agua destilada	50 µl / huevo	2	8
CV	Etanol	50 µl / huevo	2	8
CP	Ciclofosfamida	700 µg / huevo	2	8
END1	Galgofan®, 35% p.a.	1 µg / huevo	2	8
END10		10 µg / huevo	2	8
END100		100 µg / huevo	2	8
END1000		1000 µg / huevo	2	8
CIP1	Atanor®, 25% p.a.	1 µg / huevo	2	8
CIP10		10 µg / huevo	2	8
CIP100		100 µg / huevo	2	8
CIP1000		1000 µg / huevo	2	8
RU500	Roundup®Full II, 66,2% p.a.	500 µg / huevo	2	8
RU750		750 µg / huevo	2	8
RU1000		1000 µg / huevo	2	8

CN: Control negativo; CV: Control vehículo; CP: control positivo tratado con Ciclofosfamida (700 µg / huevo); END 1, 10, 100 y 1000 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Endosulfan Galgofan®; CIP 1, 10, 100 y 1000 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor® y RU 500, 750 y 1000 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones la formulación de Glifosato Roundup Full II®; p.a.: principio activo. N° huevos/nido: número de huevos expuestos de cada nido por grupo experimental; N: número total de huevos por grupo de experimentación.

Para este ensayo se analizaron las mismas variables que en primer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE1) con la diferencia de que en el caso del crecimiento se realizó el seguimiento de los individuos hasta los 6 meses de edad para

CAPÍTULO 2

evaluar el efecto de la exposición sobre el crecimiento postnatal (a los 3 y 6 meses de edad).

2.2.3.1.2. ENSAYOS DE EXPOSICIÓN EMBRIONARIA POR TOPICACIÓN A LA FORMULACIÓN COMERCIAL DE CLORPIRIFOS

Ensayo 3 (EEE3): El ensayo de exposición embrionaria a la formulación de CPF se realizó bajo las mismas condiciones de experimentación que los ensayos anteriormente desarrollados. Como particularidad en este ensayo puede mencionarse la no inclusión de un CP, con el fin de disminuir la cantidad de individuos a exponer, ya que en EEE1 y EEE2, ya se habían corroborado los resultados observados en estudios previos realizados por nuestro grupo (Poletta et al., 2009).

Este ensayo incluyó un N total de 72 huevos, provenientes de 3 nidos (24 huevos de cada uno), distribuidos equitativamente en 6 grupos experimentales de 12 huevos cada uno (6 en cada duplicado). En la **Tabla 2.3** se detallan los grupos experimentales y las concentraciones aplicadas para cada tratamiento.

Tabla 2.3 Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el tercer ensayo de exposición embrionaria de *Caiman latirostris* por topicación (EEE3) a la formulación comercial de Clorpirifos

Grupos experimentales	Compuestos	Concentraciones	N° huevos/nido	N
CN	Agua destilada	50 µl / huevo	4	12
CV	Etanol	50 µl / huevo	4	12
CPF1	Lorsban 48E®, 48% p.a.	1 µg / huevo	4	12
CPF10		10 µg / huevo	4	12
CPF100		100 µg / huevo	4	12
CPF1000		1000 µg / huevo	4	12

CN: Control negativo; CV: Control vehículo; CPF 1, 10, 100 y 1000 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®; p.a.: principio activo; N° huevos/nido: número de huevos expuestos de cada nido por grupo experimental; N: número total de huevos por grupo de experimentación.

Ensayo 4 (EEE4): Este ensayo es la repetición de EEE3 donde se redujo el número de concentraciones de la formulación de CPF a 2, y se mantuvo solo el CV (con etanol) como control negativo, habiéndose demostrado ya en los ensayos de exposición embrionaria por topicación anteriores que el mismo no genera daño genotóxico, por su comparación con el CN.

CAPÍTULO 2

Este experimental incluyó, por lo tanto, 3 grupos de experimentación con 12 huevos cada uno (6 en cada duplicado), con un total de 36 huevos provenientes de 3 nidos (12 huevos de cada uno), distribuidos equitativamente en los 3 grupos experimentales (**Tabla 2.4**).

Se repitió la metodología de topicación, incubación y toma de muestra que los ensayos anteriormente descritos.

Tabla 2.4 Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el cuarto ensayo de exposición embrionaria de *Caiman latirostris* por topicación (EEE4) a la formulación comercial de Clorpirifos

Grupos experimentales	Compuestos	Concentraciones	N° huevos/nido	N
CV	Etanol	50 µl /huevo	12	12
CPF10	Lorsban 48E®, 48% p.a.	10 µg / huevo	12	12
CPF100		100 µg / huevo	12	12

CV: Control vehículo; CPF 10 y 100 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®; p.a.: principio activo; N° huevos/nido: número de huevos expuestos de cada nido por grupo experimental; N: número total de huevos por grupo de experimentación.

2.2.3.2. EXPOSICIÓN EMBRIONARIA POR PULVERIZACIÓN (SOBRE MATERIAL DE NIDO)

Con el objeto de evaluar otra metodología de exposición de los embriones que se asemeje más a la posible exposición que se da en este estadio en los ambientes naturales, se realizó un ensayo de exposición embrionaria de yacaré overo mediante la "pulverización" de los plaguicidas sobre el material de nido.

El experimento se realizó bajo las mismas condiciones de incubación que los ensayos de topicación y tomando como referencia un estudio de pulverización sobre nidos ya reportados en la especie por nuestro grupo de trabajo (Poletta et al., 2011).

Se utilizaron 84 huevos (N total), provenientes 3 nidos (utilizando 28 huevos cada uno), colectados de la Reserva Natural Manejada "El Fisco". La cosecha, traslado y selección de los mismos para el experimento se realizaron en iguales condiciones que las descritas anteriormente en **2.2.2** (Larriera e Imhof, 2006; Poletta et al., 2008a). Los huevos de cada nido fueron distribuidos equitativamente en 7 grupos de experimentación de 12 huevos cada uno (6 en cada duplicado), dentro de bandejas plásticas con vermiculita estéril como sustrato (Larriera et al., 2008; **Fig. 2.3**), cubiertos

CAPÍTULO 2

por el material de nido proveniente de la zona control, a ser pulverizado con las respectivas formulaciones a testear.

Se consideraron para este experimento las concentraciones recomendadas para su aplicación en cultivos de soja RR (c.c. 0,8%, 0,12% y 2%) y la mitad de las mismas (1/2 c.c.), de los siguientes formulados comerciales: los insecticidas CPF (Lorsban®, 48% p.a.) y CIP (Atanor®, 25% p.a.), y el herbicida GLI (RoundupFull II® -RU, 66,2% p.a.), tomando como referencia la superficie de base de las bandejas de experimentación como área a pulverizar (0,0340 m²).



Fig. 2.3 Imagen de la aplicación de las soluciones a evaluar por pulverización sobre el material de nido de *Caiman latirostris*

Los grupos experimentales consistieron en: CN, rociado con agua potable declorada (3,5 ml); dos grupos experimentales de la formulación comercial de CPF: CPF 1/2 c.c. (0,4 %) y CPF c.c. (0,8 %); dos grupos experimentales de la formulación comercial de CIP: CIP 1/2 c.c. (0,06 %) y CIP c.c. (0,12 %); dos grupos experimentales de la formulación comercial RU (GLI): GLI 1/2 c.c. (1%) y GLI c.c. (2%). Debido a la aplicación de los compuestos en forma de pulverización, no fue necesaria la utilización de un vehículo para los grupos expuestos a CPF y CIP (**Tabla 2.5**).

CAPÍTULO 2

Tabla 2.5 Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el ensayo de exposición embrionaria de *Caiman latirostris* por pulverización (sobre el material de nido) a las formulaciones comerciales de Cipermetrina, Clorpirifos y Glifosato

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

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

Durante la experimentación, los huevos fueron incubados en iguales condiciones que las descritas en los ensayos previos (2.2.3.1).

Al momento del nacimiento se procedió con la asistencia a los pichones, toma de muestras de sangre periférica y evaluaciones de efectos sobre el desarrollo: malformaciones, tamaño al nacer y análisis de anomalías nucleares como biomarcadores de genotoxicidad, tal como se detalla a continuación (2.2.4 y 2.2.5).

2.2.4 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron por punción de la vena espinal (Zippel et al., 2003). Se aplicó la técnica descrita por Myburgh et al. (2014) en condiciones de asepsia, que consiste en la punción entre la 1° y 2° vértebra cervical, ubicadas a nivel de las escamas postoccipitales. La punción se realizó con jeringa estéril de 3 ml previamente heparinizada y aguja TERUMO® 25G x 5/8" – (0,5 mm), para extraer 0,5 ml de sangre entera de cada ejemplar (Fig. 2.4).



Fig. 2.4 Extracción de sangre de la vena espinal en neonato de *Caiman latirostris*, siguiendo la técnica de Myburgh et al. (2014).

2.2.5 VARIABLES REGISTRADAS

En todos los ensayos se registraron las siguientes variables: éxito de eclosión de cada grupo experimental (cantidad de neonatos nacidos del total de huevos expuestos por grupo experimental), existencia de malformaciones externas en los neonatos, tamaño de los pichones al nacer (y seguimiento del crecimiento posterior en el caso del segundo ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE2), y diferentes anomalías nucleares como biomarcadores de genotoxicidad. Para el test de MN se utilizó la técnica descrita por Poletta et al. (2008a) en eritrocitos de sangre periférica de *C. latirostris*. Las otras ANs se analizaron según Carrasco et al. (1990) y Fenech (2000), adaptadas a eritrocitos de yacaré overo por López González et al. (2017), como se desarrolló en el Capítulo 1, apartado 1.3.2.1. Para el análisis de estos marcadores se realizaron 2 extendidos sobre portaobjetos por cada muestra, se fijaron con etanol durante 10 min y se dejaron secar al aire, luego se tiñeron con Giemsa (al 10%, diluido en agua estabilizada) por 15 min. Por cada muestra, se analizaron 1000 eritrocitos (Poletta et al., 2008a) bajo microscopio óptico Nikon Eclipse E200 con una magnificación de 1000x; y se determinó la frecuencia de MN y de otras AN (FMN y FANs): número de células con MN u otras AN/1000 eritrocitos contabilizados). En el primer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE1) se consideraron las siguientes ANs: BN o evaginaciones nucleares (en inglés: *Buds*), MU (en inglés: *notched nuclei*), núcleos vacuolados (NV), núcleos lobulados (NL), núcleos bilobulados

CAPÍTULO 2

(o con forma de ocho, en inglés: *blebbeds* -BIL), eritrocitos binucleados (BIN), núcleos excéntricos (NE) y anomalías nucleares totales (ANT, sin incluir MN). En los ensayos de exposición embrionaria posteriores, sólo se analizaron las ANs mayormente observadas en EEE1: BN, MU, BIN, NE y, la sumatoria de las mismas, ANT.

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

2.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS 17.0 para Windows.

Las diferencias entre los duplicados de cada grupo experimental se analizaron mediante test *t*. La normalidad de las variables fue corroborada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene. Los valores de la media \pm error estándar (EE) se calcularon por grupo experimental.

Según se comprobaron o no los supuestos, se utilizaron test paramétricos (ANOVA y Dunnett o Tukey) o no paramétricos (Kruskal-Wallis y Mann-Whitney U-test) para comparar los diferentes grupos en función de las distintas variables analizadas, considerando en todos los casos los tratamientos y los nidos como variables de agrupamiento. En el caso de la comparación entre grupos experimentales, aquellos expuestos a las formulaciones de CIP, END y CPF se contrastaron con el CV, mientras que los expuestos a formulaciones de GLI con el CN, excepto en el ensayo de pulverización donde no se utilizó CV ya que los compuestos se aplicaron por aspersión. En el segundo ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE2), el análisis de crecimiento se llevó a cabo mediante un Modelo Lineal General: medidas repetidas, ya que se contaba con 3 mediciones de peso y longitud (nacimiento, 3 y 6

CAPÍTULO 2

meses de edad). La existencia de relaciones concentración-efecto entre la FMN o FANs y el tamaño de los animales, se determinaron mediante Regresiones lineales simples.

Se consideró estadísticamente significativa una diferencia de $p \leq 0,05$, excepto cuando se aplicó la corrección de Bonferroni (comparación entre nidos), en la que el valor p depende del número de análisis de a pares realizado (informado en cada caso).

2.3 RESULTADOS

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los duplicados de los grupos experimentales para ninguna de las variables analizadas de cada uno de los ensayos ($p > 0,05$), de manera que todos los resultados se informan por grupo experimental (media \pm EE).

El éxito de eclosión no fue estadísticamente diferente entre los grupos experimentales de cada ensayo de topicación y pulverización ($p > 0,05$), ni se registraron malformaciones externas en los pichones nacidos.

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

En el primer ensayo (EEE1) se observó una FMN significativamente mayor en todos los grupos expuestos a plaguicidas y al CP, comparados con el CN o el CV según correspondía ($p < 0,01$). Los resultados de la FMN y las distintas categorías de ANs analizadas por cada grupo experimental, se detallan en la **Tabla 2.6** y **Fig. 2.5**.

CAPÍTULO 2

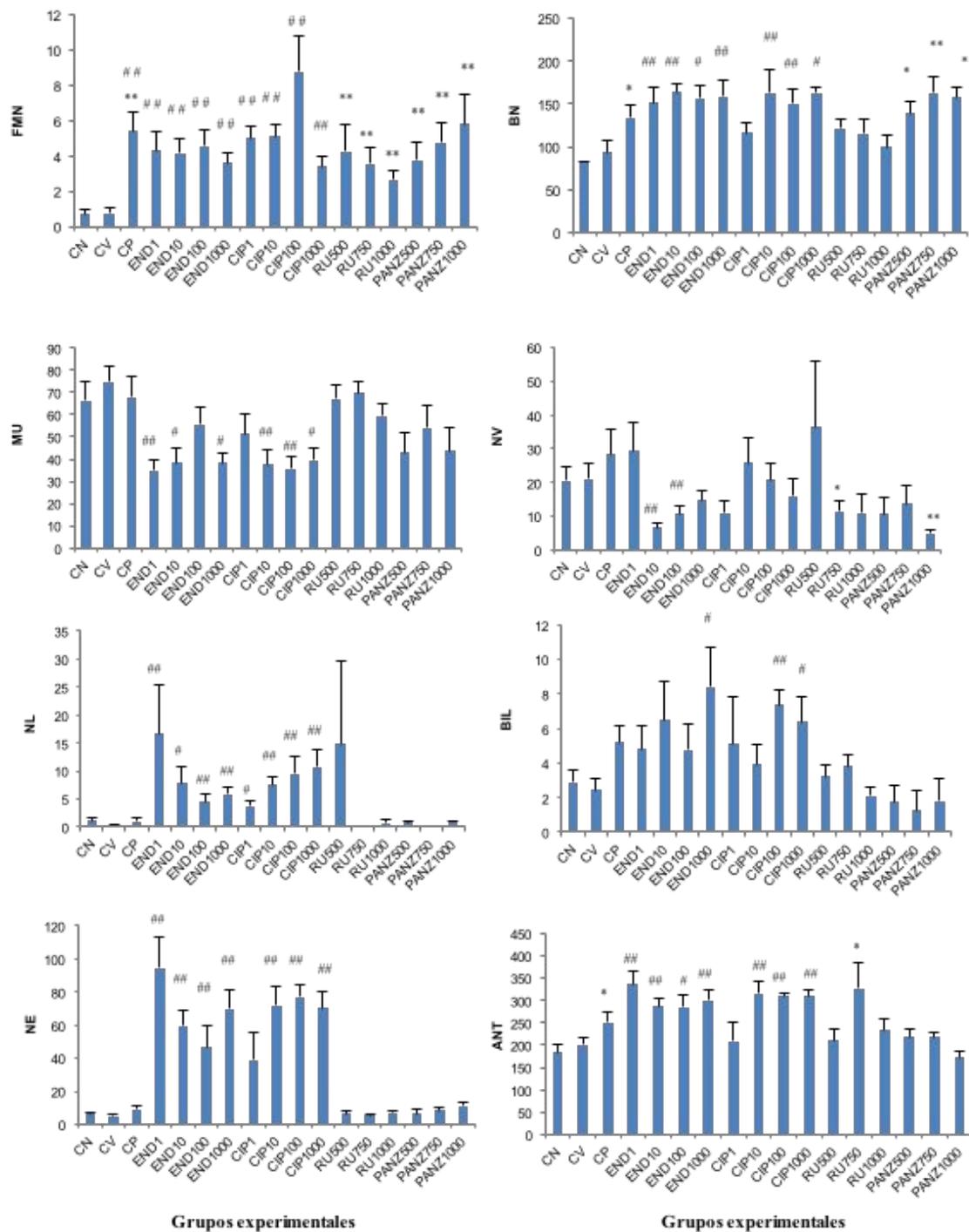


Fig. 2.5 Frecuencia de micronúcleos (FMN) y de otras anomalías nucleares observados en eritrocitos de *Caiman latirostris* en los diferentes grupos experimentales del primer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE1). CN: control negativo; CV: control vehiculo; CP: control positivo tratado con Ciclofosfamida (700 µg/huevo); END 1, 10, 100 y 1000 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; CIP 1, 10, 100 y 1000 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; RU 500, 750 y 1000 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®; PANZ 500, 750 y 1000 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Glifosato PanzerGold®. BN: brotes nucleares; MU: muescas; NV: núcleos vacuolados; NL: núcleos lobulados; BIL: núcleos bilobulados; NE: núcleos excéntricos y ANT: anomalías nucleares totales. * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$: estadísticamente significativo respecto al CN y # $p < 0,05$ / ## $p < 0,01$: estadísticamente significativo, comparado con el CV (test de Mann-Whitney para todas las variables excepto MU: ANOVA/Dunnett).

CAPÍTULO 2

Sin embargo, en el segundo ensayo de exposición embrionaria por topicación de los compuestos sobre la cáscara del huevo (EEE2), se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa sólo en la FMN, en los grupos expuestos a END10 ($p = 0,005$) y CIP 100 ($p = 0,019$), en comparación con el CV (**Fig. 2.6**).

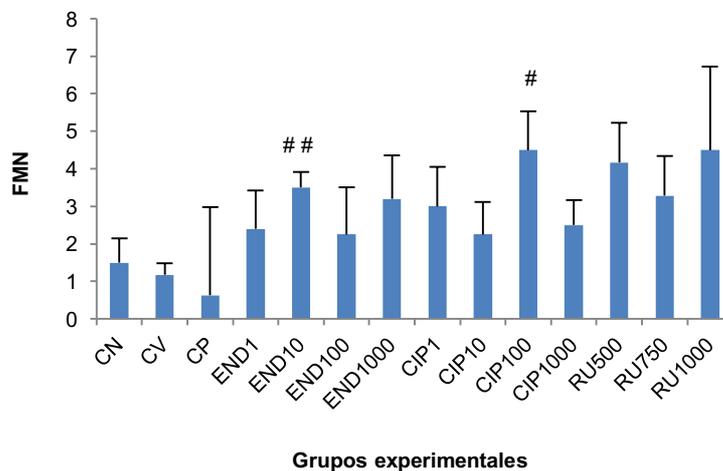


Fig. 2.6 Frecuencia de micronúcleos (FMN) observados en eritrocitos de *Caiman latirostris* en los diferentes grupos experimentales del segundo ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE2). CN: control negativo; CV: control vehículo; CP: control positivo tratado con Ciclofosfamida (700 $\mu\text{g}/\text{huevo}$); END 1, 10, 100 y 1000 ($\mu\text{g}/\text{huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones de Endosulfán Galgofan®; CIP 1, 10, 100 y 1000 ($\mu\text{g}/\text{huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones de Cipermetrina Atanor®; RU 500, 750 y 1000 ($\mu\text{g}/\text{huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones de Glifosato (Roundup Full II®). # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$: significativamente diferente respecto al CV (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney).

En **Tabla 2.7** se muestran los valores de medias y EE de las frecuencias de cada AN (excepto MN) evaluada en el EEE2, en todos los grupos experimentales ($p > 0,05$; ANOVA).

CAPÍTULO 2

Tabla 2.7 Frecuencia de cada categoría de anomalía nuclear (media \pm EE) observadas en eritrocitos de *Caiman latirostris* en los diferentes grupos experimentales del segundo ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE2)

Grupos experimentales	BN	MU	BIN	NE	ANT
CN	105,25 \pm 7,04	37,50 \pm 7,23	2,25 \pm 0,95	68,25 \pm 8,34	213,25 \pm 19,15
CV	101,67 \pm 10,05	30,17 \pm 5,00	1,00 \pm 0,45	61,17 \pm 8,24	194,00 \pm 19,26
CP	116,67 \pm 11,30	38,83 \pm 6,06	2,00 \pm 0,68	66,67 \pm 10,83	224,27 \pm 23,08
END1	98,00 \pm 12,36	29,00 \pm 3,36	1,40 \pm 0,75	55,80 \pm 10,02	184,29 \pm 19,35
END10	105,00 \pm 9,23	29,12 \pm 3,80	1,00 \pm 0,33	70,37 \pm 9,45	205,5 \pm 18,82
END100	103,25 \pm 6,96	34,25 \pm 5,57	1,25 \pm 0,48	55,50 \pm 15,90	194,25 \pm 27,38
END1000	104,80 \pm 8,64	38,60 \pm 5,65	1,20 \pm 0,58	72,00 \pm 13,01	216,60 \pm 23,71
CIP1	92,80 \pm 15,36	29,80 \pm 7,49	1,40 \pm 0,40	50,60 \pm 15,53	174,60 \pm 31,28
CIP10	114,25 \pm 15,38	32,12 \pm 6,72	1,12 \pm 0,40	59,00 \pm 9,19	206,50 \pm 26,65
CIP100	105,75 \pm 17,98	24,50 \pm 7,51	1,75 \pm 0,73	46,50 \pm 5,56	178,50 \pm 29,97
CIP1000	94,00 \pm 14,49	31,83 \pm 4,85	0,83 \pm 0,31	63,67 \pm 9,83	190,33 \pm 24,82
RU500	122,17 \pm 11,90	32,00 \pm 3,99	0,67 \pm 0,21	61,33 \pm 8,67	216,17 \pm 13,06
RU750	120,57 \pm 11,43	40,57 \pm 8,69	1,00 \pm 0,65	59,00 \pm 6,60	221,14 \pm 21,52
RU1000	92,75 \pm 9,00	28,50 \pm 5,68	2,00 \pm 0,41	71,50 \pm 7,27	194,25 \pm 20,50

CN: control negativo; CV: control vehículo; CP: control positivo tratado con Ciclofosfamida (700 μ g/huevo); END 1, 10, 100 y 1000 (μ g/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de Endosulfán (Galgofan®); CIP 1, 10, 100 y 1000 (μ g/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de Cipermetrina (Atanor®); RU 500, 750 y 1000 (μ g/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones la formulación de Glifosato Roundup Full II®.

BN: brotes nucleares

MU: muescas

BIN: eritrocitos binucleados

NE: núcleos excéntricos

ANT: anomalías nucleares totales

Respecto a los resultados obtenidos del tercer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE3), se evidenció un aumento en la FMN en CPF1 ($p = 0,036$) y CPF10 ($p = 0,05$), respecto al CV. Sin embargo, al compararse con el CN, se registraron diferencias significativas para todas las concentraciones de CPF evaluadas (CPF1: $p=0,002$; CPF10: $p=0,001$; CPF100: $p=0,023$; CPF1000: $p=0,004$), aún cuando no hubo diferencias entre el CN y el CV (**Fig. 2.7**).

CAPÍTULO 2

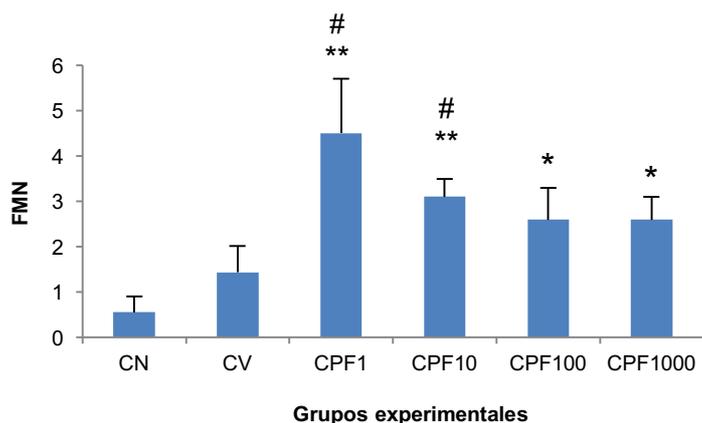


Fig. 2.7 Frecuencia de micronúcleos (FMN) en los diferentes grupos experimentales del tercer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE3). CN: control negativo; CV: control vehículo; CPF1, 10, 100 y 1000 ($\mu\text{g}/\text{huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®. ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$, respecto al CN; y # $p < 0,05$, respecto al CV (Mann-Whitney U-test).

Por el contrario, para las otras ANs analizadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles ($p > 0,05$; ANOVA/Dunnett). En **Tabla 2.8** se indican los resultados de la frecuencia de cada AN observada por grupo experimental.

Tabla 2.8 Frecuencia (media \pm EE) de anomalías nucleares (excepto MN) observadas en eritrocitos de *Caiman latirostris* en los distintos grupos experimentales del tercer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE3)

Grupos experimentales	BN	MU	BIN	NE	ANT
CN	104,6 \pm 16,80	24,67 \pm 5,90	0,78 \pm 0,43	74,11 \pm 7,73	178,67 \pm 15,08
CV	106,44 \pm 8,73	25,55 \pm 3,78	1,44 \pm 0,44	60,33 \pm 5,89	166,78 \pm 13,14
CPF1	97,50 \pm 9,61	23,17 \pm 7,05	2,00 \pm 1,00	79,50 \pm 15,62	177,00 \pm 13,20
CPF10	89,75 \pm 10,38	19,37 \pm 4,13	1,37 \pm 0,50	95,62 \pm 13,17	185,37 \pm 17,96
CPF100	89,86 \pm 7,83	23,57 \pm 2,89	2,00 \pm 0,76	94,57 \pm 17,92	184,43 \pm 23,92
CPF1000	107,12 \pm 14,52	31,25 \pm 6,29	1,87 \pm 0,69	64,87 \pm 6,43	172,00 \pm 15,97

CN: control negativo; CV: control vehículo; CPF1, 10, 100 y 1000 ($\mu\text{g}/\text{huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®.

BN: brotes nucleares

MU: muescas

BIN: eritrocitos binucleados

NE: núcleos excéntricos

ANT: anomalías nucleares totales

Por último, para el ensayo 4 (EEE4), se visualizó una diferencia significativa para la FMN en CPF 100, respecto al CV ($p = 0,028$; **Fig. 2.8**), pero no en las otras ANs ($p > 0,05$). Dichos resultados se informan como la media \pm el EE por grupo experimental (CV, CPF 10 y 100) (**Tabla 2.9**).

CAPÍTULO 2

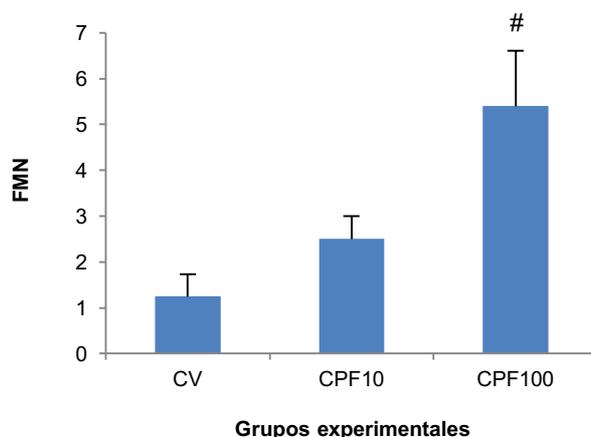


Fig. 2.8 Frecuencia de micronúcleos (FMN) en los diferentes grupos experimentales del cuarto ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE4). CV: control vehículo; CPF10 y 100 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®. # $p < 0,05$, respecto al CV (ANOVA/Dunnett).

Tabla 2.9 Frecuencia de cada anomalía nuclear (media ± EE; excepto MN) observadas en eritrocitos de *Caiman latirostris* en los distintos grupos experimentales del cuarto ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE4)

Grupos experimentales	BN	MU	BIN	NE	ANT
CV	99,25 ± 7,60	54,25 ± 4,90	1,25 ± 0,95	58,50 ± 14,25	214,50 ± 23,84
CPF10	127,00 ± 5,00	54,50 ± 9,50	1,50 ± 0,50	54,50 ± 10,50	240,00 ± 26,00
CPF100	133,80 ± 15,57	56,60 ± 6,97	2,80 ± 1,16	56,00 ± 10,68	5,40 ± 1,21

CV: control vehículo; CPF10 y 100 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®.

BN: brotes nucleares

MU: muescas

BIN: eritrocitos binucleados

NE: núcleos excéntricos

ANT: anomalías nucleares totales

En cuanto a los resultados sobre el *efecto nido* que se examinaron para todas las variables observadas, se encontraron diferencias entre nidos en el primer ensayo (EEE1), para la FMN (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney, aplicando corrección de Bonferroni con un $p \leq 0,003$), en MU y ANT ($p < 0,05$; ANOVA/Tukey). En el segundo ensayo (EEE2), también se obtuvieron diferencias entre nidos en la FMN y en las MU (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney, aplicando corrección de Bonferroni con un valor $p \leq 0,008$), en BN, NE y ANT ($p \leq 0,01$; ANOVA/Tukey). Por su parte, en el EEE3 se encontraron diferencias entre los nidos para: BN, BIN y MU ($p < 0,05$; ANOVA/Tukey). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre nidos para ninguna de las variables de genotoxicidad del EEE4 ($p > 0,05$; ANOVA/Tukey).

CAPÍTULO 2

En lo que refiere al tamaño de los animales al nacer, en EEE1 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de experimentación ($p > 0,05$; **Tabla 2.10**), pero sí se observó una diferencia de peso al nacer entre nidos ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis/Mann-Whitney; aplicándose la corrección de Bonferroni ($p=0,003$)).

Tabla 2.10 Parámetros de tamaño corporal (media \pm EE) en neonatos de *Caiman latirostris* en los distintos grupos experimentales del primer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE1)

Grupos experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
CN	21,08 \pm 2,35	10,08 \pm 1,12	44,09 \pm 1,25
CV	23,02 \pm 0,24	10,81 \pm 1,12	44,45 \pm 10,02
CP	20,48 \pm 0,59	9,92 \pm 1,24	43,33 \pm 0,89
END1	21,11 \pm 2,36	9,99 \pm 1,12	39,53 \pm 4,51
END10	23,49 \pm 0,24	10,06 \pm 1,11	44,76 \pm 1,32
END100	22,42 \pm 1,16	12,21 \pm 1,03	44,77 \pm 0,79
END1000	23,39 \pm 0,14	11,32 \pm 0,07	44,47 \pm 0,50
CIP1	23,45 \pm 0,18	11,16 \pm 0,18	44,86 \pm 1,41
CIP10	23,39 \pm 0,16	11,09 \pm 0,10	43,95 \pm 1,01
CIP100	23,42 \pm 0,19	11,04 \pm 0,09	44,30 \pm 0,47
CIP1000	23,17 \pm 0,23	11,10 \pm 0,10	44,52 \pm 0,93
RU500	22,55 \pm 0,55	10,87 \pm 0,22	42,32 \pm 1,21
RU750	23,55 \pm 0,54	11,15 \pm 0,26	44,42 \pm 0,98
RU1000	23,52 \pm 0,29	11,44 \pm 0,07	46,58 \pm 0,96
PANZ500	23,44 \pm 0,26	11,23 \pm 0,11	45,45 \pm 0,62
PANZ750	23,27 \pm 0,12	11,11 \pm 0,07	44,47 \pm 0,86
PANZ1000	20,66 \pm 2,30	9,91 \pm 1,10	44,18 \pm 0,80

CN: control negativo; CV: control vehículo; CP: control positivo tratado con Ciclofosfamida (700 $\mu\text{g/huevo}$); END 1, 10, 100 y 1000 ($\mu\text{g/huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones de Endosulfán Galgofan®; CIP 1, 10, 100 y 1000 ($\mu\text{g/huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones de Cipermetrina Atanor®; RU 500, 750 y 1000 ($\mu\text{g/huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones la formulación de Glifosato Roundup Full II®; PANZ 500, 750 y 1000 ($\mu\text{g/huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones la formulación de Glifosato PanzerGold®. $p > 0,05$; ANOVA/Tukey.

LT: longitud total

LHC: longitud hocico-cloaca

cm: centímetro

g: gramo

En el segundo ensayo (EEE2) tampoco se observaron diferencias entre los grupos en peso y longitud (LTy LHC) al momento del nacimiento, ni a los 3 o 6 meses posteriores al nacimiento ($p > 0,05$; **Tabla 2.11**). Por este motivo, se decidió no continuar con el

CAPÍTULO 2

seguimiento de los parámetros del crecimiento luego del nacimiento, teniéndose en cuenta sólo el tamaño al nacer en los ensayos posteriores.

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

Tabla 2.11 Parámetros del crecimiento (media \pm EE) observados al nacer, a los 3 y 6 meses de edad en *Caiman latirostris*, en los distintos grupos experimentales del segundo ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE2)

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

CN: control negativo; CV: control vehículo; CP: control positivo tratado con Ciclofosfamida (700 μ g/huevo); END 1, 10, 100 y 1000 (μ g/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de Endosulfán Galgofan®; CIP 1, 10, 100 y 1000 (μ g/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de Cipermetrina Atanor®; RU 500, 750 y 1000 (μ g/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®. $p > 0,05$ / Modelo Lineal General: Medidas Repetidas.

LT: longitud total

LHC: longitud hocico-cloaca

cm: centímetro

g: gramo

Para los dos ensayos de evaluación de la formulación de CPF (EEE3 y EEE4), no se observaron diferencias en el tamaño de los pichones al nacer entre los grupos expuestos y CN o CV (ANOVA/Tukey-Dunnnett; **Tabla 2.12** y **Tabla 2.13**), pero sí entre los nidos: en EEE3 para la LT, LHC y peso ($p < 0,01$) y en el EEE4 para la LT y el peso ($p < 0,01$).

CAPÍTULO 2

Tabla 2.12 Parámetros de tamaño corporal al nacer (media \pm EE) en *Caiman latirostris* observados en los distintos grupos experimentales del tercer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE3)

Grupos experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
CN	23,37 \pm 0,28	11,30 \pm 0,13	45,24 \pm 1,23
CV	23,02 \pm 0,64	11,14 \pm 0,07	44,28 \pm 0,98
CPF1	23,53 \pm 0,43	11,02 \pm 0,18	45,50 \pm 1,30
CPF10	23,22 \pm 0,44	11,29 \pm 0,10	44,49 \pm 0,98
CPF100	22,94 \pm 0,66	10,89 \pm 0,26	43,56 \pm 1,53
CPF1000	22,92 \pm 0,38	10,96 \pm 0,18	42,56 \pm 1,11

CV: control vehículo; CPF: 1, 10, 100 y 1000 (μ g/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®. $p > 0,05$; ANOVA/Tukey

LT: longitud total

LHC: longitud hocico-cloaca

cm: centímetro

g: gramo

Tabla 2.13 Parámetros de tamaño corporal al nacer (media \pm EE) en *Caiman latirostris* observados en los distintos grupos experimentales del cuarto ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE4)

Grupos experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
CV	23,37 \pm 0,13	11,25 \pm 0,32	46,25 \pm 0,63
CPF10	24,75 \pm 1,25	11,10 \pm 0,19	51,00 \pm 6,00
CPF100	23,40 \pm 0,40	11,50 \pm 0,00	48,40 \pm 2,62

CV: control vehículo; CPF: 10 y 100 (μ g/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®. $p > 0,05$; ANOVA/Dunnnett.

LT: longitud total

LHC: longitud hocico-cloaca

cm: centímetro

g: gramo

En cuanto a la relación de los biomarcadores de genotoxicidad (FMN y FANs), con los parámetros de crecimiento, no obtuvimos diferencias significativas para ninguno de los ensayos de exposición embrionaria ($p > 0,05$).

Por su parte, los análisis de relaciones concentración-efecto para la FMN y de cada ANs analizada, mostraron un efecto dependiente de la concentración del primer ensayo (EEE1), en la FMN, los BN y NV para la formulación PANZ. En el caso de la FMN y de los BN la relación fue positiva moderada ($R^2 = 0,5263$ y $R^2 = 0,4384$ / $p < 0,001$; **Fig. 2.9** y **2.10**, respectivamente), mientras que para los NV la relación fue débil ($R^2 = 0,268$ / $p = 0,01$). No obstante, se obtuvo un mejor ajuste de los datos, al realizar el análisis con los valores de las medias para FMN ($R^2 = 0,9883$; $p = 0,006$) y BN ($R^2 = 0,8931$; $p = 0,05$) (**Fig. 2.9** y **2.10**, respectivamente).

CAPÍTULO 2

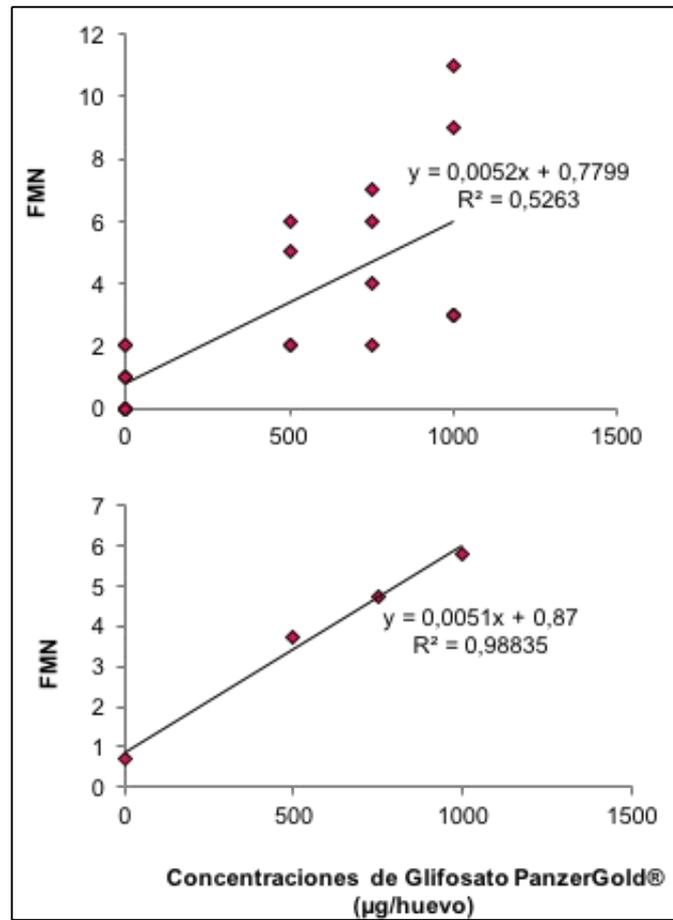


Fig. 2.9 Relación concentración-efecto: Frecuencia de micronúcleos (FMN) en eritrocitos de *Caiman latirostris* - formulación comercial de Glifosato PanzerGold® (500, 750 y 1000 µg/huevo). Primer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE1). *Regresión lineal simple* (datos completos: $R^2 = 0,5263$; $p < 0,001$ / medias: $R^2 = 0,9883$; $p < 0,01$).

CAPÍTULO 2

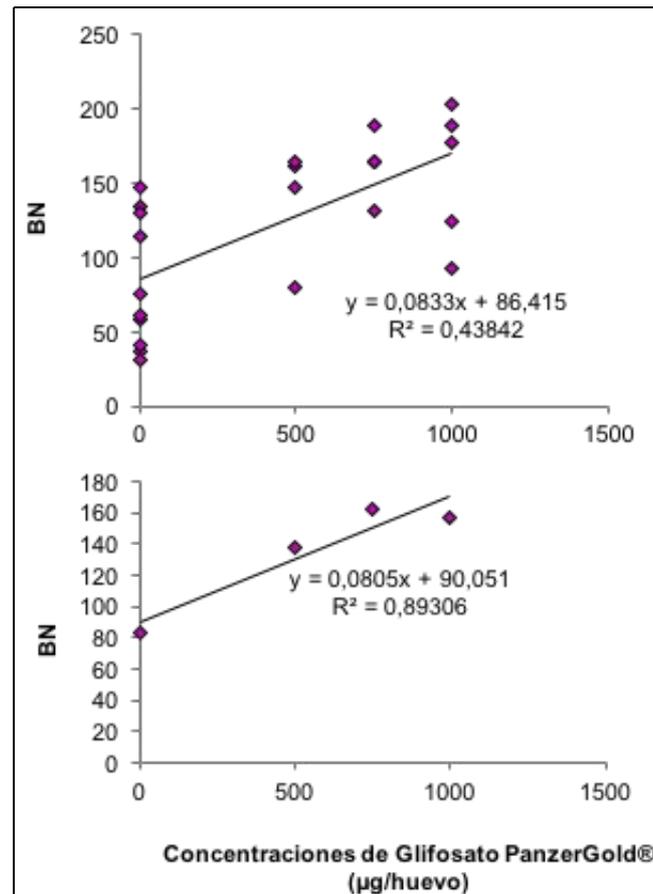


Fig. 2.10 Relación concentración-efecto: brotes nucleares (BN) en eritrocitos de *Caiman latirostris* -formulación de Glifosato PanzerGold® (500, 750 y 1000 µg/huevo). Primer ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE1). Regresión lineal simple (datos completos: $R^2 = 0,4384$; $p < 0,001$ / medias: $R^2 = 0,8931$; $p = 0,05$).

En lo que respecta al segundo ensayo (EEE2) y tercer ensayo (EEE3), no se observó efecto dependiente de la concentración en ninguno de los biomarcadores de genotoxicidad (FMN y FANs), para ninguna de las formulaciones testeadas.

Respecto al último ensayo (EEE4), los resultados indicaron una relación positiva moderada de la FMN con las concentraciones de CPF (datos totales: $R^2 = 0,5391$; $p = 0,01$; **Fig. 2.11**), mientras que al realizar el análisis con los valores de las medias la relación no fue significativa ($R^2 = 0,9577$; $p = 0,132$), probablemente debido al bajo número de puntos de ajuste.

CAPÍTULO 2

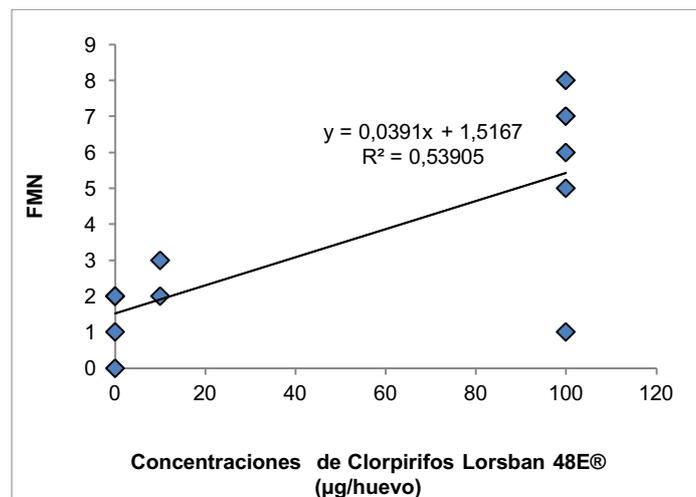


Fig. 2.11 Relación concentración-efecto: Frecuencia de micronúcleos (FMN) en eritrocitos de *Caiman latirostris* -formulación comercial de Clorpirifos Lorsban 48E® (10 y 100 µg/huevo). Cuarto ensayo de exposición embrionaria por topicación (EEE4). *Regresión lineal simple* ($R^2 = 0,5391$; $p = 0,01$).

En relación al ensayo de Pulverización sobre el material de nido, los resultados también indicaron diferencias significativas en la FMN, a las concentraciones de CIP 1/2 c.c. ($p = 0,002$); GLI (RU) c.c. ($p = 0,014$) y 1/2 c.c. ($p = 0,023$), comparados con el grupo CN ($p < 0,05$). De las ANs testeadas, solamente encontramos diferencias significativas respecto al CN en los BIN, en el grupo expuesto a GLI (RU) 1/2 c.c. ($p = 0,006$) (**Fig. 2.12**). En la **Tabla 2.14** se muestran los valores de las medias y EE de las demás ANs contabilizadas ($p > 0,05$).

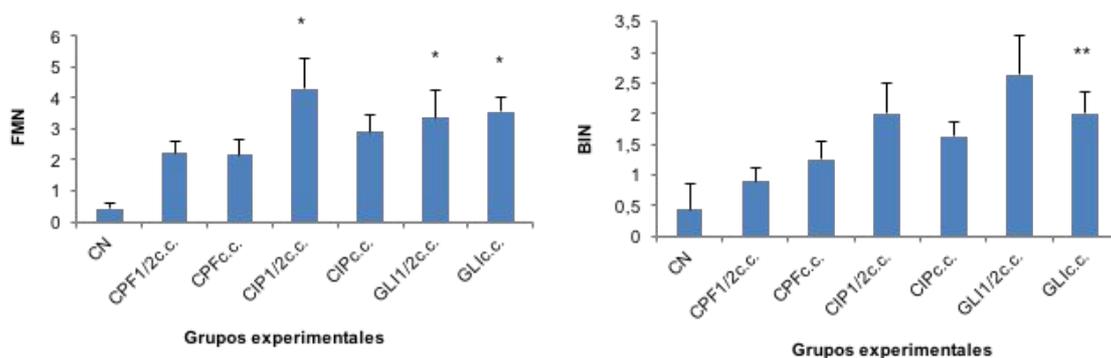


Fig. 2.12 Frecuencia de micronúcleos (FMN) y de células binucleadas (BIN) observados en eritrocitos de neonatos de *Caiman latirostris* en los diferentes grupos experimentales del ensayo de pulverización sobre el material de nido. CN: control negativo; CPF ½ c.c. (0,4%) y CPF c.c. (0,8%): grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®; CIP ½ c.c. (0,06%) y CIP c.c. (0,12%): grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; GLI ½ c.c. (1%) y GLI c.c. (2%): grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$: Estadísticamente significativo respecto al CN (ANOVA/Dunnett).

CAPÍTULO 2

Tabla 2.14 Frecuencia de diferentes anomalías nucleares (excepto MN) observadas en eritrocitos de *Caiman latirostris* (media \pm EE) para los distintos grupos experimentales en el ensayo de pulverización sobre el material de nido

Grupos experimentales	BN	MU	NE	ANT
CN	106,71 \pm 2,81	34,71 \pm 4,96	50,43 \pm 5,12	192,71 \pm 21,28
CPF 1/2 c.c.	103,20 \pm 8,51	32,50 \pm 3,26	54,10 \pm 5,36	192,90 \pm 13,53
CPF c.c.	95,50 \pm 7,18	25,17 \pm 3,29	53,75 \pm 5,76	177,92 \pm 13,77
CIP 1/2 c.c.	110,50 \pm 12,63	34,10 \pm 4,00	50,60 \pm 6,75	201,60 \pm 22,05
CIP c.c.	105,91 \pm 7,74	35,45 \pm 5,00	64,73 \pm 3,86	210,64 \pm 13,16
GLI 1/2 c.c.	112,36 \pm 7,95	38,36 \pm 4,73	56,18 \pm 5,50	213,27 \pm 16,75
GLI c.c.	113,91 \pm 6,76	35,82 \pm 3,35	56,00 \pm 5,44	211,27 \pm 13,27

CN: control negativo; CPF ½ c.c. (0,4%) y CPF c.c. (0,8%): grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®; CIP ½ c.c. (0,06%) y CIP c.c. (0,12%): grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; GLI ½ c.c. (1%) y GLI c.c. (2%): grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®.

BN: brotes nucleares

MU: muescas

NE: núcleos excéntricos

ANT: anomalías nucleares totales

Al igual que los demás ensayos de exposición embrionaria (*in ovo*), no se observaron diferencias de tamaño entre los animales expuestos y los controles al momento del nacimiento ($p > 0,05$; **Tabla 2.15**). Sí se observó un *efecto nido* marcado en la longitud: LT, LHC ($p < 0,01$; ANOVA) y peso ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis/Mann-Whitney, aplicando corrección de Bonferroni, $p \leq 0,016$), también se encontraron diferencias significativas entre nidos en BN y BIN (ANOVA/Tukey; $p < 0,05$), y en MU (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney, aplicando corrección de Bonferroni: $p \leq 0,016$).

CAPÍTULO 2

Tabla 2.15 Parámetros de tamaño corporal (media \pm EE) al nacer en *Caiman latirostris* observados en los distintos grupos experimentales del ensayo de pulverización sobre el material de nido

Grupos experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
CN	23,86 \pm 0,13	11,30 \pm 0,11	45,79 \pm 2,36
CPF 1/2 c.c.	23,54 \pm 0,29	11,40 \pm 0,14	45,16 \pm 1,60
CPF c.c.	23,18 \pm 0,66	11,08 \pm 0,27	11,57 \pm 1,84
CIP 1/2 c.c.	23,94 \pm 0,24	11,34 \pm 0,18	46,04 \pm 1,80
CIP c.c.	24,13 \pm 0,21	11,48 \pm 0,11	47,03 \pm 2,00
GLI 1/2 c.c.	24,01 \pm 0,27	11,20 \pm 0,10	46,64 \pm 2,16
GLI c.c.	24,01 \pm 0,20	11,49 \pm 0,10	47,69 \pm 1,75

CN: control negativo; CPF 1/2 c.c. (0,4%) y CPF c.c. (0,8%): grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®; CIP 1/2 c.c. (0,06%) y CIP c.c. (0,12%): grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; GLI 1/2 c.c. (1%) y GLI c.c. (2%): grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®. $p > 0,05$; ANOVA.

c.c.: concentración a campo

1/2 c.c.: mitad de la concentración a campo

LT: longitud total

LHC: longitud hocico-cloaca

cm: centímetro

g: gramo

No se observaron relaciones entre la FMN o la FANs y el tamaño (peso o longitud) de los animales al nacer ($p > 0,05$).

Para este ensayo no se observó un efecto dependiente de la concentración en ninguna de las variables de genotoxicidad analizadas, con ninguno de los compuestos evaluados ($p > 0,05$).

2.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES DEL CAPÍTULO

Los resultados obtenidos en esta etapa de exposición, por topicación sobre la cáscara del huevo y por pulverización sobre el material de nido, bajo condiciones controladas de laboratorio, nos permitieron determinar el efecto producido por las formulaciones de cada plaguicida testeado de manera independiente.

En esta instancia del trabajo de Tesis se ha demostrado que entre los biomarcadores de genotoxicidad analizados, la FMN presentó una gran sensibilidad, respondiendo a la exposición a formulaciones plaguicidas en todos los ensayos y a diferentes concentraciones, resultando ser muy buen indicador de alteraciones sobre el material genético.

CAPÍTULO 2

A diferencia de esto, las otras ANs, respondieron en menor medida, dependiendo en todos los casos de la formulación comercial evaluada y de la vía de exposición aplicada (topicación o pulverización), observándose mayor efecto en BN, MU, NL y NE. Por su parte, los parámetros de crecimiento no mostraron respuesta a las condiciones de exposición en ningún caso.

En el primer ensayo se pudo observar un aumento de la FMN para todas las formulaciones testeadas, tanto en los herbicidas como en los insecticidas y también para el CP; se observaron efectos similares para algunas de las ANs (BN, MU, NV, NL, BIL, NE y ANT), pero en este caso la diferencia fue más marcada para las formulaciones de los insecticidas END y CIP. En el segundo ensayo: EEE2, solamente se observó efecto en las formulaciones END y CIP sobre la FMN. Cabe destacar en este caso, la baja FMN presentada por el CP, en comparación con todos los demás grupos que, si bien no llegó a ser significativa, estaría indicando un posible efecto citotóxico.

En el primer ensayo de exposición embrionaria a la formulación de CPF (EEE3) hubo mayor diferencia entre las diferentes concentraciones respecto al CN que respecto al CV, donde sólo se observaron diferencias a las concentraciones más bajas. Si bien los controles negativo y de vehículo no mostraron diferencia significativa entre sí, esta disparidad podría explicarse por la mayor dispersión de los datos presentes en el CV. Por el contrario en el segundo ensayo de exposición a la formulación de CPF (EEE4), se evidenció un aumento en la FMN solamente a la mayor concentración tratada (100 µg/huevo), respecto del CV.

Por su parte, para el ensayo de pulverización sobre el material de nido, visualizamos un incremento en la FMN en la menor concentración de CIP (0,06%) y en ambas concentraciones utilizadas para la formulación de GLI (RU 1 y 2 %), así como en la frecuencia de eritrocitos BIN pero sólo para la concentración más baja de GLI (1%).

Estudios previos en *C. latirostris* reportaron resultados similares por exposición *in ovo* a la formulación RU (50-1750 µg/huevo), con un aumento en la FMN y en el índice de daño (ID) del EC, a partir de 500 µg/huevo (Poletta et al., 2009), demostrando ser éstos indicadores sensibles de daño al material genético para la especie.

Por el contrario, Burella et al. (2016) y Schaumburg et al. (2016) no encontraron efecto sobre la FMN y de ANs luego de exposición a la formulación RU en neonatos de yacaré overo (750-1750 µg/huevo) e iguana overa (50-1600 µg/huevo), respectivamente; pero sí reportaron en ambos casos una inducción en el ID de los

CAPÍTULO 2

eritrocitos evidenciado por el EC, en todas las concentraciones testeadas en yacaré y a partir de 200 µg/huevo en iguana overa.

Por otra parte, otros autores también han reportado daño producido sobre el material genético en otras especies de vertebrados por diferentes formulaciones a base de los mismos plaguicidas y en el rango de concentraciones testeados en este estudio (Cabagna et al., 2006; Cavallante et al., 2008; Guilherme et al., 2010; Uggini et al., 2010; Vera-Candiotti et al., 2013a; de Sola y Martin, 2011; Guo et al., 2015).

Nuestros resultados mostraron que para algunos de los ensayos a medida que aumentan las concentraciones de los formulados aumentaba la frecuencia de MN y de algunas de las ANs contabilizadas. Se observaron diferentes grados de relación con variaciones según el ensayo, la formulación, el biomarcador, y según se utilizaron los datos totales o las medias de los mismos por cada grupo experimental para establecer la relación con las concentraciones de los diferentes compuestos.

La variabilidad de respuestas entre los individuos expuestos a una misma formulación de plaguicidas, la falta de reproducibilidad entre distintos experimentos para algunos de los marcadores de genotoxicidad evaluados y la falta de efectos dependientes de la concentración, podrían explicarse por la existencia de varios factores implicados. Algunos autores han propuesto diferentes hipótesis para explicar la ausencia de diferencias en la FMN u otras ANs a altas concentraciones de ciertos compuestos, en comparación con los controles. Se sabe que varios agentes genotóxicos a concentraciones altas poseen propiedades citotóxicas, lo que resulta en alteraciones sobre la cinética de las células de la sangre, conduciendo a un retraso o directamente a la detención de la eritropoyesis. El efecto inverso, es decir la estimulación de la eritropoyesis, causaría un resultado similar mediante un efecto de "dilución" por el incremento de eritrocitos no dañados en la circulación periférica, con el constante reemplazo de los dañados. Por otra parte, los eritrocitos dañados tienden a ser eliminados a una mayor velocidad que los no dañados, con la consiguiente disminución de su frecuencia dando como resultado falsos negativos (Udroiu, 2006; Barni et al., 2007; Polard et al., 2011; Vera-Candiotti et al., 2013a; Jindal y Verma, 2015).

Por otra parte, también se postula la teoría del efecto "umbral" producido por un agente genotóxico, que explicaría la aparición de los efectos a partir de determinada concentración de exposición, sin observarse efecto alguno a bajas concentraciones y por ende, tampoco una relación concentración-efecto. Este efecto umbral podría darse por diferentes razones: 1- la eficacia de los mecanismos de protección celulares que, a

CAPÍTULO 2

bajas concentraciones del agente, impiden su llegada al objetivo (ADN); 2- la capacidad de algunos organismos para contrarrestar los efectos causados por especies reactivas del oxígeno (EROs), que pueden inducir daño genotóxico cuando su cantidad se incrementa más allá de la capacidad de defensa de los organismos, o por agotamiento de los sistemas antioxidantes; 3- la capacidad de reparación del daño generado, que sería suficiente para enmascarar los efectos de un agente a bajas concentraciones (Speit et al., 2000); 4- otros factores como la variabilidad de los datos experimentales, la variación inter individual en la respuesta, el metabolismo del mutágeno y los complejos mecanismos de susceptibilidad genética que pueden contribuir al efecto umbral (Elhajouji et al., 2011).

La Ciclofosfamida es un agente conocido para inducir efectos genotóxicos y se ha utilizado como CP para distintos estudios de evaluaciones genotóxicas y/o teratogénicas en embriones de ésta y otras especies de reptiles autóctonas (Poletta et al., 2009; Burella et al., 2016; Schaumburg et al., 2016; López González et al., 2017), utilizadas para las pruebas de MN, ANs y ensayo cometa (EC). Poletta et al., (2009) reportaron además de efectos genotóxicos, efectos teratogénicos de la Ciclofosfamida, que produjo malformaciones en algunos caimanes después de la exposición *in ovo* a 700 µg / huevo, y aumento de daño sobre el material genético de los embriones, siendo éste el primer reporte de efecto teratogénico por Ciclofosfamida en reptiles. En el presente estudio, también se demostró que este compuesto causó un aumento de daño al material genético manifestado por la FMN y por la frecuencia de otras ANs, como la presencia de BN y de ANT, y en alguno de los casos con valores similares a los observados para los plaguicidas en estudio (EEE1). En el segundo ensayo (EEE2), el efecto de la Ciclofosfamida fue el opuesto, ya que se observó una disminución en la FMN respecto a los CN y CV, así como a los demás grupos de experimentación, con una diferencia evidente pero que no llegó a ser significativa. Una posible explicación a esta disminución en la FMN para el CP, podría deberse a un efecto citotóxico, como se mencionó anteriormente, y se evidencia también para algunas ANs del primer ensayo (EEE1) como MU, BIN, NV y NL, donde el efecto disminuyó a las concentraciones más altas de algunos compuestos.

Burella et al. (2016) tampoco observaron efecto de la Ciclofosfamida para la FMN, pero si respecto al ID visualizados por el EC. Los autores señalan que este efecto podría darse por los mecanismos de acción que ejerce la Ciclofosfamida sobre el material genético y el tipo de daño que detectan el test de MN y otras ANs, ya que se sabe que este compuesto induce con mayor frecuencia fragmentación, lesiones o

CAPÍTULO 2

rupturas de cadena de ADN y que serían reveladas por el EC, así como por la formación de aductos (McCarroll et al. 2008). Estos mecanismos de acción también deben tenerse en cuenta la hora de explicar los resultados observados sobre las células de los individuos expuestos a cada formulación plaguicida ya que, generalmente, el mecanismo por el cual los plaguicidas inducen genotoxicidad varía enormemente dependiendo de los componentes presentes en cada formulación.

La determinación de la FMN ha demostrado ser una herramienta sensible en todos los ensayos propuestos para este capítulo, y ha permitido determinar la relación existente entre cada formulación de plaguicidas y la genotoxicidad potencial causada, teniendo en cuenta que respondió en todos los casos mejor que otras ANs. Sin embargo, algunas ANs como BN, MU, NE y NL mostraron una respuesta rápida en muchos de los tratamientos evaluados en comparación con los controles, demostrando ser también buenos indicadores de daño genotóxico cuando se aplican junto con otros biomarcadores de genotoxicidad. Sin embargo esta respuesta no fue consistente en los diferentes ensayos, ya que sólo se observó dicho efecto en el primer ensayo de exposición por topicación realizado (EEE1), mientras que en ensayo de pulverización sólo se observó diferencia en BIN. De todas formas, se considera que la FMN así como de otras ANs podrían formar parte de una batería mínima de pruebas necesarias para caracterizar la respuesta genotóxica de distintos compuestos, en particular formulaciones de plaguicidas, ya que se ha demostrado que diferentes anomalías morfológicas nucleares indican daño genético y podrían ser manifestaciones primarias anteriores a la formación de MN (Seriani et al., 2011; 2014). Se proponen diferentes mecanismos de origen y algunas explicaciones posibles sobre su formación (Cavas y Ergene-Gözükara, 2005; Pampalona et al., 2010; Fenech et al., 2011; Gökalp Muranlı y Güner, 2011), con ciertas controversias. Respecto a los mecanismos de formación de los BN, se sugiere que resultan de un proceso de amplificación de ADN que se localiza selectivamente en la periferia del núcleo y físicamente se encuentra unido a él, este proceso ocurre durante la fase S del ciclo celular. Una célula en fase S, es el blanco principal para cualquier agente genotóxico, por estar la cromatina descondensada para los procesos de replicación y transcripción (Prieto et al., 2008; Fenech et al., 2011). Otros autores proponen que estos BN pueden ser el resultado de fragmentos intersticiales de los cromosomas (Lindberg et al., 2007). Los fragmentos de ADN que producen estas formaciones, también se asocian con eventos de apoptosis, fallas en reparación y, posiblemente, exceso de cromosomas a partir células aneuploides (Prieto et al., 2008; Fenech et al., 2011; Seriani et al., 2011), o debido a un retraso en la mitosis resultando en una malformación en las fibras del huso (Melo et

CAPÍTULO 2

al., 2014). Lajmanovich et al. (2014) sugirieron que la formación de eritrocitos con el aumento núcleos BIL se da en situaciones de estrés (por ejemplo, por alteraciones de la dieta, alguna patología o daño metabólico). Sin embargo, el mecanismo exacto de la formación de otras anomalías tales como núcleos con MU aún se desconoce. Por su parte, una disminución en la frecuencia de eritrocitos BIN en los grupos expuestos se puede interpretar como una reducción en el índice mitótico, menos células estarían entrando en división, probablemente debido a un arresto del ciclo celular, a nivel del punto de control posterior a la fase S o previo a la Anafase. Harabawy y Mosleh (2014), han indicado que los eritrocitos BIN y BIL exhiben un origen similar a los MN y se los considera como análogos genotóxicos de éstos, además proponen que otros tipos de ANs como los NL, podrían presentarse como diferentes precursores de MN o del fenómeno de BIN. Por su parte, los autores indican que la formación de estas diferentes anomalías (MN y otras ANs), podrían representar una manera por la cual la célula elimina material genético amplificado del núcleo. También se sugiere que la formación de las ANs se relaciona con el proceso de estrés oxidativo en las células (Oliveira et al., 2010; Seriani et al., 2011; 2014; Harabawy y Mosleh, 2014). En particular, algunos autores postulan que ciertas ANs pueden ser inducidas por compuestos genotóxicos incluso cuando los MN no son inducidos, y viceversa, mientras que otros autores informan de la correlación entre la FMN y de otras ANs (Ayllón y García-Vasquez, 2000; Kirschbaum et al., 2009; Jindal y Verma, 2015). En cualquier caso, esto podría estar relacionado con el mecanismo de acción de los compuestos en estudio y su capacidad de generar de manera diferencial un tipo particular de anomalía nuclear.

La mortalidad de los embriones en todos los ensayos y grupos experimentales, fue menor al 20%, un valor considerado aceptable respecto a la mortandad reportada en los programas de uso sustentable bajo la técnica de rancheo, con incubación artificial (Larriera e Imhof, 2006).

Respecto al crecimiento, nuestros resultados no fueron coincidentes con otros estudios previos en reptiles. En la misma especie de este trabajo se observó un menor tamaño al nacer y un retraso del crecimiento a los 3 meses de edad luego de la exposición *in ovo* por pulverización en condiciones semi-naturales a la formulación comercial de glifosato: RU, y a la mezcla de GLI+CIP+END (Poletta et al., 2011).

Del mismo modo, Sparling et al. (2006) en *Trachemys scripta elegans* reportaron una pequeña masa corporal y reducción del índice somático (relación peso del huevo/pichón nacido) en los neonatos expuestos *in ovo* a concentraciones de 1,2; 3,5; 10,6;

CAPÍTULO 2

31,7 y 95% de otra formulación GLI (Glypro®) hasta los 14 días de vida. Esto quizás tenga que ver también con una mayor susceptibilidad de estos animales frente a la exposición a esos compuestos.

Sin Embargo, la ausencia de efectos sobre el tamaño al nacer y el crecimiento posterior, luego de exposición embrionaria, también fue observada en recientes trabajos en la especie (Burella et al., 2016; Latorre et al., 2016), en la iguana overa tanto al nacer y como a los 6 meses de edad (Schaumburg et al., 2016), y en el lagarto *Podarcis bocagei* expuestos ambientalmente a plaguicidas (Amaral et al., 2012a).

Estas diferencias no encontradas en algunos casos sobre el crecimiento según explican Amaral et al. (2012a), podrían corresponderse con los valores en las concentraciones de plaguicidas aplicadas no fueran suficientes como para generar un desequilibrio en los procesos bioenergéticos subyacentes tales como asimilación de energía y gasto metabólico.

Estos procesos pueden modificarse directamente por los contaminantes, pero también pueden hacerlo indirectamente, y los mecanismos responsables de las reducciones de talla pueden no ser inmediatamente evidentes (Mitchelmore et al., 2005). En otro trabajo realizado por los mismos autores (Amaral et al., 2012b), indican que la tasa de recuperación metabólica en reptiles es difícil de sostener frente a las continuas exposiciones ambientales. Las aplicaciones de los plaguicidas que ocurren generalmente durante la primavera y el otoño, coincide con el período en el cual los reptiles adquieren energía suficiente para la producción de huevos, la reproducción y para sobrevivir al invierno. Consideran que para cumplir con todos estos requerimientos energéticos, principalmente a través de la ingesta del alimento, los individuos pasan más tiempo en la búsqueda del alimento por lo que se encuentran frente a un mayor riesgo a ser depredados. Por lo tanto, que si un animal no compensa las deficiencias nutricionales antes del período invernal tendrán implicaciones para su equilibrio energético, tasa reproductiva, descendencia, desarrollo en los mecanismos de detoxificación, susceptibilidad a ciertas enfermedades y además aumentaría el riesgo a ser depredado.

En cuanto al *efecto nido*, se comprobó para los parámetros relacionados al crecimiento en todos los ensayos, lo cual coincide con estudios previos que han descrito la influencia del nido de origen como uno de los factores determinantes en el crecimiento de los animales durante los primeros meses de vida (Gcarnett y Murray, 1986; Webb et al., 1992; Verdade, 1997; Poletta et al. 2008b; 2009; 2011). Poletta et al., (2011) reportaron este efecto en el crecimiento de *C. latirostris* durante el primer año de vida,

CAPÍTULO 2

en base a 3 mediciones del tamaño corporal: LT, LHC y peso al nacer, y a los 3 y 12 meses luego de la exposición a RU y a mezcla de plaguicidas (CIP+END+GLI), por pulverizaciones sobre nidos en un ensayo semi-controlado. Se demostró de esta manera, que los animales procedentes de diferentes nidos crecieron a distinta tasa durante su primer año de vida (Poletta et al., 2011). Respecto a los biomarcadores de genotoxicidad sin embargo, los resultados fueron muy variables, observándose *efecto nido* en algunos de ellos y en ciertos ensayos, pero no en otros, siendo los mismos inconsistentes. De manera similar, en otro trabajo reportado en la especie no se evidenció un *efecto nido* marcado respecto a alteraciones sobre el material genético (MN e ID) y el tamaño corporal, luego de la exposición de embriones por topicación a la formulación de RU, a las mismas concentraciones aplicadas en nuestro estudio (Poletta et al., 2009). Estos resultados, validan la utilización de diferentes nidos y su distribución equitativa en los diferentes grupos experimentales de los ensayos controlados de exposición y comprueban la necesidad de seguir teniendo en cuenta a este factor en los diseños experimentales de este tipo.

Por otra parte, también se ha comprobado la absorción de plaguicidas a través de la cáscara de los huevos, demostrándose que la aplicación tópica (Beldoménico et al., 2007; Poletta et al., 2009; Burella et al., 2016; Schaumburg et al., 2016) y la aplicación sobre el material de nido (Cañas y Anderson, 2002; Mayne et al., 2005; Poletta et al., 2011; de Sola y Martin, 2011; de Sola et al., 2014) en especies ovíparas, representan dos vías eficientes de exposición a contaminantes de los embriones en desarrollo, ya que las sustancias pasan de una u otra forma a través de la cáscara del huevo e inducen efectos dañinos en los embriones. De la misma manera, los ensayos *in ovo* realizados en este trabajo de Tesis por topicación o pulverización demostraron resultados similares, particularmente a nivel de daño al material genético.

Trabajos a futuro que incluyan biomarcadores de citotoxicidad, podrían descifrar el papel de los factores implicados en la cinética del proceso eritropoyético especie-específico para entender los mecanismos de generación de estas alteraciones y/o desequilibrios producidos por estos compuestos sobre las células de *C. latirostris*.

Se concluye para este capítulo que las formulaciones comerciales de plaguicidas inducen efectos genotóxicos en embriones de *C. latirostris* mediante la FMN de manera evidente y, menos consistentemente mediante otras ANs como BN, MU, NL y NE.

CAPÍTULO 3

Evaluación del efecto genotóxico de formulaciones comerciales de Cipermetrina, Clorpirifos, Endosulfán y Glifosato en neonatos de *Caiman latirostris* (Etapa 2)

CAPÍTULO 3

3.1 INTRODUCCIÓN

Tal como se desarrolló en el primer capítulo de la presente tesis (1.1), en Argentina, la campaña de soja de 1era. se extiende desde el mes de septiembre hasta mayo, mientras la soja de 2da. se inicia en noviembre-enero y culmina en julio. En cualquiera de los casos, implica un gran riesgo de exposición ambiental a plaguicidas para los individuos recién nacidos de *C. latirostris* y en sus primeros meses de vida. Los nacimientos en esta especie comienzan en el mes de febrero hasta marzo-abril, y coinciden tanto con los meses de máxima aplicación de plaguicidas en áreas agrícolas, como con los meses de mayores lluvias según el régimen hidrológico. Teniendo en cuenta estas variables, los cuerpos de agua superficiales, donde suelen permanecer la mayor parte del tiempo las crías de yacaré overo durante los primeros meses de vida, pueden recibir continuas descargas de agroquímicos cuando se encuentran próximos a las zonas de aplicación, principalmente por escorrentía. Durante los primeros meses de vida, los organismos suelen ser más vulnerables a cualquier variación ambiental y presentan una mayor sensibilidad a los contaminantes químicos que los adultos, debido a la inmadurez en los sistemas de detoxificación y reparación del daño (Russel et al., 1999; Novillo et al., 2005; Poletta et al., 2009).

En los últimos años, se han reportado numerosos efectos producidos por formulaciones plaguicidas sobre las primeras etapas de la vida de *C. latirostris*, en condiciones controladas o semi-naturales, incluyendo alteraciones sobre el desarrollo, modificaciones a nivel genético, enzimático y metabólico, así como en la respuesta inmune (Poletta et al., 2009; 2011; 2016; Latorre et al., 2013; 2016; López González et al., 2013; 2017; Siroski et al., 2016). Con el objetivo de avanzar en la evaluación de los efectos de estas formulaciones y de sus mezclas, tal como se utilizan en las prácticas agrícolas de la región y teniendo en cuenta además, las posibles interacciones que pueden ocurrir ambientalmente, llevamos a cabo diferentes estudios en crías de *C. latirostris*.

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

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 COMPUESTOS QUÍMICOS

CAPÍTULO 3

Las formulaciones plaguicidas utilizadas en esta instancia fueron las mismas indicadas en el capítulo anterior para los ensayos de exposiciones embrionarias (EEE; Capítulo 2): (1) Roundup® Full II (RU; 66,2% p.a.), CAS No. 70901-12-1; (2) PanzerGold® (PANZ; 60,2% p.a.), CAS No. 1071-83-6; (3) Cipermetrina Atanor® (CIP; 25% p.a.), CAS No. 52315-07-8; (4) Endosulfán Galgofan® (END; 35% p.a.), CAS No. 115-29-7; y (5) Clorpirifos Lorsban 48E® (CPF; 48% p.a.), CAS No. 2921-88-2 (EXTOXNET, 1996).

Se utilizó etanol (C₂H₆O) como sustancia vehículo para las formulaciones de los insecticidas END, CIP y CPF, debido a la baja solubilidad de estos compuestos en agua, incluyéndose nuevamente para estas condiciones de experimentación, un control de vehículo: CV.

En estos ensayos, debido a que el objetivo era reproducir, lo más cercanamente posibles las condiciones de exposición ambiental, no se incluyó el control positivo (CP) expuesto a Ciclofosfamida.

3.2.2 EJEMPLARES DE *Caiman latirostris*

Se emplearon ejemplares de 20 días de edad provenientes de huevos colectados al inicio de la temporada reproductiva, en el área natural utilizada como control, previamente descrita en apartado **2.2.2** (Reserva Natural Manejada "El Fisco"). Los huevos cosechados fueron transportados a las instalaciones del PY/ Lab. Zool. Aplicada: Anexo Vert. (FHUC - UNL / MMA, Santa Fe), e incubados artificialmente en la incubadora del PY bajo condiciones controladas ya descritas anteriormente. Una vez nacidos, los neonatos fueron mantenidos bajo condiciones de crianza hasta el inicio del tratamiento, en el marco de las instalaciones del PY.

Los animales se individualizaron mediante cortes en los verticilos caudales (que corresponden al número del nido y a la marca individual de cada animal (Larriera et al., 2008) como fue explicado en Capítulo 1 (**1.4.2**), y para controlar el *efecto nido*, se seleccionaron nuevamente, animales nacidos de diferentes nidos (Verdade, 1997).

3.2.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE

Al finalizar los experimentales se tomaron muestras de sangre periférica de cada neonato (volumen de 0,5 ml de sangre entera), por punción de la vena espinal (Zippel et al., 2003), como se detalló en el apartado **2.2.4**. No se realizaron muestreos de

CAPÍTULO 3

sangre previos a la exposición para evitar cualquier daño a los neonatos, debido al riesgo que conlleva la técnica de extracción en animales de tan pequeño tamaño.

3.2.4 ENSAYOS DE EXPOSICIÓN DE NEONATOS (IN VIVO)

Para los ensayos de exposición de neonatos por inmersión (EEN), los animales de cada grupo experimental fueron mantenidos, en bateas plásticas de 55 cm de largo por 35 cm de ancho y 27 cm de altura (0,20 m² de área de base). Las bateas se dispusieron de manera inclinada para proporcionar un 60% de agua y 40% de superficie seca, con un volumen fijo de 4 L (agua potable declorada) y una profundidad máxima de aproximadamente 15 cm (**Fig. 3.1**), ubicadas dentro de un ambiente calefaccionado (30 ± 2 °C). La temperatura de cada batea se registró mediante un almacenador de datos Hobbo Temp (Onset Computer Corporation, Pocasset, MA, USA), a fin de evitar cualquier fluctuación y que se desprenda del rango previamente estipulado. Las exposiciones se realizaron por inmersión (Eaton y Klassen, 2005), mediante la incorporación de los compuestos al agua de las bateas en un volumen fijo de agua de 4 L.

Cada ensayo tuvo una duración de 60 días, definidos como sub-crónicos ya que no superaron los 90 días de exposición (Eaton y Gilbert, 2008), con renovación de agua y soluciones cada 48 hs., coincidiendo con el régimen de limpieza. Dicha duración se basó en el período de tiempo en el cual los neonatos podrían estar expuestos a los plaguicidas en la naturaleza, que va desde su nacimiento en febrero-marzo hasta fines de abril-mayo, momento hasta el que se extienden las fumigaciones más importantes.



Fig. 3.1 Ensayo de exposición de neonatos de *Caiman latirostris* por inmersión. Se observan las bateas plásticas inclinadas para ofrecer una superficie seca y otra con poca agua.

CAPÍTULO 3

Para las formulaciones basadas en GLI, se utilizaron las concentraciones recomendadas para la aplicación del producto a campo en cultivos de soja, es decir, al 2% / ha. y el doble de la misma, para evaluar la relación concentración-efecto. Dicha concentración fue aplicada en función de la superficie de base de la batea (0,20 m²) y diluida luego en un volumen de agua constante (4 L), como se ha descrito en trabajos anteriores para exposición de neonatos de *C. latirostris* (Latorre et al., 2013; 2016; López González et al., 2013; Siroski et al., 2016; Poletta et al., en prensa).

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

Todas las concentraciones se redujeron progresivamente en el tiempo durante los ensayos con el fin de simular la degradación de los compuestos en el agua, previamente determinadas por Poletta et al. (2011) y Siroski et al. (2016), en iguales condiciones. A partir de estos datos, en cada renovación de agua se colocó una concentración determinada en función del tiempo del ensayo, disminuyéndose las mismas de manera progresiva, e informándose en la tabla correspondiente, las concentraciones iniciales y finales de cada compuesto.

El alimento se suministró *ad libitum* tres veces a la semana, consistiendo en la misma mezcla húmeda descrita en 1.4.2. La limpieza de las bateas se intercaló con los días de alimentación.

Una vez finalizado los experimentos, se llevó a cabo la extracción de sangre a todos los animales de cada grupo experimental (2.2.4) y se aplicó el test de MN y otras ANs en eritrocitos de *C. latirostris*, como fue descrito en 1.3.2.1. Las anomalías nucleares (ANs) consideradas para estos ensayos fueron: BN, MU, BIN, NE y ANT.

También se registró para todos los ensayos: el crecimiento durante el ensayo en cada grupo experimental (LT, LHC y peso, valores finales – valores iniciales).

Se realizaron 3 ensayos consecutivos de exposición de neonatos por inmersión, en iguales condiciones, difiriendo particularmente en los compuestos testeados. En los dos primeros ensayos (EEN1 y EEN2) se evaluaron las formulaciones de GLI, CIP y

CAPÍTULO 3

END, con diferencias menores entre ellos, con el objetivo de comprobar los resultados obtenidos; mientras que en el último, tercer ensayo (EEN3) se evaluó la formulación de CPF, los mismos se detallan a continuación.

3.2.4.1 ENSAYO DE EXPOSICIÓN DE NEONATOS DE CAIMAN LATIROSTRIS POR INMERSIÓN A LAS FORMULACIONES COMERCIALES DE CIPERMETRINA, ENDOSULFÁN Y GLIFOSATO

Ensayo 1 (EEN 1): Se evaluaron las dos formulaciones del herbicida GLI utilizadas para los ensayos de exposición embrionaria (EEE): RU y PANZ, además de las formulaciones de los insecticidas CIP y END.

Se seleccionaron 120 neonatos nacidos de 6 nidos cosechados en la Reserva Natural Manejada "El Fisco" (2.2.2) (20 neonatos de cada nido), distribuidos equitativamente en 10 grupos experimentales de 12 individuos c/u: un grupo control negativo (CN), sin exposición al contaminante, tratado con agua potable clorada; un control de vehículo (CV), tratado con etanol; 2 grupos expuestos a distintas concentraciones de END (END1 y END2); 2 expuestos a CIP (CIP1 y CIP2), utilizando en ambos casos etanol como vehículo; 2 grupos expuestos a la formulación de GLI RU (RU1 y RU2) y 2 grupos expuestos a la formulación de GLI PANZ (PANZ1 y PANZ2) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Grupos experimentales y concentraciones (inicial y final) aplicadas en el primer ensayo de exposición de neonatos de *Caiman latirostris* por inmersión a las formulaciones comerciales de Cipermetrina, Endosulfán y Glifosato (EEN1)

Grupos experimentales	Compuestos	Concentración inicial	Concentración final	Nº indiv. exp./ nido	N
CN	Agua potable clorada	-	-	2	12
CV	Etanol	200 µl/L	200 µl/L	2	12
END1	Galgofan®, 35% p.a.	0,5 µg/L	0,05 µg/L	2	12
END2		1 µg/L	0,1 µg/L	2	12
CIP1	Atanor®, 25% p.a.	0,5 µg/L	0,05 µg/L	2	12
CIP2		1 µg/L	0,1 µg/L	2	12
RU1	Roundup®Full II, 66,2% p.a.	2,5 mg/L	0,5 mg/L	2	12
RU2		5 mg/L	0,25 mg/L	2	12
PANZ1	PanzerGold®, 60,2% p.a.	2,5 mg/L	0,5 mg/L	2	12
PANZ2		5 mg/L	0,25 mg/L	2	12

CN: control negativo; CV: control vehículo (etanol); END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes

CAPÍTULO 3

concentraciones de la formulación de glifosato Roundup Full II®; PANZ1 Y PANZ2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de glifosato PanzerGold®; p.a.: principio activo. N° de indiv. exp. / nido: número de individuos expuestos de cada nido por grupo experimental; N: números de individuos totales por grupo experimental.

Ensayo 2 (EEN 2): Este ensayo consistió en la repetición del primer ensayo de exposición de neonatos de *C. latirostris* por inmersión (EEN1), bajo iguales condiciones que las descritas para ese ensayo a excepción de la evaluación la formulación comercial PANZ que no fue incluida en este caso.

El mismo se conformó por 96 individuos (N total) provenientes de 4 nidos (24 animales de cada uno), distribuidos equitativamente en 8 grupos de experimentación con 12 individuos cada uno: **1)** el CN, sin exposición al contaminante, tratado con agua potable declorada; **2)** el CV, tratado con etanol; **3-4)** 2 grupos expuestos a distintas concentraciones de END (END1 y END2); **5-6)** 2 expuestos a CIP (CIP1 y CIP2), utilizando en ambos casos etanol como vehículo y los grupos **7-8)** expuestos a la formulación de GLI RU (RU1 y RU2). En la **Tabla 3.2** se muestran las concentraciones iniciales y finales de cada grupo experimental para este ensayo.

Al finalizar el período de exposición, se tomaron muestras de sangre de la vena espinal a todos los animales de cada grupo experimental, para la realización de los biomarcadores de genotoxicidad propuestos y variables de crecimiento.

Tabla 3.2 Grupos experimentales y concentraciones (inicial y final) aplicadas en el segundo ensayo de exposición de neonatos de *Caiman latirostris* por inmersión a las formulaciones comerciales de Cipermetrina, Endosulfán y Glifosato (EEN2)

Grupos experimentales	Compuestos	Concentración inicial	Concentración final	N° indiv. exp./ nido	N
CN	Agua potable declorada	-	-	3	12
CV	Etanol	200 µl/L	200 µl/L	3	12
END1	Galgofan®, 35% p.a.	0,5 µg/L	0,05 µg/L	3	12
END2		1 µg/L	0,1 µg/L	3	12
CIP1	Atanor®, 25% p.a.	0,5 µg/L	0,05 µg/L	3	12
CIP2		1 µg/L	0,1 µg/L	3	12
RU1	Roundup®Full II, 66,2% p.a.	2,5 mg/L	0,5 mg/L	3	12
RU2		5 mg/L	0,25 mg/L	3	12

CN: control negativo; CV: control vehículo (etanol); END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de glifosato Roundup Full II®; p.a.: principio activo. N° de indiv. exp. / nido: número de individuos expuestos de cada nido por grupo experimental; N: números de individuos totales por grupo experimental.

3.2.4.2 ENSAYO DE EXPOSICIÓN DE NEONATOS DE CAIMAN LATIROSTRIS POR INMERSIÓN A LA FORMULACIÓN DE CLORPIRIFOS

Ensayo 3 (EEN 3): En este último ensayo, bajo condiciones controladas de exposición de neonatos, se propuso testear concentraciones de la formulación a base de CPF (Lorsban 48E®).

El ensayo se basó en 3 grupos de experimentación: un CV y dos grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de CPF (CPF1 y CPF2; **Tabla 3.3**). Cada grupo de experimentación fue conformado por 12 individuos (N total=36; provenientes de 3 nidos con 12 individuos de cada uno).

Los biomarcadores analizados fueron los mismos que en EEN1 y EEN2.

Tabla 3.3 Grupos experimentales y concentraciones (inicial y final) aplicadas en el tercer ensayo de exposición de neonatos de *Caiman latirostris* por inmersión a la formulación de Clorpirifos (EEN3)

Grupos experimentales	Compuestos	Concentración inicial	Concentración final	N° indiv. exp./ nido	N
CV	Etanol	200 µl/L	200 µl/L	4	12
CPF1	Lorsban 48E®, 48% p.a.	0,5 µg/L	0,05 µg/L	4	12
CPF2		1 µg/L	0,1 µg/L	4	12

CV: Control Vehículo (etanol); CPF1 y CPF2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de Clorpirifos (Lorsban 48E®); p.a.: principio activo. N° de indiv. exp. / nido: número de individuos expuesto de cada nido por grupo experimental; N: números de individuos totales por grupo experimental.

3.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS 17.0 para Windows. Las diferencias entre los duplicados de cada grupo experimental se analizaron mediante test *t*. Todas las variables se testearon en normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas entre los grupos se comprobaron con el test de Levene.

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

CAPÍTULO 3

En todos los casos las variables de agrupamiento fueron los tratamientos y los nidos. La existencia de relaciones concentración-efecto con las FMN y FANs, se determinaron mediante el análisis de regresiones lineales.

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

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

3.3 RESULTADOS

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los duplicados de los grupos experimentales para ninguna de las variables analizadas de cada uno de los ensayos ($p > 0,05$), de manera que todos los resultados se informan por grupo experimental (media \pm EE).

Para los ensayos en los que se utilizó CN y CV (EEN1 y EEN2), no se observaron diferencias significativas entre ellos para ninguna de las variables analizadas, lo que demuestra que el etanol tampoco causa daño en las crías de yacaré overo, a las concentraciones utilizadas para estos ensayos ($p > 0,05$). Por esta razón, en el tercer ensayo (EEN3) sólo se utilizó el CV como contro negativo del ensayo de evaluación de la formulación de CPF.

Los resultados obtenidos del primer ensayo (EEN1) demostraron la existencia de alteraciones sobre el material genético en los grupos expuestos a todas las formulaciones testeadas, evidenciado mediante un incremento estadísticamente significativo en diferentes parámetros de genotoxicidad analizados y en relación a cada grupo experimental. Se observó un aumento de la FMN para los grupos expuestos a GLI: RU1 ($p = 0,006$), RU2 ($p = 0,003$), PANZ1 y PANZ2 ($p < 0,001$), respecto al CN. Un efecto similar fue observado para END1 ($p < 0,001$) y CIP2 ($p = 0,05$), al compararse con el CV (**Fig. 3.2 A**).

En lo que respecta a la frecuencia de ANs, se observaron valores significativamente mayores de BN en CIP1, respecto al CV ($p = 0,035$; **Fig. 3.2 B**), y de NE en: END1, END2, CIP1 y CIP2 en comparación con el CV ($p < 0,001$; **Fig. 3.2 C**).

CAPÍTULO 3

En la **Tabla 3.4** se muestran los valores de las medias y los EE de todas las variables genotóxicas analizadas en este ensayo.

Tabla 3.4 Frecuencia de micronúcleos y de otras anomalías nucleares (media \pm EE) observadas en eritrocitos de *Caiman latirostris* en los diferentes grupos experimentales del primer ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN1)

Grupos experimentales	FMN	BN	MU	BIN	NE	ANT
CN	1,67 \pm 0,32	143,87 \pm 7,63	31,47 \pm 3,98	0,47 \pm 0,16	52,80 \pm 6,46	228,60 \pm 13,84
CV	1,93 \pm 0,32	109,20 \pm 8,46	22,87 \pm 2,05	0,20 \pm 0,11	65,20 \pm 3,70	249,13 \pm 10,37
END1	5,29 \pm 0,65##	126,71 \pm 7,61	27,43 \pm 3,97	0,00 \pm 0,00	99,36 \pm 4,75##	253,50 \pm 13,17
END2	2,77 \pm 0,50	134,54 \pm 8,85	23,67 \pm 2,75	0,00 \pm 0,00	100,00 \pm 7,06##	258,31 \pm 14,47
CIP1	3,85 \pm 0,80	155,43 \pm 9,71 #	26,43 \pm 2,90	0,21 \pm 0,15	98,79 \pm 6,82##	280,86 \pm 15,53
CIP2	3,67 \pm 0,71	144,06 \pm 8,23	24,20 \pm 2,42	0,07 \pm 0,07	103,13 \pm 5,74##	271,47 \pm 10,13
RU1	5,53 \pm 1,39**	147,73 \pm 14,44	36,80 \pm 4,77	0,27 \pm 0,15	44,27 \pm 4,35	229,07 \pm 21,08
RU2	4,47 \pm 0,94**	160,66 \pm 10,73	28,33 \pm 2,94	0,40 \pm 0,13	64,20 \pm 5,09	253,60 \pm 16,15
PANZ1	5,40 \pm 0,83**	175,47 \pm 11,49	34,07 \pm 3,40	0,60 \pm 0,21	73,33 \pm 9,23	283,47 \pm 20,24
PANZ2	7,21 \pm 0,91**	147,71 \pm 7,27	28,00 \pm 2,43	0,50 \pm 0,17	65,21 \pm 5,18	241,43 \pm 9,94

CN: control negativo; CV: control vehículo (etanol); END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de glifosato Roundup Full II®; PANZ1 y PANZ2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de glifosato PanzerGold®. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$: estadísticamente significativo respecto al CN. # $p < 0,05$; # $p < 0,01$: estadísticamente significativo respecto al CV.

FMN: Frecuencia de micronúcleos

BN: brotes nucleares

MU: muescas

BIN: eritrocitos binucleados

NE: núcleos excéntricos

ANT: anomalías nucleares totales

CAPÍTULO 3

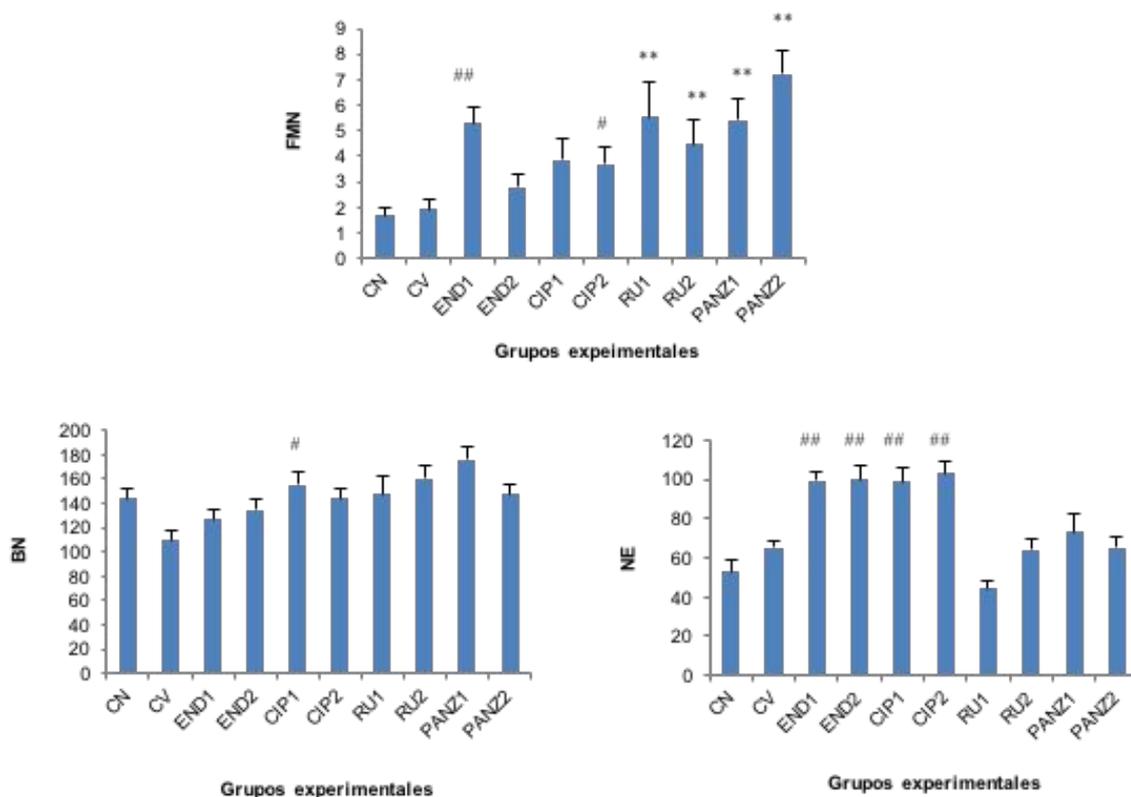


Fig. 3.2 Frecuencia de micronúcleos (FMN), brotes nucleares (BN) y núcleos excéntricos (NE), observados en eritrocitos de neonatos de *Caiman latirostris* en los diferentes grupos experimentales del primer ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN1). CN: control negativo; CV: control vehículo (etanol); END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®; PANZ1 y PANZ2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato PanzerGold®. FMN: Kruskal-Wallis / Mann Whitney; BN; NE: ANOVA/Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$: estadísticamente significativo respecto al CN. # $p < 0,05$; # $p < 0,01$: estadísticamente significativo respecto al CV.

Por el contrario, en el segundo ensayo de exposición embrionaria de neonatos (EEN2), no se encontraron diferencias significativas en la FMN y de ANs ($p > 0,05$) para ninguno de los grupos. En la **Tabla 3.5** se muestran los valores de las medias y el EE para cada variable por grupo de experimentación.

CAPÍTULO 3

Tabla 3.5 Frecuencia de micronúcleos y de cada anomalía nuclear en eritrocitos de *Caiman latirostris* (media \pm EE) para los distintos grupos experimentales del segundo ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN2)

Grupos experimentales	FMN	BN	MU	BIN	NE	ANT
CN	1,25 \pm 0,75	97,25 \pm 3,97	30,50 \pm 7,02	1,25 \pm 0,25	59,25 \pm 6,46	188,25 \pm 10,33
CV	0,50 \pm 0,29	108,00 \pm 18,93	29,50 \pm 2,53	0,25 \pm 0,25	85,75 \pm 3,92	223,50 \pm 28,30
END1	0,50 \pm 1,87	141,25 \pm 25,17	30,00 \pm 9,68	1,00 \pm 0,58	79,00 \pm 10,56	251,25 \pm 29,03
END2	1,00 \pm 0,71	107,75 \pm 12,32	21,50 \pm 4,09	0,50 \pm 0,50	74,60 \pm 7,64	202,25 \pm 23,41
CIP1	2,33 \pm 0,88	104,33 \pm 5,70	32,67 \pm 4,05	1,33 \pm 0,88	53,67 \pm 3,18	192,00 \pm 11,14
CIP2	2,75 \pm 0,85	95,75 \pm 7,91	27,75 \pm 6,18	2,00 \pm 0,71	56,50 \pm 5,73	182,00 \pm 15,08
RU1	3,40 \pm 1,17	110,40 \pm 10,32	37,60 \pm 5,59	1,40 \pm 0,93	59,00 \pm 5,48	208,40 \pm 13,33
RU2	3,60 \pm 1,47	119,00 \pm 8,67	32,20 \pm 6,63	3,00 \pm 1,26	75,00 \pm 9,94	232,20 \pm 13,06

CN: control negativo; CV: control vehículo (etanol); END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán Galgofan®; CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de Cipermetrina Atanor®; RU1 y RU2: grupos expuestos a las diferentes concentraciones de Roundup Full II®.

FMN: Frecuencia de micronúcleos

BN: brotes nucleares

MU: muescas

BIN: eritrocitos binucleados

NE: núcleos excéntricos

ANT: anomalías nucleares totales

En el caso del tercer ensayo (EEN3) se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la FMN en todos los tratamientos testeados (CPF1: $p=0,041$ y CPF2: $p=0,006$), comparados con el control (CV).

Para en el caso de las otras ANs analizadas sólo se observaron diferencias significativas en NE en ambos tratamientos del insecticida (CPF1: $p=0,034$ y CPF2: $p=0,016$), respecto al CV (**Fig. 3.3**).

En **Tabla 3.6** se muestran los valores de las medias y EE de la frecuencia MN y de cada una de las ANs analizadas, para cada grupo de experimentación de este ensayo (EEN3).

Tabla 3.6 Frecuencia de micronúcleos y de otras anomalías nucleares observadas en eritrocitos de *Caiman latirostris* (media \pm EE) en los diferentes grupos de experimentación del tercer ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEE3)

Grupos experimentales	FMN	BN	MU	BIN	NE	ANT
CV	0,43 \pm 0,20	107,86 \pm 4,33	36,00 \pm 3,39	0,14 \pm 0,14	112,00 \pm 10,60	256,00 \pm 11,05
CPF1	2,70 \pm 0,72 #	134,20 \pm 10,20	58,90 \pm 9,03	1,30 \pm 0,45	84,70 \pm 6,68 #	279,10 \pm 14,35
CPF2	3,56 \pm 0,65 ##	128,00 \pm 7,98	51,00 \pm 6,09	0,63 \pm 0,18	80,20 \pm 4,95 #	259,12 \pm 13,69

CV: control vehículo (etanol); CPF1 y CPF2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®.

FMN: Frecuencia de micronúcleos

BN: brotes nucleares

MU: muescas

BIN: eritrocitos binucleados

NE: núcleos excéntricos

ANT: anomalías nucleares totales

#: $p < 0,05$ / ##: $p < 0,01$, significativamente diferente respecto a CV (ANOVA/Dunnett)

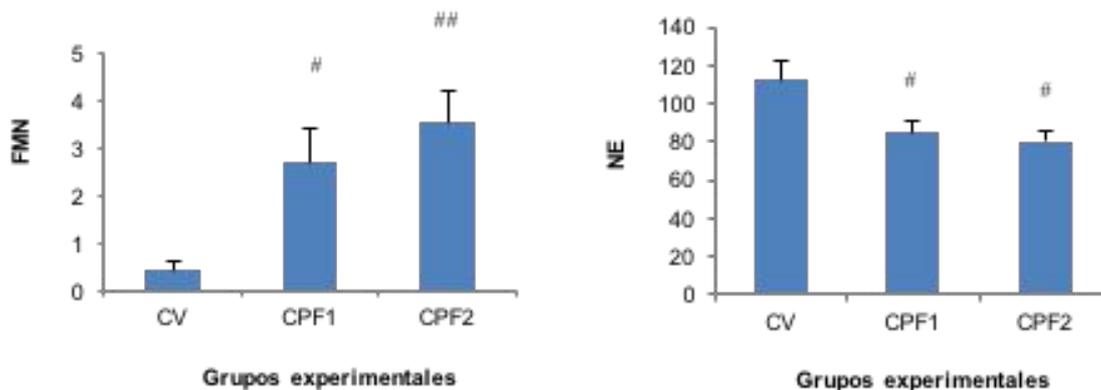


Fig. 3.3 Frecuencia de micronúcleos (FMN) y de núcleos excéntricos (NE), observados en eritrocitos de neonatos de *Caiman latirostris* en los diferentes grupos experimentales del tercer ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN3). CV: control vehículo (etanol); CPF1 y CPF2: grupos expuestos a las diferentes concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®. # $p < 0,05$ / ## $p < 0,01$, diferencia significativa respecto al CV (ANOVA/Dunnett).

Al tener en cuenta los nidos de origen, se observó *efecto nido* en el primer ensayo (EEN1) para MU y NE ($p \leq 0,01$ y $p \leq 0,05$, respectivamente; ANOVA/Tukey).

El análisis de los parámetros de crecimiento mostró una disminución de la talla corporal para las variables de LT y peso en los individuos expuestos a PANZ1 ($p < 0,05$), respecto al CN y en PANZ2 hubo una tendencia similar aunque no llegó a ser significativa ($p=0,063$ en LT y $p=0,05$ en peso). Por el contrario, en los individuos

CAPÍTULO 3

expuestos a END1 se observó un incremento significativo tanto del peso ($p < 0,05$) como de la LHC ($p < 0,01$), en comparación con el CV (**Tabla 3.7**).

Tabla 3.7 Parámetros de Crecimiento (media \pm EE) evaluados en *Caiman latirostris* en los distintos grupos de experimentación del primer ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN1)

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

CN: control negativo; CV: control vehículo (etanol); END1 y END2: grupos expuestos a las concentraciones de Endosulfán Galgofan®; CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de Cipermetrina Atanor®; RU1 y RU2: grupos expuestos a las diferentes concentraciones de Roundup Full II®; PANZ1 y PANZ2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de PanzerGold®.

LT: longitud total

LHC: longitud hocico cloaca

cm: centímetro

g: gramo

*: $p < 0,05$: estadísticamente significativo respecto al CN. #: $p < 0,05$ / ##: $p < 0,01$: estadísticamente significativo respecto al CV (test Kruskal-Wallis / Mann-Whitney).

Se observó una relación concentración-efecto de tipo moderada en la FMN para la formulación PANZ ($R^2=0,409$, $p < 0,001$; **Fig. 3.4**), pero cuando se realizaron las regresiones con los valores de las medias, el ajuste de los datos no fue significativo. ($R^2=0,9615$; $p= 0,126$).

CAPÍTULO 3

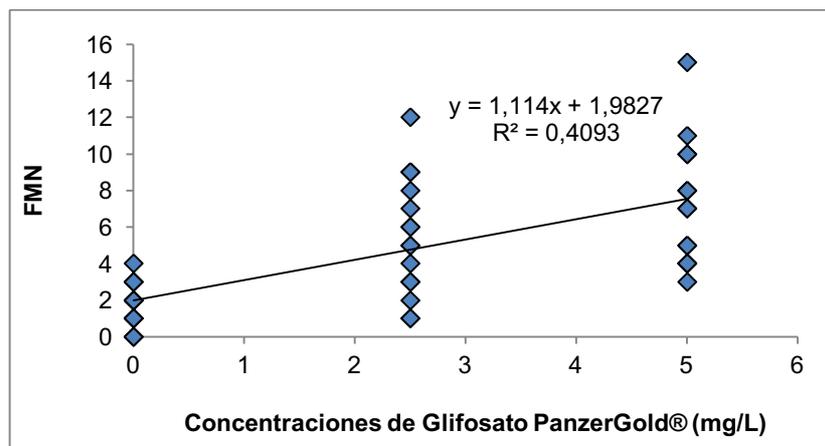


Fig. 3.4 Relación concentración-efecto: Frecuencia de micronúcleos (FMN) en eritrocitos de *Caiman latirostris*-formulación comercial de Glifosato PanzerGold® (2,5 mg/L y 5 mg/L). Primer ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN1). Regresión lineal simple: $R^2 = 0,409$, $p < 0,001$.

En el segundo ensayo de neonatos (EEN2), no hubo diferencias en el crecimiento entre los diferentes grupos experimentales ($p > 0,05$; **Tabla 3.8**). Se encontraron diferencias entre nidos solamente en la LT ($p < 0,01$; ANOVA/Tukey), pero no en las demás variables de crecimiento o de genotoxicidad. Tampoco se observaron relaciones entre las variables de genotoxicidad y los parámetros de crecimiento ($p > 0,05$).

Tabla 3.8 Parámetros de Crecimiento (media \pm EE) evaluados en *Caiman latirostris* en los distintos grupos de experimentación del segundo ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN2)

Grupos experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
CN	5,30 \pm 1,48	2,43 \pm 0,87	44,00 \pm 19,08
CV	6,78 \pm 1,66	2,32 \pm 0,93	71,50 \pm 24,92
END1	5,10 \pm 2,51	3,88 \pm 0,37	78,75 \pm 7,34
END2	7,85 \pm 0,95	4,03 \pm 0,44	8,50 \pm 15,59
CIP1	1,00 \pm 3,75	11,95 \pm 8,25	49,50 \pm 13,50
CIP2	2,33 \pm 2,52	2,50 \pm 0,69	37,00 \pm 19,26
RU1	6,56 \pm 1,14	3,34 \pm 0,62	76,80 \pm 21,92
RU2	3,96 \pm 1,96	1,84 \pm 0,61	29,80 \pm 20,08

CN: control negativo; CV: control vehículo (etanol); END1 y END2: grupos expuestos a las concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes

CAPÍTULO 3

concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; RU1 y RU2: grupos expuestos a las diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®.

LT: longitud total

LHC: longitud hocico cloaca

cm: centímetro

g: gramo

Respecto al efecto dependiente de la concentración, se encontró una relación débil entre las ANT y la formulación RU ($R^2= 0,344$; $p=0,027$), y entre la FMN y la formulación de CIP ($R^2= 0,395$; $p=0,038$). Cuando se realizaron las regresiones con los valores de las medias se obtuvo un mejor ajuste para ANT ($R^2= 0,9977$; $p=0,031$; **Fig 3.5**), pero en el caso de la FMN no fue significativo ($R^2= 0,884$; $p=0,221$).

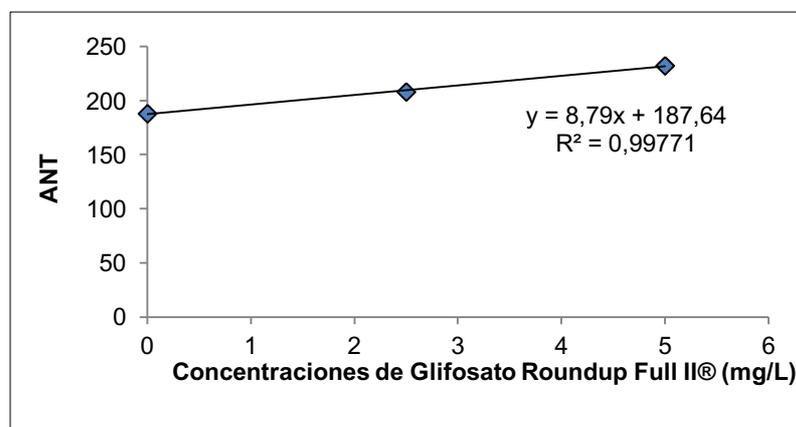


Fig. 3.5 Relación concentración-efecto: media de anomalías nucleares totales (ANT) presentes en eritrocitos de *Caiman latirostris* - formulación comercial del herbicida Glifosato Roundup Full II® (2,5 mg/L y 5 mg/L). Segundo ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN2) *Regresión lineal simple: $R^2 = 0,998$ / $p = 0,031$.*

En el tercer ensayo (EEN3), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre nidos en ninguna de las variables de genotoxicidad analizadas ($p > 0,05$), pero si en los parámetros del crecimiento: LT y LHC ($p < 0,05$; ANOVA/Tukey) y peso (test Kruskal-Wallis / Mann-Whitney aplicando la corrección de Bonferroni, $p \leq 0,016$). No se encontró diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento entre los grupos de experimentación (**Tabla 3.9**), ni relación alguna de estos parámetros con los marcadores de genotoxicidad (FMN/ FANs; $p > 0,05$).

CAPÍTULO 3

Tabla 3.9 Parámetros de Crecimiento (media ± EE) evaluados en *Caiman latirostris* en los distintos grupos de experimentación del tercer ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN3)

Grupos experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
CV	12,24 ± 1,04	6,23 ± 0,71	125,43 ± 16,77
CPF1	11,69 ± 0,67	5,61 ± 0,36	114,00 ± 11,11
CPF2	11,33 ± 0,67	5,49 ± 0,30	115,58 ± 10,36

CV: control vehículo (etanol); CPF1 y CPF2: grupos expuestos a las concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®.

LT: longitud total

LHC: longitud hocico cloaca

cm: centímetro

g: gramo

Finalmente, en cuanto al efecto dependiente de la concentración, se observó una relación positiva débil de la FMN a medida que aumentaba la concentración de CPF ($R^2=0,314$; $p=0,003$; **Fig 3.6**), pero al relizar la regresión con los valores de las medias, no se observó un resultado significativo ($R^2= 0,936$ / $p=0,163$).

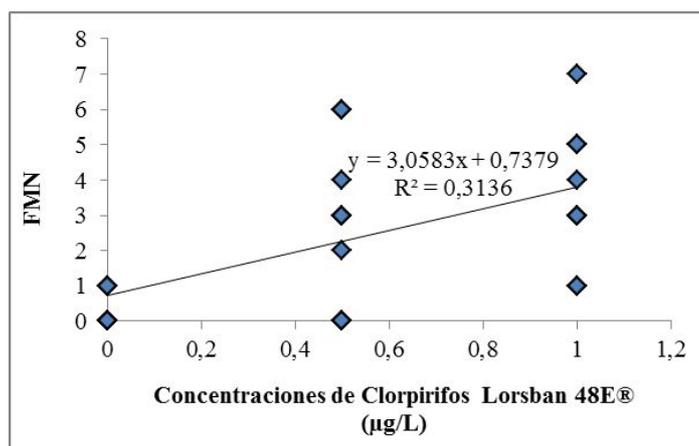


Fig. 3.6 Relación concentración-efecto Frecuencia de micronúcleos (FMN) - concentraciones de la formulación comercial de Clorpirifos: Lorsban 48E® (0,5 µg/L y 1 µg/L). Tercer ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN3). Regresión lineal simple: $R^2=0,3136$ / $p=0,003$.

3.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES DEL CAPÍTULO

En el presente Capítulo, se volvió a constatar, que las formulaciones comerciales de plaguicidas inducen diferentes efectos genotóxicos en *C. latirostris*, en este caso en neonatos durante sus primeros meses de vida, en condiciones controladas de exposición.

CAPÍTULO 3

Se sabe que el aumento en la frecuencia de las anomalías nucleares (MN y ANs) es indicativo de una reacción celular adversa. Se propone que la presencia de estas formaciones en los eritrocitos serían restos de material genético no incorporados durante la división celular o bien, se trataría de material dañado que la célula desecha por los mecanismos de reparación internos y que, por fallas o interrupciones en la exocitosis no pueden eliminarse completamente y permanecerían en la periferia de la membrana nuclear dando lugar a las diferentes formaciones (Barni et al., 2007; Seriani et al., 2011; Harabawy y Mosleh, 2014; Melo et al., 2014).

Para los ensayos de exposición *in vivo* de neonatos, el daño genotóxico fue mayormente comprobado por el test de MN, lo cual coincide con lo observado en los ensayos de exposición embrionaria (EEE: exposición *in ovo*- Capítulo 2). En el primer ensayo (EEN1) pudimos ver efectos evidenciados por la FMN en la gran mayoría de los grupos experimentales, y para todas las formulaciones testeadas (END, CIP, RU y PANZ). Respecto a la frecuencia de otras ANs, solamente se encontró una inducción significativa de los BN y de NE en los grupos expuestos a las formulaciones de los insecticidas END y CIP comparados con ambos controles (CN y CV). Sin embargo, no se observó repetitividad de resultados entre EEN1 y EEN2, ya que en este último caso no hubo evidencias de daño genotóxico. Esto pudo deberse a varios factores incluyendo un efecto de nido más marcado, a la variabilidad en la respuesta individual por susceptibilidad o resistencia de algunos individuos, a la sensibilidad como consecuencia del efecto de ciertas concentraciones, como se postuló para los ensayos de exposición embrionaria (EEE) entre otros, factores que se discuten a continuación.

En el tercer ensayo (EEN3), se demostró que el CPF resultó genotóxico a ambas concentraciones según datos de la FMN. En cuanto a las FANs, la respuesta fue más acotada, observándose diferencias sólo para NE, cuya frecuencia en ambos grupos expuestos fue significativamente menor que en el CV. Por el contrario, en el primer ensayo (EEN1) se había observado un incremento significativo en las mismas inducido por END y CIP.

Barni et al. (2007) hipotetizaron que la existencia de eritrocitos anucleados con presencia de MN en la especie *Rana snk esculenta* expuestas a aguas contaminadas principalmente por compuestos derivados de cultivos de arrozceras, provendrían de la división celular de eritrocitos con NE. En nuestros estudios, no se han observado eritrocitos anucleados de manera significativa en *C. latirostris* en respuesta a la exposición a formulaciones plaguicidas, pero podríamos suponer que los eritrocitos con NE no habrían llegado a dividirse como producto de una interrupción en la división

CAPÍTULO 3

celular, al igual que para el caso de la formación de eritrocitos BIN, como se describió en el Capítulo 2. De esta manera, menos células estarían entrando en división celular debido a alguna alteración que impide la evolución del ciclo celular, probablemente por un daño no reparado en el material genético. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el EEN3, donde se observó una disminución de los NE a las diferentes concentraciones de CPF en relación al grupo no expuesto (CV), podríamos suponer un posible efecto citotóxico de los eritrocitos con NE en estos grupos.

Resultados similares se obtuvieron previamente con la FMN en *C. latirostris* expuestos *in vivo* a la formulación RU, bajo iguales condiciones de experimentación y a iguales concentraciones (López González et al., 2013), lo que confirmaría la genotoxicidad *in vivo* de esta formulación evidenciada por el test de MN. Sin embargo en lo que respecta al segundo ensayo (EEN2), no se observaron diferencias significativas, lo que podría explicarse por una resistencia diferencial de los nidos utilizados en ese ensayo, este comportamiento podría estar probablemente relacionado con las variaciones individuales en la susceptibilidad a la exposición o en los sistemas de protección y reparación del daño, fundamentalmente en la velocidad del ciclo eritropoyético relacionado con la cinética celular y con el constante reemplazo de eritrocitos dañados respecto a los no dañados (Harabawy y Mosleh, 2014; Jindal y Verma, 2015).

De manera similar a lo reportado en nuestro trabajo, estudios publicados anteriormente en otras especies, utilizando concentraciones muy similares demostraron, que la formulación RU induce un incremento de daño al ADN a través de ensayo cometa, FMN y de ANs en los peces *Carassius auratus* y *Anguilla anguilla* (Cavas y Könen, 2007; Guilherme et al., 2010). Con formulaciones de PANZ (48% p.a.), se encontraron efectos similares respecto a la FMN (Vera-Candioti et al., 2013a) en peces de la especie *C. decemmaculatus*. Por otra parte, para el caso de las formulaciones de CPF, Yin et al. (2009) demostraron un efecto genotóxico evidenciado por la presencia de MN, ANs e incremento del ID en anuros (*Bufo bufo gargarizands*) expuestos bajo condiciones controladas de exposición, a cinco concentraciones de prueba (0,32; 0,64; 0,72; 1,08 y 2,56 µg/L -40% p.a.). Con la misma formulación de CPF utilizadas en este trabajo, Vera-Candioti et al. (2013b), demostró un incremento en la FMN en peces (*C. decemmaculatus*), expuestos a concentraciones entre 8 y 25 µg/L durante 48 y 96 hs. Por su parte, efectos genotóxicos también fueron observados para otras formulaciones de END: Crupkin et al. (2013) expuso durante 24 hs. a peces de *Australoheros facetus*, presentándose un incremento en la FANs (0,02 µg/L) y en la

CAPÍTULO 3

FMN (5 µg/L). Para la formulación de CIP se encontró también un incremento de la FMN a un rango de concentraciones similares a las que nosotros aplicamos (0,4; 0,8 y 1,2 µg /L) en 48 y 72 hs. de exposición en peces de la especie de *Channa punctata* (Ansari et al., 2011).

Los resultados de esta etapa de evaluación no mostraron relación entre los biomarcadores de genotoxicidad y los parámetros de crecimiento en ninguno los ensayos, demostrando que la genotoxicidad inducida por los compuestos testeados es independiente del tamaño y estado de desarrollo de los animales.

Los parámetros del crecimiento de los neonatos expuestos sólo se vieron afectados en el primer ensayo (EEN1) a las menores concentraciones de las formulaciones de PANZ y END, pero no en los demás grupos ni ensayos. Para el caso del END, los animales de ese grupo de experimentación presentaron un aumento significativo en el peso y en la LHC, respecto a los individuos del CV. Este hecho, podría justificarse teniendo en cuenta que se ha indicado que END, por tratarse de un potente disruptor endócrino puede tener un efecto obesogénico ambiental. Se considera que estos compuestos están muy relacionados con el metabolismo e interfieren en la función hormonal en las etapas tempranas del desarrollo, asociadas en gran parte a la homeostasis del peso (de Cook y van de Bor, 2014). Algunos autores sugieren que la exposición temprana a estos tóxicos puede tener efectos diferentes en comparación con la edad adulta, ya que las perturbaciones durante las etapas de plasticidad del desarrollo pueden dar lugar a efectos más profundos (Newbold, 2010). La alteración endocrina en las primeras etapas de la vida parece ser un mecanismo plausible para manifestar una predisposición de sobrepeso posterior en función del efecto causado por los compuestos obesógenos durante el período prenatal o postnatal temprano (de Cook y van de Bor, 2014). Esta podría ser una posible explicación al efecto observado en los caimanes luego de la exposición a END en los animales del primer ensayo (EEN1) que presentaron aumentos de talla. Los reptiles presentan un cuerpo graso, órgano adiposo cuyo tamaño y morfología se asocia al estado nutricional y/o la demanda energética. Se ha reportado previamente sobre la vulnerabilidad de neonatos del yacaré negro y yacaré overo, a la acción de los disruptores endócrinos, con un correspondiente aumento de masa en el cuerpo graso luego de exposición natural a compuestos orgánicos persistentes (COP's) y bajo condiciones controladas de laboratorio (Canesini et al., 2013).

La hipótesis del obesógeno ambiental predice que existe una activación inadecuada de los receptores que conducirían directamente a la diferenciación de adipocitos y a

CAPÍTULO 3

trastornos metabólicos que disminuirían el gasto calórico, predisponiendo a los individuos expuestos a la obesidad (Grün y Blumberg, 2006).

Con la formulación de PANZ el efecto fue inverso, ocurrió que los individuos de este ensayo crecieron menos respecto que los del control, esta diferencia se evidenció para la LT y el peso. Dicha disminución, estaría en parte relacionada a las alteraciones producidas por el herbicida sobre los procesos metabólicos de detoxificación que implicaría además un gasto energético mayor. Poletta et al. (2011) observaron con la formulación de RU de manera independiente, y en mezcla con CIP y END, alteraciones de la actividad enzimático-metabólica y efectos en el crecimiento a los caimanes a los 3 meses de edad luego de la exposición *in ovo* de manera semi-natural a estos compuestos. Ese consumo energético adicional, les implicaría a los organismos utilizar sus reservas nutricionales produciendo un descenso en el crecimiento.

Tal como fue señalado en el Capítulo anterior, los primeros meses de vida son cruciales para el desarrollo en los reptiles, ya que presentan la mayor tasa de crecimiento y cualquier alteración sobre los procesos bioenergéticos subyacentes provocarían una reducción en la tasa de crecimiento normal. Estos procesos pueden modificarse por contaminantes, dependiendo de las concentraciones y el tiempo de exposición, siendo en muchos casos, los efectos no evidentes en forma inmediata (Michelmore et al., 2005; Amaral et al., 2012a).

Nuestros ensayos tuvieron una duración de dos meses de exposición, y no se visualizaron alteraciones significativas en el crecimiento de los animales en la mayoría de los grupos expuestos. Debemos considerar que este es un tiempo relativamente corto de exposición para que se observe un efecto negativo generalizado sobre el crecimiento (de retraso o inducción) en los animales expuestos. Cabe destacar, sin embargo, que en los ambientes naturales, estos animales reciben exposiciones repetidas durante el primer año de vida, ya que las mismas se realizan varias veces durante el año y con diversos compuestos, dependiendo de la existencia de rotaciones de cultivo y la siembra de la soja de primera o segunda, sumado a la falta de disponibilidad de alimento en esos ambientes ampliamente fragmentados. Muchas aplicaciones se dan a principios de otoño, período en el cual los animales deben adquirir energía para sobrevivir al invierno, con temperaturas extremadamente bajas, que inducen el cese de la alimentación y, por ende, la falta de reservas nutricionales, además del riesgo que implica presentar un tamaño muy reducido en relación a los depredadores (Larriera et al., 2008; Amaral et al., 2012b). En condiciones naturales,

CAPÍTULO 3

estos animales se verían afectados no sólo durante los períodos de aplicaciones de plaguicidas, sino también durante un período significativo luego de las aspersiones por la perdurabilidad de estos compuestos en el ambiente.

En nuestro país estudios recientes han reportado que existen residuos de diferentes tipos de plaguicidas en ecosistemas acuáticos principalmente y en suelos de la región pampeana (Primost et al., 2013; Carriquiriborde et al., 2014; Lupi et al., 2015; Astroviza et al., 2016; Ronco et al., 2016). Estos animales pasan la mayor parte del tiempo en cuerpos de agua someros, siendo las crías mayormente susceptibles a estas exposiciones simultáneas durante la etapa crítica del desarrollo.

El efecto nido para los ensayos en neonatos (EEN), al igual que para los ensayos embrionarios (EEE), resultó ser evidente en particular asociado a los parámetros de crecimiento, que mostraron diferencia en todos los ensayos. En el caso de los biomarcadores de genotoxicidad sólo mostraron dependencia en el primer ensayo (EEN1) y para las ANs de tipo MU y NE. Estos resultados demostraron nuevamente, la variabilidad de respuestas presentes entre los cocodrilianos respecto a sus nidos de origen, en particular en relación al crecimiento, donde se sabe que los animales que provienen de nidos distintos crecen a tasas diferentes durante el primer año de vida (Verdade et al., 1997), como fue explicado en el Capítulo 2.

Nuestros resultados coinciden con estudios previos que indicaron relaciones en cuanto al aumento de las concentraciones de plaguicidas y el correspondiente aumento en la FMN y/o FANs: con formulaciones de CIP (Ansari et al., 2011), GLI (Poletta et al., 2009; López González et al., 2017) y CPF (Yin et al., 2009; Vera-Candioti et al., 2013b). Sin embargo en algunos casos no se observó dicha relación, lo cual puede atribuirse a la variabilidad en la respuesta individual dentro de cada grupo experimental, en los diferentes ensayos de exposición y dependiendo de cada formulación de plaguicidas aplicadas en este trabajo de Tesis, tal como se observaron en los ensayos de exposición embrionaria (Capítulo 2).

Dentro de los estudios complementarios en ecotoxicología, es necesario llevar a cabo ensayos bajo condiciones controladas de exposición, que nos permitan establecer las posibles relaciones causales entre las exposiciones a los contaminantes y las variables alteradas, a fin de establecer cuáles son los biomarcadores más adecuados para los estudios a campo, principalmente en cuanto a la especificidad y sensibilidad de cada biomarcador empleado (Carballo y Mudry, 2006). Es importante que esto se realice en cada estadio de la especie que demuestre un riesgo de exposición real en la naturaleza, como son para *C. latirostris*, principalmente los embriones y crías.

CAPÍTULO 3

En estos estudios, al igual que lo que se había observado en los ensayos de exposición embrionaria (EEE), la FMN demostró ser el mejor biomarcador de genotoxicidad en neonatos expuestos a concentraciones de plaguicidas aplicadas en cultivos de soja en nuestro país, como es el caso de las formulaciones herbicidas, y otras muy inferiores a eso, en el caso de los insecticidas. Otras ANs, particularmente los NE y en menor medida los BN, respondieron a la exposición a algunos compuestos en ciertos ensayos, pero no en forma consistente, como se han observado en los ensayos de exposición embrionaria (EEE; Capítulo 2). Estos resultados complementan y amplían la información ya obtenida en la especie sobre efectos tóxicos de los plaguicidas en diferentes parámetros en crías (Latorre et al., 2013; López González et al., 2013, Siroski et al., 2016) y embriones (Poletta et al., 2009; 2011; Burella et al., 2016; López González et al., 2017).

La aplicación de estos ensayos *in vivo* bajo condiciones controladas de exposición, nos permitió aportar más conocimiento a la evaluación integrada sobre los efectos y mecanismos de toxicidad de plaguicidas y arribar a conclusiones sobre los efectos deletéreos producidos a nivel orgánico. A partir de estos estudios, puede obtenerse información relevante para tomar decisiones sobre como intervenir en estudios poblacionales de *C. latirostris*, naturalmente expuestos a plaguicidas.

CAPÍTULO 4

Ensayos de exposición a mezclas de formulaciones comerciales de Cipermetrina, Clorpirifos, Endosulfán y Glifosato en embriones y neonatos de *Caiman latirostris*

4.1 INTRODUCCIÓN

Cada formulación comercial de plaguicidas consiste en una mezcla compleja de sustancias químicas que contienen aditivos, tales como vehículos, emulsionantes, tensoactivos o adyuvantes que se agregan al p.a. para mejorar las propiedades físicas y químicas de cada producto, y facilitar la penetración al organismo blanco. Sumado a ello, con el objetivo de ahorrar tiempo y recursos, en las prácticas agrícolas se suelen mezclar, en un mismo tanque de aplicación, varias formulaciones plaguicidas con distintos p.a., aditivos y para distintos organismos blanco, sin tener en cuenta que las formulaciones están diseñadas para ser usadas individualmente y disueltas en agua (Coalova et al., 2013).

De esta manera, la exposición de las poblaciones naturales a plaguicidas, se da en forma de mezclas complejas y son influenciadas por distintos factores ambientales, siendo poco factible calcular el grado de la exposición (Beyer et al., 2014).

En función de ello, en los últimos años, cada vez se realizan más trabajos referidos a evaluaciones de mezclas complejas en condiciones controladas, compuestas por insecticidas y/o herbicidas, que reportan efectos a distintos niveles de organización (de Sola y Martin, 2011; Uggini et al., 2010; Poletta et al., 2011; en prensa; Paracampo et al., 2012; Demetrio et al., 2014; de Sola et al., 2014; Bonifacio et al., 2016; Brodeur et al., 2014; 2016; Soloneski et al., 2016; Svartz et al., 2016).

Previamente, se ha demostrado que una mezcla compleja compuesta por END, CIP, y GLI, las mismas formulaciones utilizadas en este trabajo de Tesis, provocó efectos genotóxicos evidenciados por el ensayo cometa y test de MN, así como alteraciones metabólicas y enzimáticas en neonatos de *C. latirostris* luego de la exposición de los nidos por fumigación, en condiciones seminaturales (*in ovo*) (Poletta et al., 2011). Teniendo en cuenta que ésta es la única referencia de evaluación de mezclas de plaguicidas en esta especie, se propuso realizar ensayos de exposición a mezclas complejas de formulaciones (M) en las mismas condiciones que las evaluaciones de los compuestos por separado, previamente realizadas en los ensayos de exposición embrionaria y de neonatos (EEE y EEN), descritas en los Capítulos 2 y 3 respectivamente, de este trabajo de Tesis. El objetivo de estos ensayos de exposición fue analizar el efecto de la interacción entre las distintas formulaciones, por lo que se llevaron a cabo diferentes ensayos utilizando mezclas de dos y tres compuestos, en embriones (*in ovo*) y neonatos (*in vivo*).

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 COMPUESTOS QUÍMICOS

Para las evaluaciones llevadas a cabo en este ensayo, se utilizaron las mismas formulaciones que se describieron en **2.2.1** y **3.2.1**.

4.2.2 EJEMPLARES DE *Caiman latirostris*

Se utilizaron ejemplares de yacaré overo (huevos y neonatos) colectados de la Reserva Natural Manejada "El Fisco". La recolección, traslado, selección de los nidos y huevos, la crianza de pichones (previa al experimento de exposición de neonatos), y la obtención de muestras de sangre al finalizar los experimentales se realizaron en iguales condiciones que las descritas para los ensayos de exposición embrionaria (EEE *in ovo*: topicación/pulverización, Capítulo 2) y los ensayos de exposición de neonatos (EEN *in vivo*, por inmersión, Capítulo 3).

4.2.3 ENSAYOS DE EXPOSICIÓN A MEZCLAS DE PLAGUICIDAS FORMULADOS

Para estos ensayos, se utilizaron mezclas de los mismos formulados comerciales de plaguicidas aplicados en los ensayos de exposición embrionaria y de neonatos (EEE y EEN), como se mencionó en **4.2.1**. Se evaluaron mezclas complejas de estas formulaciones tanto para los ensayo de exposición embrionaria (por topicación y por pulverización), como para los ensayos de exposición de neonatos. Las mezclas evaluadas fueron las siguientes: mezclas de tres formulaciones: GLI+CIP+ CPF en embriones y neonatos y GLI+CIP+END en neonatos; mezclas de dos formulaciones: GLI+CPF, GLI+CIP y CPF+CIP, sólo en neonatos.

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

Se evaluó la mezcla de tres formulaciones: GLI, CIP y CPF. En ambos ensayos fueron consideradas las condiciones de experimentación detalladas en Capítulo 2 (**2.2.3**) y las condiciones de cada tipo de exposición (topicación y pulverización) también como se detalló en: **2.2.3.1** y **2.2.3.2**.

4.2.3.1.1 POR TOPICACIÓN SOBRE LA CÁSCARA DE HUEVOS

EEEMt₁: Se utilizaron huevos provenientes de 3 nidos (8 huevos de cada uno) cosechados de la Reserva Natural Manejada "El Fisco" (2.2.2), que fueron distribuidos en forma equitativa en 2 grupos experimentales de 12 huevos cada uno (6 en cada duplicado; N total= 24 huevos): **1)** Grupo control: CV (con etanol) y **2)** la M de: GLI (RU) + CIP + CPF. En la **Tabla 4.1** se detallan los grupos experimentales de este ensayo.

La topicación de la M consistió en la aplicación de los compuestos directamente sobre la cáscara de los huevos y en una única aplicación. Se utilizó una mezcla de formulaciones a concentraciones efectivas determinadas en los ensayos de exposición a las formulaciones por separado, presentados en el Capítulo 2. En el caso de GLI se seleccionó la concentración más baja, 500 µg/huevo, mientras que para los insecticidas CIP y CPF se utilizó la segunda concentración más baja, 10 µg/huevo.

Tabla 4.1 Grupos experimentales del ensayo de exposición embrionaria de *Caiman latirostris* a mezclas por topicación (EEEMt) con las formulaciones comerciales de Glifosato, Cipermetrina y Clorpirifos

Grupos experimentales	Compuestos	Concentraciones	N° huevos/nido	N
CV	Etanol	50 µl/huevo	4	12
M	GLI + CIP + CPF	500 + 10 + 10 (µg/huevo)	4	12

CV: control vehículo; M (GLI + CIP + CPF): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato - RoundupFull II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. (p.a.: principio activo); N° huevos/nido: número de huevos expuestos de cada nido por grupo experimental; N: número total de huevos por grupo de experimentación.

EEEMt₂: En este ensayo se realizó la repetición del ensayo de exposición embrionaria de mezclas de formulados por topicación sobre la cáscara de huevos (EEEMt₁), en iguales condiciones experimentales que el anterior ensayo, con el propósito de corroborar los resultados obtenidos.

4.2.3.1.2 POR PULVERIZACIÓN SOBRE EL MATERIAL DE NIDO

EEEMp: En el caso de la exposición embrionaria indirecta por pulverización sobre el material de nido, y también como ocurrió para el testeo de las formulaciones por separado, se aplicaron concentraciones equivalentes a la aplicación a campo (c.c.) recomendadas para cultivos de soja RR de los formulados comerciales: CPF

CAPÍTULO 4

(Lorsban®, 48% p.a.), CIP (Atanor®, 25% p.a.), y la formulación comercial del herbicida GLI (RoundupFull II® -RU, 66,2% p.a.): c.c. 0,8%, 0,12% y 2%, respectivamente y la mitad de las mismas (1/2 c.c.), considerando para este último caso la simulación de la posible llegada de los compuestos por deriva o escorrentía (a través de agua, aire o suelo) como ocurriría en la naturaleza. Al igual que en el ensayo pulverización de plaguicidas individuales sobre el material de nido, se tomó como referencia la superficie de base de las bandejas de experimentación como área a pulverizar (0,0340m²).

Siendo los 3 grupos de experimentación para este ensayo el -CN: compuesto por agua potable declorada, y dos grupos para la M: M c.c. y M 1/2 c.c., tal como se detallan en la **Tabla 4.2**, los valores de las concentraciones de los componentes de la M se expresan en porcentaje (%).

Cada grupo de experimentación presentó un total 12 huevos (N total=36), 6 en cada duplicado, provenientes de 3 nidos cosechados en la naturaleza (12 huevos de cada nido). Todos los huevos para este ensayo también siguieron los procedimientos explicados en el Capítulo 2. (2.2.3.2) y tomando como referencias estudio de pulverización sobre material de nido ya reportados en la especie (Poletta et al., 2011).

Tabla 4.2 Grupos experimentales del ensayo de exposición embrionaria de *Caiman latirostris* a mezclas por pulverización (EEEMp) con las formulaciones comerciales de Glifosato, Cipermetrina y Clorpirifos

Grupos experimentales	Compuestos	Concentraciones	N° huevos/nido	N
CN	Agua potable declorada	3,5 ml	4	12
M 1/2 c.c.	GLI 1/2 c.c. + CIP 1/2 c.c. + CPF 1/2 c.c.	1 + 0,06 + 0,4 (%)	4	12
M c.c.	GLI c.c. + CIP c.c. + CPF c.c.	2 + 0,12 + 0,8 (%)	4	12

CN: control negativo; M c.c. (GLI c.c. + CIP c.c. + CPF c.c.) y M ½ c.c. (GLI (RU) ½ c.c. + CIP ½ c.c. + CPF ½ c.c.); grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato -RoundupFull II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. (p.a.: principio activo); c.c.: concentraciones aplicadas a campo; ½ c.c.: mitad de las concentraciones aplicadas a campo; N° huevos/nido: número de huevos de cada nido expuestos por grupo experimental; N: número de total de huevos por grupo de experimentación.

En todos los ensayos, una vez producido los nacimientos se registraron las mismas variables que las descritas en el Capítulo 2: éxito de eclosión, registro de malformaciones externas, tamaño al nacer de cada individuo, además del análisis de los biomarcadores de genotoxicidad planteados (MN y otras ANs).

4.2.3.2 ENSAYOS DE EXPOSICIÓN DE NEONATOS (IN VIVO)

El diseño experimental y tratamientos, número de individuos utilizados, su distribución, así como las condiciones experimentales de exposición y crianza, fueron exactamente las mismas que en el ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN; Capítulo 3). Las concentraciones utilizadas en estos casos fueron siempre las concentraciones más bajas aplicadas de los compuestos por separado (c.c.1/2).

4.2.3.2.1 EVALUACIÓN DE NEONATOS EXPUESTOS A MEZCLAS DE TRES FORMULACIONES

EENM₁ (Glifosato, Cipermetrina y Endosulfán): Se utilizaron para este ensayo un total de 24 individuos (neonatos de 20 días de edad) provenientes de 3 nidos cosechados de la naturaleza de la Reserva Natural: "El Fisco", seleccionando 8 huevos de cada nido para este experimental. La cosecha de los nidos, traslado y selección, así como la duración y las condiciones experimentales, fueron exactamente las mismas que se detallaron en 3.2.2 y 3.2.4.

Los individuos se distribuyeron al azar en 2 grupos experimentales de 12 neonatos cada uno: un CV con etanol y un grupo M con la mezcla de formulaciones a base de GLI, CIP y END, cuyas concentraciones se redujeron progresivamente en el tiempo durante los dos meses del experimento, al igual que en los el ensayo de exposición de neonatos por inmersión (EEN) descriptos en el Capítulo 3 (**Tabla 4.3**).

Tabla 4.3 Grupos experimentales aplicados en el primer ensayo de exposición de neonatos de *Caiman latirostris* por inmersión a Mezclas con las formulaciones comerciales de Glifosato, Cipermetrina y Endosulfán (EENM₁)

Grupos experimentales	Compuestos	Concentración		N° indiv. exp./ nido	N
		inicial	final		
CV	Etanol	200 µl/L	200 µl/L	4	12
M	GLI + CIP + END	2,5 mg/L+ 0,5 µg/L + 0,5µg/L	0,25 mg/L + 0,05 µg/L + 0,05 µg/L	4	12

CV: control vehículo; M (GLI + CIP + END): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato – Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Endosulfán Galgofan®, 35% p.a. (p.a.: principio activo); N° indiv. exp./nido: número de individuos expuestos de cada nido por grupo experimental; N: números de individuos totales por grupo de experimentación.

EENM₂ (Glifosato, Cipermetrina y Clorpirifos): Este ensayo, presentó las mismas condiciones experimentales que el primer ensayo de mezclas en neonatos (EENM₁: cantidad de nidos, individuos, condiciones de exposición y crianza, mantenimiento y duración), con la única diferencia de que se reemplazó la formulación de END por la

CAPÍTULO 4

de CPF, con motivo de su prohibición en nuestro país (Res. 511/2011; SENASA, 2011), como fue desarrollado en Capítulo 1: apartado 1.2.2.2.

Las concentraciones aplicadas de cada compuesto en la M₂ se describen en la **Tabla 4.4**.

Tabla 4.4 Grupos experimentales del segundo ensayo de exposición de neonatos en *Caiman latirostris* por inmersión a Mezclas con las formulaciones comerciales de Glifosato, Cipermetrina y Clorpirifos (EENM₂)

Grupos experimentales	Compuestos	Concentración		N° indiv. exp./ nido	N
		inicial	final		
CV	Etanol	200 µl/L	200 µl/L	4	12
M	GLI + CIP + CPF	2,5 mg/L + 0,5 µg/L + 0,5µg/L	0,25 mg/L + 0,05 µg/L + 0,05 µg/L	4	12

CV: control vehículo; M (GLI + CIP + CPF): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato – Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. (p.a.: principio activo); N° indiv. exp./nido: número de individuos expuestos de cada nido por grupo experimental; N: números de individuos totales por grupo de experimentación.

4.2.3.2.2 EVALUACIÓN DE NEONATOS EXPUESTOS A MEZCLAS DE DOS FORMULACIONES

EENM₃ (Glifosato+Clorpirifos; Cipermetrina+Glifosato y Clorpirifos+Cipermetrina): La evaluación de la exposición de neonatos *in vivo* a mezclas de formulados comerciales de plaguicidas de a pares, (EENM₃), se llevó a cabo con la finalidad de determinar las diferentes interacciones en estas condiciones, respecto a los compuestos individuales y a las mezclas de los tres componentes, para interpretar la posible existencia de efectos antagónicos, aditivos o sinérgicos.

Se utilizaron en total 48 individuos nacidos de huevos provenientes de 3 nidos diferentes (8 ejemplares de cada nido), y separados aleatoriamente en 4 grupos de experimentación compuestos de 12 individuos cada uno (**Tabla 4.5**). Este ensayo se realizó bajo las mismas condiciones experimentales que el EENM₁ y 2: cantidad de nidos, individuos, condiciones de crianza previa y exposición, mantenimiento y duración de los ensayos.

CAPÍTULO 4

Tabla 4.5 Grupos experimentales del tercer ensayo de exposición de neonatos de *Caiman latirostris* por inmersión a Mezclas de las formulaciones comerciales de Glifosato+Clorpirifos; Cipermetrina+Glifosato; Clorpirifos+Cipermetrina (EENM₃)

Grupos experimentales	Compuestos	Concentración		N° indiv. exp./ nido	N
		inicial	final		
CV	Etanol	200 µl/L	200 µl/L	3	12
M 1	GLI + CPF	2,5 mg/L+ 0,5µg/L	0,25 mg/L + 0,05 µg/L	3	12
M 2	GLI + CIP	2,5 mg/L+ 0,5µg/L	0,25 mg/L + 0,05 µg/L	3	12
M 3	CIP + CPF	0,5 µg/L + 0,5µg/L	0,05 µg/L + 0,05 µg/L	3	12

CV: control vehículo; M₁: GLI + CPF: grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a.; M₂: grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato RoundupFull II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a.; M₃: grupo experimental de mezcla de los formulados: Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. (p.a.: principio activo); N° indiv.exp./nido: número de individuos expuestos de cada nido por grupo experimental; N: números de individuos totales por grupo de experimentación.

4.2.4 VARIABLES REGISTRADAS

Para todos los de ensayos de exposición de neonatos a mezclas (EENM) se registró el crecimiento por grupo de experimentación (LT, LHC y peso), durante los ensayos, y se aplicaron los biomarcadores de genotoxicidad planteados: test de MN y otras ANs (BN, MU, BIN, NE y ANT) en eritrocitos de sangre periférica de cada caiman, como fue descrito en los Capítulos 2 y 3.

4.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

Las diferencias entre duplicados de cada grupo experimental se analizaron mediante un test *t*.

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

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

En todos los casos las variables de agrupamiento fueron los tratamientos y los nidos.

CAPÍTULO 4

La relación entre los parámetros de tamaño (LT, LHC y peso) con los biomarcadores de genotoxicidad se determinaron mediante análisis de *Regresiones lineales simples*.

El valor de $p \leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo, excepto para el caso donde se aplicó la corrección de Bonferroni, que se indica en cada caso.

4.3 RESULTADOS

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

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

Para el primer ensayo de topicación (EEEM_{t1}), se observó un incremento de la FMN en los pichones del grupo expuesto a la M (RU+CIP+CPF) comparados con el CV ($p = 0,016$), pero no se observaron diferencias significativas para las otras ANs ($p > 0,05$ -**Tabla 4.6**).

Tabla 4.6 Frecuencia de micronúcleos y de otras anomalías nucleares (media \pm EE) observados en eritrocitos de *Caiman latirostris* en el primer ensayo de exposición embrionaria a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas por topicación (EEEM_{t1})

Grupos experimentales	FMN	BN	MU	BIN	NE	ANT
CV	0,56 \pm 0,34	104,56 \pm 16,81	24,67 \pm 5,91	0,78 \pm 0,43	74,11 \pm 7,73	178,67 \pm 15,08
M	3,29 \pm 0,94 #	103,57 \pm 11,81	21,00 \pm 2,43	0,43 \pm 0,30	72,43 \pm 11,17	176,00 \pm 10,56

CV: control vehículo; M (GLI + CIP + CPF): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. (p.a.: principio activo)

FMN: frecuencia de micronúcleos

BN: brotes nucleares

MU: muescas

BIN: eritrocitos binucleados

NE: núcleos excéntricos

ANT: anomalías nucleares totales

#: Estadísticamente significativo respecto al CV ($p < 0,05$).

Del mismo modo, para la repetición de este ensayo (EEEM_{t2}) se observó el mismo efecto en la FMN ($p = 0,004$; test *t*- **Tabla 4.7**), y la falta de efecto en las otras ANs, respecto al grupo de control.

CAPÍTULO 4

Tabla 4.7 Frecuencia de micronúcleos y de otras anomalías nucleares (media \pm EE) observados en eritrocitos de *Caiman latirostris* en la repetición del ensayo de exposición embrionaria a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas por topicación (EEEM_{t2})

Grupos experimentales	FMN	BN	MU	BIN	NE	ANT
CV	1,25 \pm 0,48	99,25 \pm 7,60	54,25 \pm 4,90	1,25 \pm 0,95	58,50 \pm 14,25	214,50 \pm 23,84
M	7,25 \pm 1,60 ##	119,50 \pm 17,99	46,25 \pm 8,37	3,00 \pm 0,41	69,75 \pm 30,34	245,75 \pm 55,66

CV: control vehículo; M (GLI + CIP + CPF): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. (p.a.: principio activo)

FMN: frecuencia de micronúcleos

BN: brotes nucleares

MU: muescas

BIN: eritrocitos binucleados

NE: núcleos excéntricos

ANT: anomalías nucleares totales

/ ##: Estadísticamente significativo respecto al CV ($p < 0,05$ / $p < 0,01$).

En lo que respecta a los resultados obtenidos para del ensayo de exposición embrionaria por pulverización de mezclas: EEEMp (**Tabla 4.8**), se observaron diferencias estadísticamente significativas para la FMN, en las dos concentraciones testeadas: M c.c. ($p = 0,001$) y M $\frac{1}{2}$ c.c. ($p = 0,002$) comparados con el CN y en la frecuencia de eritrocitos BIN para el grupo de M c.c. respecto al CN ($p = 0,018$).

Tabla 4.8 Frecuencia de micronúcleos y de cada anomalía nuclear (media \pm EE) observados en eritrocitos de *Caiman latirostris* del ensayo de exposición embrionaria a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas por pulverización (EEEMp)

Grupos experimentales	FMN	BN	MU	BIN	NE	ANT
CN	0,43 \pm 0,20	106,71 \pm 12,81	34,71 \pm 4,97	0,43 \pm 0,43	50,43 \pm 5,12	192,71 \pm 21,28
M1/2c.c.	3,78 \pm 0,66 **	91,67 \pm 13,42	27,33 \pm 5,48	1,11 \pm 0,31	52,22 \pm 7,92	176,11 \pm 24,49
Mc.c	4,00 \pm 0,59 **	108,92 \pm 6,16	39,42 \pm 4,48	2,25 \pm 0,49 *	55,17 \pm 3,11	209,75 \pm 8,94

CN: control negativo con agua potable declorada; M c.c. (GLI c.c. + CIP c.c. + CPF c.c.) y M $\frac{1}{2}$ c.c. (GLI $\frac{1}{2}$ c.c. + CIP $\frac{1}{2}$ c.c. + CPF $\frac{1}{2}$ c.c.): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. (p.a.: principio activo); c.c.: concentraciones aplicadas a campo; $\frac{1}{2}$ c.c.: mitad de las concentraciones aplicadas a campo.

FMN: frecuencia de micronúcleos

BN: brotes nucleares

MU: muescas

BIN: eritrocitos binucleados

NE: núcleos excéntricos

ANT: anomalías nucleares totales

* / **: Estadísticamente significativo respecto al CN ($p < 0,05$ / $p < 0,01$; ANOVA / Dunnett).

Con los datos obtenidos para los 3 ensayos de exposición embrionaria a mezclas (EEEM) se demostró que ninguno de los grupos expuestos produjo efectos sobre el crecimiento de los caimanes al nacer (LT, LHC y peso), ni tampoco se halló relación alguna con las variables de evaluación de genotoxicidad.

CAPÍTULO 4

Por el contrario, sí se observó un *efecto nido*, sólo para las MU en el primer ensayo de exposición embrionaria por topicación a mezclas: EEEMt₁ (Kruskal-Wallis / Mann-Whitney; aplicando la corrección de Bonferroni con un valor $p < 0,016$), y en el de pulverización: EEEMp ($p < 0,01$; ANOVA / Tukey). De manera similar, se observó efecto nido para los parámetros de tamaño en ambos ensayos de exposición embrionaria por topicación a mezclas en LT y peso ($p < 0,01$; ANOVA / Tukey), y sólo en el peso en el ensayo de pulverización a mezclas sobre el material de nido: EEEMp (Kruskal-Wallis / Mann-Whitney; aplicando la corrección de Bonferroni con un valor de $p < 0,016$).

En la **Tabla 4.9** se muestran los valores correspondientes a los parámetros de tamaño al nacer que se obtuvieron en cada ensayo (medias \pm EE), correspondientes a esta etapa de evaluación (*in ovo*).

Tabla 4.9 Parámetros de tamaño corporal (medias \pm EE) evaluados en individuos recién nacidos de *Caiman latirostris* en cada ensayo de exposición embrionaria a Mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas (EEEM)

<u>Ensayos</u>	Grupos experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
EEEMt₁	CV	23,00 \pm 0,64	11,14 \pm 0,07	44,28 \pm 0,98
	M	23,03 \pm 0,31	10,66 \pm 0,26	44,07 \pm 1,36
EEEMt₂	CV	23,38 \pm 0,13	11,25 \pm 0,32	46,25 \pm 0,63
	M	22,40 \pm 1,14	11,38 \pm 0,13	45,25 \pm 1,18
EEEMp	CN	23,86 \pm 0,23	11,30 \pm 0,11	45,79 \pm 2,36
	M ½ c.c.	24,23 \pm 0,20	11,72 \pm 0,17	45,66 \pm 1,92
	M c.c.	23,58 \pm 0,21	11,15 \pm 0,12	44,31 \pm 1,66

EEEMt₁: Ensayo de exposición embrionaria a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas por topicación; EEEMt₂: Repetición del primer Ensayo de exposición embrionaria a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas por topicación; EEEMp: Ensayo de exposición embrionaria a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas por pulverización sobre el material de nido; CV: control vehículo (etanol); M (GLI + CIP + CPF): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. (p.a.: principio activo); CN: control negativo (agua potable declarada); c.c.: concentraciones aplicadas a campo; ½ c.c.: mitad de las concentraciones aplicadas a campo

LT: longitud total

LHC: longitud hocico-cloaca

cm: centímetro

g: gramo

CAPÍTULO 4

En los ensayos de exposición de crías (neonatos) por inmersión a las M de tres componentes (EENM₁ y EENM₂), los resultados indicaron un aumento de la frecuencia de MN ($p= 0,017$) y en la frecuencia de eritrocitos BIN ($p= 0,007$) en el grupo M (RU+CIP+END), respecto al grupo control del primer ensayo de exposición de neonatos: EENM₁. En el segundo ensayo de neonatos (EENM₂), se observaron resultados similares para la FMN ($p < 0,01$) y la frecuencia de BIN ($p= 0,019$), además de un incremento significativo de eritrocitos con BN ($p= 0,004$) en la M (RU+CIP+CPF) respecto al CV.

En **Tabla 4.10**, se muestran los valores correspondientes a ANs (medias \pm EE) de ambos ensayos (EENM 1 y 2) y en la **Tabla 4.11** los valores correspondientes a los parámetros de crecimiento (tamaño final – inicial) que se obtuvieron en cada ensayo (medias \pm EE).

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

Tabla 4.10 Frecuencia de micronúcleos y de otras anomalías nucleares (medias \pm EE) observadas en eritrocitos de *Caiman latirostris* en los ensayos de exposición de neonatos por inmersión a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas 1 y 2 (EENM₁ y EENM₂)

Ensayo	Grupos experimentales	FMN	BN	MU	BIN	NE	ANT
EENM1	CV	0,50 \pm 0,29	108,00 \pm 18,93	29,50 \pm 2,53	0,25 \pm 0,25	85,75 \pm 11,92	224,00 \pm 28,14
	M	4,14 \pm 0,65 #	106,21 \pm 4,29	33,71 \pm 2,83	2,79 \pm 0,41 ##	75,14 \pm 5,12	222,00 \pm 8,16
EENM2	CV	0,43 \pm 0,20	107,86 \pm 4,33	36,00 \pm 3,39	0,15 \pm 0,15	112,00 \pm 10,63	256,00 \pm 11,05
	M	3,60 \pm 0,31 ##	144,30 \pm 8,36 ##	42,70 \pm 2,85	1,20 \pm 0,36 #	88,60 \pm 6,47	276,80 \pm 12,26

EENM₁: Ensayo de exposición de neonatos a mezclas 1; CV: control vehículo; M (GLI + CIP + END): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Endosulfán Galgofan®, 35% p.a.

EENM₂: Ensayo de exposición de neonatos a mezclas 2; CV: control vehículo; M (GLI + CIP + CPF): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. (p.a.: principio activo)

FMN: frecuencia de micronúcleos

BN: brotes nucleares

MU: muescas

BIN: eritrocitos binucleados

NE: núcleos excéntricos

ANT: anomalías nucleares totales.

/ ##: Estadísticamente significativo respecto al CV ($p < 0,05$ / $p < 0,01$; Test *t*).

CAPÍTULO 4

Tabla 4.11 Parámetros de crecimiento (final – inicial; medias \pm EE) evaluados en animales de *Caiman latirostris* en los Ensayos de exposición de neonatos por inmersión a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas 1 y 2 (EENM₁ y EENM₂)

Ensayos	Grupos experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
EENM1	CV	6,78 \pm 1,66	3,33 \pm 0,93	71,50 \pm 24,92
	M	5,10 \pm 0,75	2,12 \pm 0,31	31,36 \pm 6,95
EENM2	CV	12,24 \pm 1,04	6,23 \pm 0,71	125,43 \pm 16,77
	M	11,32 \pm 0,43	5,53 \pm 0,22	108,17 \pm 8,19

EENM₁: Ensayo de exposición de neonatos por inmersión a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas 1; CV: control vehículo; M (GLI + CIP + END): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Endosulfán Galgofan®, 35% p.a.

EENM₂: Ensayo de exposición de neonatos por inmersión a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas 2; CV: control vehículo; M (GLI + CIP + CPF): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. (p.a.: principio activo)

LT: longitud total

LHC: longitud hocico-cloaca

cm: centímetro

g: gramo

En lo que respecta a la evaluación de la exposición de neonatos a M de a dos formulaciones (ensayo 3: EENM₃), se observó un incremento estadísticamente significativo de la FMN en la M₃: Cipermetrina+Clorpirifos ($p= 0,001$), en comparación con el grupo CV, y se visualizaron aumentos de la frecuencias de eritrocitos con BN en la M₂: Glifosato+Cipermetrina ($p= 0,016$) y en los núcleos con MU en las M₂ ($p= 0,021$) y en la M₃ ($p= 0,010$), respecto al CV (**Fig. 4.1**).

Cabe mencionar que para la M₂ también se observaron diferencias respecto al CV, con incrementos de la FMN y de ANT, pero esas diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas ($p=0,060$).

CAPÍTULO 4

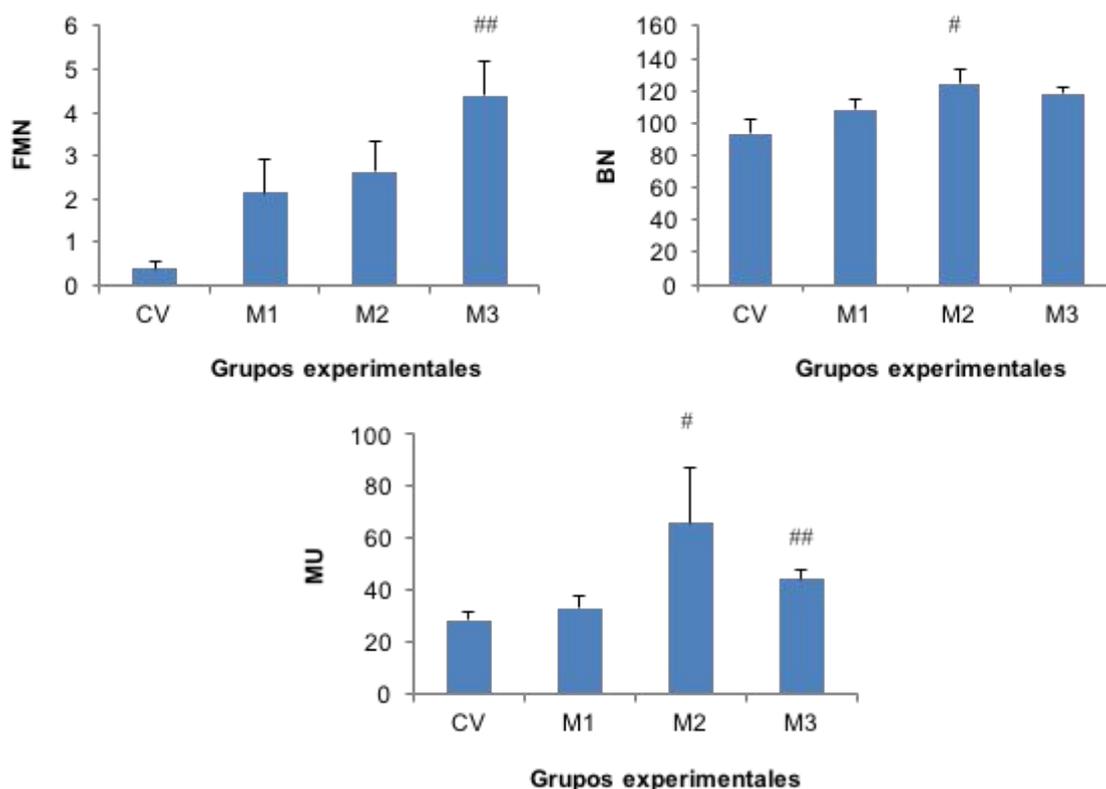


Fig. 4.1 Frecuencia de micronúcleos (FMN), brotes nucleares (BN) y muescas (MU), observados en eritrocitos de *Caiman latirostris* en los diferentes grupos experimentales del ensayo de exposición de neonatos por inmersión a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas de a pares (EENM₃). CV: control vehículo; M₁: grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a.; M₂: grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a.; M₃: grupo experimental de mezcla de los formulados: Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. (p.a.: principio activo). # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$: estadísticamente significativo respecto al CV. (ANOVA/Dunnett para todas las variables, excepto MU: test de Mann-Whitney).

En la **Tabla 4.12**, se presentan los valores de las medias \pm EE de FMN / FANs de cada grupo experimental de este ensayo.

Tabla 4.12 Frecuencia de micronúcleos y de otras anomalías nucleares (medias \pm EE) observadas en eritrocitos de *Caiman latirostris* en los diferentes grupos experimentales del ensayo de exposición de neonatos por inmersión a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas de a pares (EENM₃)

Grupos experimentales	FMN	BN	MU	BIN	NE	ANT
CV	0,38 \pm 0,18	93,38 \pm 9,07	28,38 \pm 3,12	0,38 \pm 0,18	81,63 \pm 6,84	204,13 \pm 12,33
M1	2,13 \pm 0,79	108,38 \pm 6,34	32,86 \pm 4,67	0,38 \pm 0,26	69,75 \pm 7,95	213,50 \pm 15,65
M2	2,63 \pm 0,68	124,5 \pm 9,24 #	65,63 \pm 21,56 #	0,50 \pm 0,38	68,88 \pm 6,09	262,13 \pm 26,69
M3	4,38 \pm 0,80 ##	118,25 \pm 3,43	44,15 \pm 4,00 ##	0,38 \pm 0,26	89,75 \pm 7,54	257,00 \pm 7,63

CV: control vehículo; M₁: grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a.; M₂: grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a.; M₃: grupo experimental de

CAPÍTULO 4

mezcla de los formulados: Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. (p.a.: principio activo).

FMN: frecuencia de micronúcleos

BN: brotes nucleares

MU: muescas

BIN: eritrocitos binucleados

NE: núcleos excéntricos

ANT: anormalidades nucleares totales

$p < 0,05$ y ## $p < 0,01$: estadísticamente significativo respecto al CV.

El crecimiento de los animales expuestos no se vio alterado por la exposición a ninguna de las mezclas respecto al del grupo CV ($p > 0,05$; **Tabla 4.13**), y tampoco se observó relación alguna entre los biomarcadores de genotoxicidad y el crecimiento de los caimanes ($p > 0,05$).

Se detectó un *efecto nido* respecto a la frecuencia de eritrocitos BIN ($p = 0,011$) y en los parámetros de crecimiento en: LT ($p = 0,001$) y LHC ($p = 0,031$).

Tabla 4.13 Parámetros de tamaño (final – inicial) evaluados en animales de *Caiman latirostris* del tercer ensayos de exposición de neonatos por inmersión a mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas (EENM₃)

Grupos experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
CV	0,30 ± 0,20	0,12 ± 0,11	15,20 ± 12,04
M ₁	0,20 ± 0,26	0,04 ± 0,18	11,37 ± 10,51
M ₂	0,29 ± 0,25	0,14 ± 0,11	10,00 ± 6,96
M ₃	0,28 ± 0,23	0,06 ± 0,09	11,63 ± 9,76

CV: control vehículo; M₁: grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a.; M₂: grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a.; M₃: grupo experimental de mezcla de los formulados: Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. (p.a.: principio activo).

LT: longitud total

LHC: longitud hocico-cloaca

cm: centímetro

g: gramo

4.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES DEL CAPÍTULO.

En ambas instancias de evaluación (*in ovo* e *in vivo*), llevadas a cabo en los ensayos de las mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas, los efectos genotóxicos nuevamente fueron evidenciados principalmente por el incremento en la FMN en eritrocitos de *C. latirostris*.

Se observaron resultados similares en los diferentes ensayos, independientemente de las mezclas testeadas. Los BN, las MU y los BIN fueron las otras ANs más observadas y que mostraron diferencias significativas en algunos de los ensayos presentados en este Capítulo.

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

En base a la medida de prohibición del END en nuestro país a partir del 2010 (que debía hacerse efectiva en 2016), que llevó progresivamente a su reemplazo en las prácticas agrícolas por otros insecticidas como el CPF, como se detalló en el Capítulo 1, se decidió incluirlo en la evaluación de efecto de mezclas por exposición embrionaria en lugar del END. Así, en el ensayo de exposición embrionaria, donde se testeó la mezcla GLI+CIP+CPF (2%; 0,12%; 0,8%) por pulverización de los compuestos sobre el material de nido (EEEMp), los resultados mostraron un aumento en la FMN y de BIN en los eritrocitos de los caimanes expuestos, respecto al grupo control, tal como fue observado en las evaluaciones de los componentes por separado (EEE pulverización – Capítulo 2). Este ensayo demostraría que no existe interacción entre los componentes de la mezcla, ni aditiva ni antagónica, ya que el efecto individual y combinado de los compuestos condujeron a un efecto genotóxico similar, probablemente porque los mecanismos de inducción de genotoxicidad son diferentes para cada uno de los compuestos (Hernández et al., 2012). Estos resultados difieren de lo observado por Poletta et al. (2011), sin embargo, debe tenerse en cuenta que en dicho trabajo la presencia del END en la mezcla, pudo otorgar a la misma propiedad tóxica diferente, haciendo que induzca mayor daño que el RU por sí sólo. De todas

CAPÍTULO 4

formas no se testearon el END y la CIP por separado en ese estudio, por lo que no se puede asegurar que los mayores efectos observados para la mezcla hayan sido debido a un efecto aditivo o sinérgico, o al efecto ejercido directamente por alguno de estos dos compuestos.

El modo de acción exacto con el que actúan los compuestos en la mezcla es difícil de estimar y puede variar con diversas condiciones ambientales, pero este tipo de estudios nos permite igualmente, analizar su actividad sobre los sistemas biológicos. Se sabe que los contaminantes con modos de acción similar o diferente pueden influir en la toxicidad del otro, dando como resultado un número casi ilimitado de posibles combinaciones aditivas, sinérgicas o antagonistas. Para el caso de una acción combinada que envuelve a herbicidas e insecticidas, generalmente es casi siempre diferente. Un concepto importante en el examen de las mezclas de plaguicidas es descifrar el lenguaje de las interacciones químicas (Lydy et al., 2004; Hernández et al., 2012).

Para el caso de las topicaciones sobre la cáscara de los huevos al inicio de la incubación, con la misma mezcla (GLI+CIP+CPF), solamente se hizo evidente el daño a través de un aumento significativo de los MNs en los eritrocitos de los recién nacidos expuestos, lo mismo se obtuvo en la repetición de este ensayo (EEEM₂), como también ocurrió en la evaluación de cada uno de los compuestos por separado (EEE: 1, 2, 3 y 4 - Capítulo 2). En el caso del segundo ensayo de exposición embrionaria por topicación a las mezclas de los compuestos (EEEM₂) la FMN observada fue casi el doble que la del primer ensayo (EEEM₁), y también fue mayor que la observada en los ensayos embrionarios con los compuestos por separado (Capítulo 2) en todos los casos. Sin embargo, como esto sólo se observó en uno de los ensayos de mezcla por topicación y no hubo repetitividad en los resultados no podemos concluir que se trate de un efecto aditivo para la mezcla.

Por otro lado, en las exposiciones *in vivo*, en el primer ensayo de exposición de neonatos a la M de GLI+CIP+END (EENM₁), se presentó un aumento estadísticamente significativo para los BIN, además del aumento de los MNs, siendo en este último caso, un efecto similar al observado con los compuestos por separado (EEN: 1 y 3 - Capítulo 3). Para el segundo ensayo de exposición de neonatos (EENM₂) con la M compuesta por GLI+CIP+CPF, también se mostraron incrementos significativos en la FMN, de eritrocitos BIN y además la presencia de núcleos con BN. Estos resultados no mostraron diferencia respecto a los obtenidos con los compuestos en forma independiente, por lo que las mezclas testeadas no demostraron mayor

CAPÍTULO 4

genotoxicidad, al menos en las condiciones de evaluación y mediante los biomarcadores utilizados.

En la evaluación *in vivo* de neonatos a M de dos componentes (de a pares), los resultados indicarían que la presencia de CIP no contribuye a la toxicidad de las mezclas (M₂: GLI+CIP y M₃: CIP+CPF), ya que se observó un efecto similar al evidenciado por las formulaciones de CPF y GLI en forma independiente, mientras que la formulación de CIP por sí sola había demostrado diferencias significativas en la FMN recién a una concentración del doble de la utilizada en la mezcla (capítulo 3). Por otra parte, la combinación de GLI con CPF (M₁) no mostró efectos significativos, pero sí lo hizo la M de los 3 componentes (GLI+CPF+CIP: EENM₂), cuando CIP estaba presente.

Todos estos resultados permiten proponer por un lado, que existiría algún tipo de acción antagónica entre el CPF y el GLI que anula los efectos de los compuestos observados en forma independiente. El antagonismo se produce cuando dos o más plaguicidas interfieren mutuamente en la acción del otro alterando (aumentando o disminuyendo en cada caso) la absorción, el transporte, el metabolismo o la excreción, observándose una reducción en el efecto generado por los compuestos en forma independiente, que no necesariamente deben tener una estructura similar (Hernández et al., 2012). Por otro lado, los resultados indican que la presencia de la CIP en la mezcla de los 3 componentes suprimiría ese efecto antagónico entre CPF y GLI, inhibiendo de alguna manera la interacción entre ellos, pero no contribuiría al efecto tóxico de las M, ya que tanto las M de 2 como la de 3 componentes con CIP, mostraron un efecto similar al evidenciado por las formulaciones de CPF y GLI en forma independiente, mientras que CIP sólo mostró el mismo efecto para BN en forma independiente a igual concentración.

Estos resultados coinciden parcialmente con otros estudios sobre la mezcla de formulados compuesta por GLI+CPF. En un trabajo realizado en *C. decemmaculatus* por exposición *in vivo* durante 42 días, a concentraciones ambientalmente relevantes (2 mg/L + 0,0084 µl/L, respectivamente), los autores indicaron que la mezcla produjo alteraciones enzimáticas, pero que los compuestos por separado mostraron alteraciones enzimáticas mayores, activación de mecanismos antioxidantes y cambios de comportamiento (Bonifacio et al., 2016), lo cual es un resultado poco esperado. Esto de alguna manera estaría en consonancia con lo observado en nuestro estudio, ya que también demuestra una menor toxicidad de la mezcla en comparación con los compuestos por separado e indicaría alguna interacción de tipo antagonista entre

CAPÍTULO 4

ellos. Brodeur et al. (2016) informaron sobre una interacción de tipo antagonista con una fuerte inhibición de la toxicidad de CIP por la formulación de GLI, siendo la toxicidad del insecticida casi completamente anulada por la formulación del herbicida en peces de *C. decemmaculatus*, estos resultados fueron radicalmente opuestos a los observados previamente en renacuajos de *Rhinella arenarum*, donde se observó un efecto sinérgico cuando las formulaciones de GLI y CIP estaban presentes en la mezcla (Brodeur et al., 2014).

La evidencia científica demuestra que, dependiendo del organismo estudiado, el contexto, y la interacción de los componentes involucrados en las mezclas, el efecto producido puede diferir completamente entre una y otra especie (Buck et al., 2015; Brodeur et al., 2016; Suárez et al., 2016).

Sin embargo, Chibuisi y Adekunle (2015) confirmaron un mismo efecto en tres especies de vertebrados completamente distintas: el pez gato (*Clarias gariepinus*), la codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) y la rata de alcantarilla (*Rattus norvegicus*), por exposición *in vivo* bajo condiciones controladas a concentraciones subletales (1-50%) de la mezcla de productos químicos provenientes de lixiviados de lagos naturales. Esta mezcla de xenobióticos, indujo efectos citotóxicos y genotóxicos (FMN, ANs y la proporción de eritrocitos poli / normocromáticos) sobre los tres modelos biológicos utilizados.

En otros estudios se ha reportado la toxicidad de mezclas y compuestos de manera aislada, con otra formulación a base de GLI (Ultra-Max®, 74,7% p.a.; Lajmanovich et al., 2013), y en tres mezclas (50:50) con esa formulación ensayadas de a pares: (Bispiribac sodio 40% p.a. + GLI; metsulfuron methyl 60% p.a. + GLI; picloram 27,7% p.a. + GLI), donde se incrementó significativamente la FMN y de ANs en eritrocitos de renacuajos de *Rhinella arenarum* para todas las mezclas analizadas, mientras que no se observó efecto alguno con la formulación de GLI por separado, pero si con todos los demás herbicidas aislados. Además, reportaron una relación antagonista entre GLI- Bispiribac-sodio en el porcentaje de eritrocitos con MNs y ANs. Consideraron además, que este hecho estaría asociado con una disminución en la eritropoyesis y que se trataría en realidad de falsos negativos (Udroiu, 2006; Polard et al., 2011). Relyea (2009), compararon en anuros toxicidad de mezclas de insecticidas y de insecticidas con herbicidas frente a la de los compuestos aislados, y comprobaron que las mezclas presentaron un mayor efecto (mortalidad y alteraciones en la metamorfosis de los organismos) que los compuestos testeados por separado.

CAPÍTULO 4

Los efectos combinados de los plaguicidas dentro de la misma clase química podrían predecirse, basados en la comprensión sobre el mecanismo de acción tóxica de cada uno de ellos. Sin embargo, son más difíciles de predecir y comprender los efectos cuando la mezcla se compone de diversas clases de plaguicidas. Las propiedades químicas de cada formulación, la toxicocinética, las vías metabólicas, la interacción con otros compuestos y el mecanismo de acción de cada tóxico, pueden producir efectos muy variables (Lydy et al., 2004; Hernández et al., 2012). Además, los factores no químicos que también pueden actuar como factores de estrés añaden una mayor complejidad a las múltiples situaciones (Beyer et al., 2014), como son los factores ambientales, ecológicos, las respuestas fisiológicas a esa interacción y la susceptibilidad individual de cada organismo frente a la exposición (Carballo y Mudry, 2006; Amaral et al., 2012b). En este sentido, se deben considerar las nuevas tecnologías moleculares como herramientas de avanzada, que pueden contribuir a develar los procesos fisiológicos y toxicológicos que producen estos compuestos sobre los organismos.

En nuestro país, varios estudios han reportado la presencia y persistencia de los compuestos evaluados en este trabajo de Tesis y de sus metabolitos en ambientes naturales muy cercanos a cultivos, en cuerpos de agua y suelo (Ronco et al., 2008; 2016; Aparicio et al., 2013; Ballesteros et al., 2014; Carriquiriborde et al., 2014; Lupi et al., 2015). Se sabe que estas mezclas de plaguicidas son comúnmente aplicadas en los cultivos de soja entre dos y tres veces por ciclo de crecimiento, sumado a la escorrentía superficial causada principalmente por los eventos de lluvias durante esos períodos, hacen que los cuerpos de agua adyacentes a cultivos reciban varios pulsos de toxicidad por campaña agrícola (Demetrio et al., 2014; Ronco et al., 2016).

Esta problemática es la que ocurre específicamente en muchos ambientes habitados por poblaciones naturales de *C. latirostris*, que permanecen en ambientes fragmentados y contaminados en gran parte, por estos compuestos. Considerando también la particularidad que tienen estos animales de tener su período reproductivo (noviembre-marzo), cuando se producen las máximas aplicaciones de plaguicidas, y donde las hembras acondicionan sus nidos con la vegetación extraída de los alrededores, que puede haber sido alcanzada por los plaguicidas, aumentarían de esta manera, aún más las probabilidades de exposición de los embriones y neonatos. Difícilmente los individuos dañados consigan recuperarse rápidamente del daño genotóxico generado, ya que además de las situaciones de sucesivas exposiciones durante el año, asociadas al cultivo de soja de primera y segunda, deben sobrevivir a

CAPÍTULO 4

las condiciones ambientales adversas que se les presentan de manera continua, como los son las sequías, lluvias intensas, inundaciones, fríos extremos de los inviernos (Larriera et al., 2008), arriesgando de esta manera, la supervivencia de los individuos más vulnerables de la población.

Podemos concluir que los resultados de nuestro estudio demuestran que las diferentes mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas ejercen efectos a nivel genotóxico sobre embriones y neonatos, similares a los observados para los compuestos por separado, mientras que no se observaron interacciones entre los diferentes componentes en las M, excepto un efecto antagónico entre GLI y CPF en la M de dos componentes pero no en la M de tres componentes, en presencia de la formulación de CIP. Esta información, junto con la disponible en la literatura, nos permite empezar a tratar de interpretar lo que podría estar pasando en los escenarios reales de exposición, donde el yacaré overo está expuesto continuamente en su hábitat a los formulados comerciales de plaguicidas en forma de mezclas.

Para esta instancia de evaluación, no se manifestaron malformaciones externas en los recién nacidos, ni tampoco se observaron efectos sobre el crecimiento al finalizar cada ensayo. Contrariamente, Uggini et al. (2010) demostraron la inducción de anomalías morfológicas y efectos sobre el crecimiento de los recién nacidos en embriones de pollo expuestos a la M de formulaciones de CPF+CIP, en un rango de concentraciones de 0,005 a 5 µg/huevo aplicadas al día cero de incubación, confirmando el efecto teratogénico y embriotóxico de estos compuestos en combinación.

En nuestro caso, tampoco se realizó el seguimiento posterior de los animales, ya que se hace muy difícil el mantenimiento de los mismos por un período de tiempo prolongado en condiciones controladas de laboratorio. En este sentido, es importante mencionar la longevidad que presenta esta especie, como muchos otros reptiles, donde los efectos sobre el crecimiento pueden no ser evidenciado a corto plazo (Mitchelmore et al., 2005), como lo es un período de dos meses, sino que dichos efectos podrían comprobarse sólo mediante un seguimiento a largo plazo.

CAPÍTULO 5

Discusión y conclusiones finales

5.1 DISCUSIÓN GENERAL

En los últimos años, en nuestro país y principalmente en la provincia de Santa Fe, el crecimiento del modelo productivo agropecuario dependiente del uso de plaguicidas ha impactado negativamente sobre los ecosistemas naturales y en las especies que los componen. Conjuntamente con la incorporación de cultivos transgénicos (soja, maíz y algodón) y la siembra directa, los plaguicidas se han convertido en una de las herramientas más utilizadas en estos nuevos modelos productivos, para contrarrestar el ataque de plagas y enfermedades en los cultivos. Sin embargo, el uso inadecuado de plaguicidas ha generado impactos muy negativos para la biodiversidad (Medan et al., 2011; Maganasco y Di Paola, 2015).

Los cambios en el uso de la tierra causados como consecuencia de la expansión agrícola liderada por cultivos de soja transgénica, han planteado una serie de preocupaciones ambientales, incluyendo reducciones en la complejidad de los ecosistemas, pérdida de biodiversidad, deforestación, aumento de la erosión, aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero y, sumado a esto, los efectos adversos producidos por la utilización de grandes cantidades de formulaciones plaguicidas que ponen en riesgo constantemente la salud de las poblaciones silvestres que allí habitan (Hung et al., 2016).

El cultivo de soja transgénica utiliza gran variedad de químicos para el control de plagas y enfermedades, incluyendo al herbicida Glifosato, curasemillas, fungicidas y la aplicación de insecticidas como Clorpirifos y Cipermetrina, entre otros (López et al., 2012; CASAFE, 2016). Se calcula que aproximadamente un 25% de la pulverización de plaguicidas da en el blanco, el resto afecta directamente a otros organismos hacia los cuales la aplicación no fue dirigida (Hang, 2011; Tomasoni, 2013). Generalmente, las aplicaciones se producen en forma de mezclas complejas y están influenciadas por distintos factores ambientales (Beyer et al., 2014), siendo prácticamente imposible calcular el grado exacto de exposición, sumado a las aplicaciones repetidas que se producen a lo largo del año por la rotación de cultivos y la aparición de resistencias.

Las consecuencias de la exposición de las poblaciones silvestres a estos productos dependen de numerosos factores, incluyendo el tipo de principio activo, la composición de la formulación comercial, la toxicidad, las concentraciones aplicadas, la persistencia ambiental de cada compuesto, el momento y tipo de aplicación y las circunstancias de exposición.

CAPÍTULO 5

En nuestro país, existen legislaciones y normativas que promueven y recomiendan una aplicación responsable para una producción sustentable, pero no se efectúan los controles necesarios para el cumplimiento de las mismas, además de la falta de estudios sobre los riesgos que implican las potencialidades de desplazamiento posterior de los plaguicidas en el ambiente y sobre las poblaciones cercanas (Tomasoni, 2013).

Los cocodrilianos son considerados componentes muy valiosos de los humedales tropicales, son especies claves ya que mantienen la estructura y funcionamiento de los ecosistemas naturales con sus actividades de predación selectiva, el reciclado de nutrientes, y la manutención de refugios húmedos durante las sequías (Messel et al., 1995; Ross, 1998). Su longevidad y territorialidad, hace que puedan ser utilizados en diferentes estadios de vida como centinelas de contaminación ambiental (Mitchelmore et al., 2005; Weir et al., 2010). Aunque estos estudios continúan siendo muy escasos.

En este contexto, ante la problemática planteada, gran parte del hábitat natural del yacaré overo está siendo afectado por el avance de la frontera agrícola, quedando como ambientes fragmentados inmersos en grandes extensiones de tierras cultivadas. Los primeros estadios de un organismo, en este caso los embriones y las crías, son considerados los más sensibles de la población, con las mayores probabilidades de afección por plaguicidas.

Los biomarcadores son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de diferentes agentes sobre los organismos y permiten entender cómo estos responden a una situación de exposición en condiciones experimentales específicas y controladas. Más allá de sus limitaciones, siguen siendo la mayor fuente de información para la evaluación de efectos toxicológicos y ecológicos (Carballo y Mudry, 2006; Ronco y Marino, 2008).

En el presente trabajo de Tesis, se pudo constatar que las formulaciones comerciales de plaguicidas ampliamente utilizadas actualmente en nuestro país, principalmente en cultivos de soja, inducen alteraciones sobre el material genético del yacaré overo durante las etapas tempranas del desarrollo, bajo diferentes condiciones de exposición (*in ovo* e *in vivo*).

De los distintos parámetros analizados, los biomarcadores de genotoxicidad fueron los que mostraron mayor sensibilidad en todos los ensayos realizados en condiciones controladas, en tanto que los parámetros de desarrollo: tamaño al nacer (exposición *in ovo*) o crecimiento (exposición *in ovo* con seguimiento hasta 6 meses, y exposición *in*

CAPÍTULO 5

vivo), presentaron resultados más variables, dependiendo del ensayo, del estadio de exposición (embriones-neonatos) y del compuesto/aplicación (independiente o en mezclas). La sensibilidad de los marcadores de genotoxicidad para detectar daño inducido por diferentes agentes es una característica referida por diversos autores (Mudry y Carballo, 2006; Rodríguez, 2006).

Entre los biomarcadores de genotoxicidad en particular, la FMN demostró ser más sensible que las otras ANs, respondiendo en prácticamente todos los ensayos realizados mientras que las demás ANs mostraron resultados inconsistentes. De los distintos tipos de ANs observadas, teniendo en cuenta todos los ensayos en las distintas instancias de evaluación, las más frecuentes fueron los BN, BIN y NE.

A lo largo de la presente Tesis, se han propuesto varias explicaciones sobre los posibles mecanismos de acción que producen ciertos plaguicidas sobre el material genético, tales como el efecto umbral a bajas concentraciones (Speit et al., 2000; Elhajouji et al., 2011), el efecto diluyente para resultados negativos (Udroiu, 2006; Barni et al., 2007; Polard et al., 2011; Vera-Candioti et al., 2013a), o compuestos con propiedades citotóxicas (Burella et al., 2016).

Cabe destacar que este fue el primer trabajo en el cual se utilizaron otras ANs, además de la FMN, como marcadores de genotoxicidad, no sólo en esta especie sino en todos los cocodrilianos a nivel mundial.

Desde el punto de vista de la aplicabilidad, la facilidad en la obtención de las muestras de sangre periférica en estos animales ya desde el momento de su nacimiento, y la posibilidad de utilizar los eritrocitos de sangre periférica para la determinación de MN (Poletta et al., 2008) y de otras ANs (López González et al., 2017), representan ventajas considerables para la realización de estudios con exposiciones controladas en estos organismos, evitando el sacrificio de los individuos de experimentación. Esta ventaja es más importante aún en estudios de biomonitoreo ambiental pensados a futuro, para evitar cualquier tipo de perjuicio a las poblaciones naturales.

La realización de ensayos controlados es importante ya que permite evaluar no solamente la toxicidad de los compuestos por separado sino también las interacciones que se producen en las mezclas y sus efectos sobre los sistemas biológicos, sin embargo, deben tenerse en cuenta además de los componentes de cada formulado, las variaciones ambientales que pueden influir en circunstancias reales, sobre la interacciones de los compuestos.

CAPÍTULO 5

En el caso de los ensayos de exposición embrionaria (EEE) realizados en esta Tesis, quedó demostrado que, independientemente del tipo de aplicación (por topicación o pulverización), existe daño genotóxico al embrión, advirtiendo sobre el posible riesgo para las poblaciones naturales frente a las pulverizaciones masivas que ocurren en los ecosistemas naturales.

Cabe destacar que las concentraciones aplicadas son equivalentes o incluso menores, a las que normalmente se utilizan a campo, lo que confirma la sensibilidad de *C. latirostris* como especie indicadora de daño y centinela de contaminación ambiental por plaguicidas.

A partir de los antecedentes ya existentes en la especie, en los que viene trabajando nuestro grupo de trabajo durante los últimos años, se han reportado numerosos efectos producidos por las formulaciones de plaguicidas sobre las primeras etapas de la vida, en condiciones controladas o semi-naturales, incluyendo diferentes alteraciones sobre el desarrollo, modificaciones a nivel genético, enzimático y metabólico, así como en la respuesta inmune (Poletta et al., 2009; 2011; Latorre et al., 2013; 2016; López González et al., 2013; 2017; Burella et al., 2016; Siroski et al., 2016).

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis complementan y amplían la información ya reportada en el yacaré overo sobre efectos tóxicos de los plaguicidas en diferentes parámetros en embriones y neonatos, y nos permitirá un mejor entendimiento de los posibles efectos producidos en las poblaciones silvestres ambientalmente expuestas a estos agentes químicos.

En relación a las diferencias observadas entre individuos en la respuesta a la exposición respecto a ciertas ANs, el *efecto nido*, el efecto dependiente de la concentración, los parámetros de tamaño y de crecimiento, y la falta de respuesta en algunos parámetros, hemos propuesto diferentes explicaciones que sustentan estos hechos y podrían deberse a varios factores implicados. En primer lugar, a un *efecto nido* bien marcado que pudo comprobarse para los parámetros relacionados con el crecimiento en todos los ensayos, lo cual coincide con estudios previos que han descrito la influencia del nido de origen como uno de los factores determinantes en el crecimiento de los cocodrilianos durante los primeros meses de vida (Webb et al., 1992; Verdade, 1997). Algunos autores sugieren que la exposición temprana a estos tóxicos puede tener efectos diferentes en comparación con la edad adulta, ya que las perturbaciones durante las etapas de plasticidad del desarrollo pueden dar lugar a efectos más profundos (Newbold, 2010). Otra supuesta causa de falta de respuesta en

CAPÍTULO 5

los parámetros de tamaño al nacer y crecimiento posterior en neonatos luego de exposición (*in ovo* e *in vivo*, respectivamente), podrían estar relacionados con el hecho de que las concentraciones de plaguicidas aplicadas o el tiempo de exposición, no hayan sido suficientes para causar alteraciones en los procesos que regulan los niveles bioenergéticos y metabólicos en los organismos (Mitchelmore et al., 2005; Amaral et al., 2012a). Cabe remarcar, que los reptiles se caracterizan por ser animales longevos, por lo tanto el tiempo de exposición y el seguimiento posterior tal vez no fueron suficientemente relevantes como para determinar un efecto marcado. En los ambientes naturales, estos acontecimientos se ven agravados por las exposiciones constantes durante todo el año, ya sea de manera directa por pulverizaciones dentro de los períodos de siembra de 1era. y de 2da. (Scalabrini Ortiz, 2013) o de manera indirecta por eventos de deriva luego de dichas pulverizaciones (Hang, 2010) o escorrentía por eventos de lluvia, sumado a la persistencia ambiental que muchos de estos compuestos presentan (Primost et al., 2013; Carriquiriborde et al., 2014; Lupi et al., 2015; Astroviza et al., 2016; Ronco et al., 2016). Por lo tanto, bajo estas condiciones, no es posible asegurar que los animales en estado silvestre logren la recuperación de los daños generados por plaguicidas en un corto plazo. También debemos considerar que se trata de animales ectotérmicos, que dependen de los meses calurosos para poder realizar sus actividades y adquirir reservas para pasar los meses más fríos, además de las implicancias que tiene un tamaño muy reducido de las crías como potenciales presas (Larriera et al., 2008; Amaral et al., 2012b).

Se destaca la importancia de la evaluación ambiental integrada del impacto de los plaguicidas mediante marcadores de alerta temprana que podrían ser aplicados sobre las poblaciones naturales de *C. latirostris*, y que nos permitirán entender en detalle, el riesgo de exposición a estos plaguicidas en su hábitat natural durante las primeras etapas del desarrollo. Considerando la complejidad de los múltiples factores que involucran las condiciones de biomonitorio a campo, no deben descuidarse otros factores además de los plaguicidas que podrían estar influyendo.

Es necesario tener en cuenta la aplicación real de plaguicidas y mezclas realizada por los productores agropecuarios, ya que muchas veces con el objetivo de minimizar los costos de producción no cumplen con las normativas existentes. Se debe considerar además, la composición real de cada formulación, ya que forman parte del secreto comercial de protección de patentes, por lo que no son informadas en las etiquetas. Otros factores a valorar, incluyen la representatividad del número de muestras a analizar y la complementariedad entre estudios a campo y experimentos en

CAPÍTULO 5

condiciones de exposición controladas, como un importante aporte preliminar de herramientas predictivas de evaluación sobre el accionar de los compuestos en los ambientes naturales.

5.2 CONCLUSIONES FINALES Y PROYECCIONES

Mediante las evaluaciones realizadas en este trabajo de Tesis se pudo corroborar el efecto genotóxico en *C. latirostris* por exposición a formulados comerciales ampliamente utilizados en cultivos de soja. Estos hallazgos nos indicarían que los compuestos estarían afectando a los individuos más vulnerables de la población (embriones y crías), si bien se requerirían más estudios para analizar los efectos en otros estadios.

En base a lo obtenido en los ensayos en condiciones controladas de exposición, respecto a los biomarcadores de genotoxicidad aplicados y las consideraciones respecto a las demás variables registradas, surge la necesidad de incorporar nuevos biomarcadores a distinto nivel de complejidad. Se busca complementar lo obtenido hasta el momento, en escenarios de exposición más próximos a la realidad, que nos permitirán una mejor comprensión de los efectos biológicos de los compuestos en estudio y, principalmente, de las mezclas de formulados.

En este contexto, se plantea como continuidad al estudio, la incorporación de nuevos biomarcadores potenciales de contaminación ambiental en el área de la Ecotoxicogenómica, especialmente orientado a la identificación de respuestas moleculares de expresión génica, relacionados con la inmunotoxicidad.

El desarrollo de la metodología para la identificación y evaluación de los cambios en la expresión de ciertos genes ante la exposición a plaguicidas u otros contaminantes ambientales, nos permitirá conocer el mecanismo de acción implicado en la respuesta toxicológica, además de descubrir los procesos moleculares que subyacen a los efectos toxicológicos de los contaminantes e incluirlos dentro de la batería de ensayos con la que venimos trabajando. De esta manera, se podrá establecer un diagnóstico integral de las poblaciones silvestres potencialmente afectadas.

Finalmente, teniendo en cuenta los objetivos planteados para el presente trabajo de Tesis Doctoral y los resultados obtenidos se pudo abordar a las siguientes conclusiones finales:

CAPÍTULO 5

- Se ha comprobado el daño genotóxico inducido por las formulaciones comerciales de los insecticidas Cipermetrina, Clorpirifos y Endosulfán, y del herbicida Glifosato, así como sus mezclas en combinaciones de dos y tres componentes, en embriones y crías de *C. latirostris*, bajo condiciones controladas de exposición (*in ovo* e *in vivo*).
- Los MN demostraron ser el mejor indicador de daño genotóxico inducido por las formulaciones comerciales de plaguicidas (Cipermetrina, Clorpirifos, Endosulfán y Glifosato), independientemente de la vía de exposición y la etapa de desarrollo de la especie, corroborando de esta manera su sensibilidad y aplicabilidad en *C. latirostris*.
- Se incorporaron y caracterizaron un nuevo grupo de ANs como biomarcadores de genotoxicidad, para ser aplicados en eritrocitos de *C. latirostris* en forma complementaria a la FMN. Sin embargo estas nuevas ANs analizadas, para evaluar exposición a formulaciones plaguicidas, demostraron ser sumamente variables y menos sensibles que la FMN.
- Los parámetros de crecimiento no fueron sensibles a la exposición a plaguicidas, probablemente por tratarse de exposiciones subcrónicas que no llegaron a afectar los procesos bioenergéticos subyacentes.
- Las mezclas no mostraron mayor efecto que los compuestos por separado, aunque algunos de sus componentes evidenciaron interacciones entre ellos, como una posible acción antagonica entre Glifosato y Clorpirifos en la mezcla compuesta por ambas formulaciones.
- En base a estos estudios, es necesario continuar con la evaluación de los efectos de plaguicidas, particularmente de mezclas complejas, mediante biomarcadores de distinto punto final que nos permita identificar las condiciones reales de exposición a las que se encuentra sometida esta especie en su ambiente natural.

Bibliografía citada

Bibliografía citada

Bibliografía citada

1. Achudume AC., 2012. Insecticides - Pest Engineering. En: Agricultural and Biological Sciences. Dr. Farzana Perveen (Ed.)/ InTech. ISBN 978-953-307-895-3. DOI: 10.5772/27924. Cap. 1: 1-22. [En línea]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/insecticides-pest-engineering/insecticide>
2. Amaral MJ., Bicho RC., Carretero MA., Sanchez-Hernandez JC., Faustino AMR., Soares AMVM., Mann RM., 2012a. The use of a lacertid lizard as a model for reptile ecotoxicology studies: Part 2 – Biomarkers of exposure and toxicity among pesticide exposed lizards. *Chemosphere* 87: 765–774.
3. Amaral MJ., Sanchez-Hernandez JC., Bicho RC., Carretero MA., Valente R., Faustino AMR., Soares AMVM., Mann RM., 2012b. Biomarkers of exposure and effect in a Lacertid lizard (*Podarcis bocagei seoane*) exposed to Chlorpyrifos. *Environ Toxicol Chem* 31 (10) 2345-2353.
4. Amavet P., Markariani R., Fenocchio A., 2003. Comparative cytogenetic analysis of the South American alligators *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Reptilia, Alligatoridae) from Argentina. *Caryologia* 56 (4) 489-493.
5. Antoniou M., Brack P., Carrasco A., Fagan J., Habib M., Kageyama P., Leifert C., Onofre Nodari R., Pengue W., 2010. Soja transgénica: ¿Sostenible? ¿Responsable? Un resumen de los resultados principales. Disponible en: GLS Gemeinschaftsbank eG www.gls.de / ARGE Gentechnik-frei www.gentechnikfrei.at
6. Anwar K., 2003. Toxic effects of Cypermethrin on the biochemistry and methodology of 11th day chick embryo (*Gallus domesticus*). *Pak J Appl Sci* 3 (6): 432-445.
7. Ansari RA, Shakilur R, Manpreet K, Sameya A, Sheikh R., 2011. *In vivo* cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Ecotox Environ Safe* 74: 150-156.
8. Aparicio VC., De Gerónimo E., Marino D., Primost J., Carriquiriborde P., Costa JL., 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93 (9) 1866–1873.
9. ArgenBio, 2016 – <http://www.argenbio.org/index.php?action=cultivos&opt=5>
Consultado: Mayo de 2016.
10. Arregui MC, Sanchez D., Althaus R., Scotta R.R., Bertolaccini I., 2010. Assessing the risk of pesticide environmental impact in several Argentinian cropping systems with a fuzzy expert indicator. *Pest Manag Sci* 66: 736–740.

Bibliografía citada

11. Astoviza MJ., Cappelletti N., Bilos C., Migoya MC., Colombo JC., 2016. Massive airborne Endosulfan inputs related to intensive agriculture in Argentina's Pampa. *Chemosphere* 144: 1459-1466.
12. Ayllon F., Garcia-Vazquez E., 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in european minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat Res* 467 (2) 177-186.
13. Babini MD., Bionda LD., Salas ND., Martino AL., 2015. Health status of tadpoles and metamorphs of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) that inhabit agroecosystems and its implications for land use. *Ecotox Environ Safe* 118: 118–125.
14. Ballesteros M., Miglioranza KSB., Gonzalez M., Fillmann G., Wunderlin DA., Bistoni MA., 2014. Multimatrix measurement of persistent organic pollutants in Mar Chiquita, a continental saline shallow lake. *Sci Total Environ* 490: 73–80.
15. Barni S., Boncompagni E., Grosso A., Bertone V., Freitas I., Fasola M., Fenoglio C., 2007. Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquat Toxicol* 81: 45–54.
16. Beldoménico PM., Rey F., Prado WS., Villarreal JC., Muñoz del Toro M., Luque EH., 2007. *In ovum* exposure to pesticides increases the egg weight loss and decreases hatchlings weight of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Ecotox Environ Safe* 68 246–251.
17. Beeby A., 2001. What do sentinels stand for? *Environ Pollut* 112: 285-298.
18. Betancur LA., Ocampo RC., Ríos LA., 2015. La problemática del endosulfán: aspectos químicos, analíticos y ambientales. ISSN 1909-2474. DOI: 10.17151/luaz.2014.40.19. *Revista Luna Azul* 40: 293-313
19. Beyer J., Petersen K., Song Y., Ruus A., Grung M., Bakke T. and Tollefsen KE., 2014. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: A discussion paper. *Marine Environ Res* 96: 81-91.
20. Biga LM., 2013. Effects of Pesticides on Amphibians with Special Reference to the Pyrethroid Insecticide, Cypermethrin. For the obtain degree of Doctor of Philosophy in Environmental Science. An abstract of the dissertation. November 5, 125 pp.
21. Bonifacio AF., Cazenave J., Bacchetta C., Ballesteros ML., Bistoni MA., Amé MV., Bertrand L., Hued AC., 2016. Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon*

Bibliografía citada

- decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. *Ecol Indic* 67: 88-97.
22. Brodeur JC., Poliserpi MB., D'Andrea MF., Sanchez M., 2014. Synergy between glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American Toad *Rhinella arenarum*. *Chemosphere* 112: 70-76.
23. Brodeur JC., Malpel S., Anglesio AB., Cristos D., D'Andrea MF., Poliserpi MB., 2016. Toxicities of glyphosate- and cypermethrin-based pesticides are antagonistic in the tenspotted livebearer fish (*Cnesterodon decemmaculatus*). *Chemosphere* 155: 429-435.
24. Buck JC., Hua J., Brogan WR., Dang TD., Bendis RJ., Stoler AB., Blaustein AR., Urbina J., Relyea RA., 2015. Effects of Pesticide Mixtures on Host Pathogen Dynamics of the Amphibian Chytrid Fungus. *PLoS ONE* 10 (7): e0132832. doi:10.1371/journal.pone.0132832.
25. Burella P., Simoniello MF., Poletta GL., 2016. Evaluations of stage-dependent genotoxic effect of Roundup® (glyphosate) on *Caiman latirostris* embryos. *Arch Environ Contam Toxicol*. doi: 10.1007/s00244-016-0311-7.
26. Burlibasa L. & Gavrilá L., 2011. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. *Appl Ecol Env Res* 9: 1–15.
27. Cabagna MC., Lajmanovich RC., Peltzer PM., Attademo AM., Ale E., 2006. Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide Cypermethrin. *Toxicol Environ Chem* 88 (4): 729–737.
28. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE), 2010. Documento Herbicidas. Disponibles en: <https://kardauni08.files.wordpress.com/2010/09/herbicidas.pdf>
29. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE), 2016. TABLA Clasificación de Plaguicidas según la OMS – Anexo B Juan I. Pina. <http://www.casafe.org/publicaciones>. [En línea] consultado: 14/7/16.
30. Canesini G., Durando ML., Galoppo GH., Luque EH., Muñoz del Toro M., 2013. Caracterización del yacaré como modelo para estudio de Obesógenos ambientales. Congreso: LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC); Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Argentina.

Bibliografía citada

31. Cañas JE. & Anderson TA., 2002. Organochlorine contaminants in eggs: the influence of contaminated nest material, *Chemosphere* 47: 585–589. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045 6535\(02\)00019-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0045 6535(02)00019-X).
32. Carballo MA. & Mudry MD., 2006. Indicadores y marcadores biológicos. En: *Genética Toxicológica*. Mudry MD., Carballo MA. (Eds.). De los Cuatro Vientos Editorial, Buenos Aires, Argentina. 4: 83-108.
33. Carrasco AE., Sánchez NE., Tamagno LE., 2012. Modelo agrícola e impacto socioambiental en la Argentina: monocultivo y agronegocios. Serie Monográfica Sociedad y Ambiente: Reflexiones para una nueva América Latina. Primera edición electrónica, AUGM-Comité de Medio Ambiente. (Ed) Jorge L. Frangi. SeDiCI (Servicio de Difusión de la Creación Intelectual), UNLP La Plata, Argentina. ISSN 2314-1743, Monografía N° 1: 135 p.
34. Carrasco KR., Tilbury KL., Myers MS., 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J Fish Aquat Sci* 47: 2123–2136.
35. Carriquiriborde P., Mirabella P., Waichman A., Solomon K., Van den Brink PJ., Maund S., 2014. Aquatic Risk Assessment of Pesticides in Latin America. *Integr Environ Assess Manag* 10 (4) 539–542.
36. Cavalcante DGSM., Martinez CBR., Sofia SH., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat Res* 655: 41–46.
37. Cavas T., Ergene-Gözükara S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat Toxicol* 74: 264–271.
38. Cavas T., Könen S., 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22: 263–268.
39. Charruau P., Hénaut Y., Álvarez-Legorreta T., 2013. Organochlorine pesticides in nest substratum and infertile eggs of *American crocodiles* (Reptilia, Crocodylidae) in a Mexican Caribbean atoll. *Caribb J Sci* 47 (1) 1-12.
40. Chibuisi GA. & Adekunle AB., 2015. *In vivo* micronucleus test in the assessment of cytogenotoxicity of landfill leachates in three animal models from various ecological habitats. *Ecotoxicology*. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-0151589-3>.

Bibliografía citada

41. Coalova I., Mencacci S., Fassiano AV., 2013. Genotoxicidad de mezclas de pesticidas: ¿algo más que la suma de las partes? Pesticide mixtures genotoxicity: More than the sum of its parts? *Acta Toxicol Argent* 21(1) 5-14.
42. Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas, 2015. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura / Organización Mundial de Salud (FAO/OMS), Roma, 2014. ISBN 978-92-5-308548-4 (edición impresa)/ E-ISBN 978-92-5-308549, 37 p.
43. Cole JC. & Lowe CH., 1968. The Karyotype of a Lizard (*Sceloporus virgatus*) and Description of a Spontaneous Chromosomal Aberration. *Journal of the Arizona Academy of Science* 5 (2) 128-130.
44. Collino DJ., Salvagiotti F., Peticari A., Piccinetti C., Ovando G., Urquiaga S., Racca RW., 2015. Biological nitrogen fixation in soybean in Argentina: relationships with crop, soil, and meteorological factors. *Plant Soil*. DOI 10.1007/s11104-015-2459-8.
45. CONICET, 2009. Informe Glifosato. Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos, Decreto 21/2009. Evaluación de la información científica vinculada al Glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. 133 pp.
46. Crocodile Specialist Group (CSG). Crocodilian species. [En línea], Consulta: Junio de 2016. Disponible en: <http://www.iucncsg.org/pages/Crocodilian-Species.html>.
47. Crupkin AC., Carriquiriborde P., Mendieta J., Panzeri AM., Ballesteros ML., Miglioranza KSB., Menone ML., 2013. Oxidative stress and genotoxicity in the South American cichlid, *Australoheros facetus*, after short-term sublethal exposure to endosulfan. *Pest Bioch Phys* 105: 102–110.
48. da Silva-Zacarin ECM., 2014. Cellular death induced by pesticide residue on food. En: *Toxic Effects of Chemicals in Food, Chemical and Consumer Product Safety*, 2014. Eds: Grasiela D. de C. Severi-Aguiar and Armindo Antonio Alves. Kerala, India. ISBN: 978-81-308-0551-1. 6: 71-80.
49. Dar SA., Yousuf AR., Balkhi MH., Ganai FA., Bhat FA., 2015. Assessment of endosulfan induced genotoxicity and mutagenicity manifested by oxidative stress pathways in freshwater cyprinid fish crucian carp (*Carassius carassius* L.). *Chemosphere* 120: 273–283.
50. de Castilhos Ghisi N., de Oliveira EC., Prioli AJ., 2016. Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. *Chemosphere* 145: 42-54.

Bibliografía citada

51. de Cock M., van de Bor M., 2014. Obesogenic effects of endocrine disruptors, what do we know from animal and human studies? *Environ Int* 70: 15-24.
52. De Gerónimo E., Aparicio VC., Bárbaro S., Portocarrero R., Jaime S., Costa JL., 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere* 107: 423-431.
53. Demetrio PM., Bonetto C., Ronco AE., 2014. The effect of Cypermethrin, Chlorpyrifos, and Glyphosate active ingredients and formulations on *Daphnia magna* (Straus). *Bull Environ Contam Toxicol* 93: 268-273.
54. de Solla SR. & Martin PA., 2011. Absorption of current use pesticides by snapping turtle (*Chelydra serpentina*) eggs in treated soil. *Chemosphere* 85: 820-825.
55. de Solla SR., Palonen E., Martin PA., 2014. Toxicity of pesticides associated with potato production, including soil fumigants, to snapping turtle eggs (*Chelydra serpentina*). *Environ Toxicol Chem* 33 (1): 102-106.
56. Donayo P., Piña C., Larriera A., 2002. Período de incubación, banda de calcificación, peso de los huevos y desarrollo embrionario de *Caiman latirostris* a tres temperaturas diferentes. En: *Conservação e manejo de jacarés e crocodilos de América Latina*, Vol. 2. Ed. Verdade LM. & Larriera A. CN. Editoria. Piracicaba, Brasil. 79-90.
57. Eaton DL. & Klaassen CD., 2005. Principios de Toxicología. En: *Fundamentos de Toxicología*. Eds. Klaassen CD. & Watkins JB. III. Casarett y Doull. McGraw-Hill/Interamericana, Madrid, España, 2: 7-22.
58. Eaton DL., Gilbert SG., 2008. Principles of toxicology. En: *Toxicology. The basic sciences of Poison*. Seventh Ed. Klaassen CD. Casarett & Doull's. McGraw-Hill/ Medical publishing division: New York, Chicago, San Francisco, Lisbon, London, Madrid, Mexico City, New Delhi, San Juan Seoul, Singapore, Sydney, Toronto. 1: 1-107.
59. Eisenreich KM. & Rowe CL., 2013. Experimental exposure of eggs to polybrominated diphenyl ethers BDE-47 and BDE-99 in red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*) and snapping turtles (*Chelydra serpentina*) and possible species-specific differences in debromination. *Environ Toxicol Chem* 32 (2): 393–400.
60. Elhajouji A., Lukamowicz M., Cammerer Z., Kirsch-Volders M., 2011. Review: Potential thresholds for genotoxic effects by micronucleus scoring. *Mutagenesis* 26 (1) 199–204.

Bibliografía citada

61. EXTOTOXNET, 1996. The Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles (PIPs). Disponible en: <http://extotoxnet.orst.edu/> . Consultado: Julio de 2016.
62. Fenech M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res* 455: 81–95.
63. Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan AT., Surralles J., Crott JW., Parry J., Norppa H., Eastmond DA., Tucker JD., Thomas P., 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26 (1): 125–132.
64. Fenech M., Knasmueller S., Bolognesi C., Bonassi S., Holland N., Migliore L., Palitti F., Natarajan AT., Kirsch-Volders M., 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. *Mutat Res-Rev Mutat Res* <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.04.008>
65. Ferguson MWJ., 1981. The application of embryological studies of alligator farming. En: Proceedings of the first annual alligator production conference. P. Cardeilhac, T. Lane y R. Larsen (eds.). University of Florida, Gainesville. p. 129-145.
66. Fischer K., Ekener-Petersen E., Rydhmer L., Björnberg KE., 2015. Social Impacts of GM Crops in Agriculture: A Systematic Literature Review. *Sustainability* 7: 8598-8620 DOI: 10.3390/su7078598.
67. Galloway SM (Chair). Aardema MJ (Rapporteur), Ishidate MJr, Ivett JL, Kirkland DJ, Morita T, Mosesso P, Sofuni T., 1994. Report from working group on *in vitro* tests for chromosomal aberrations. *Mutat Res* 312: 241-261.
68. Gcarnett ST. & Murray RM. 1986. Parameters Affecting the Growth of the Estuarine Crocodile, *Crocodylus porosus*, in Captivity. *Aust J Zool* 34, 21: 1-23.
69. Guía estratégica para el Agro (GEA), 2016. – Informe especial sobre cultivos, [En línea] Consultado: Marzo de 2016. <https://www.bcr.com.ar/Pages/gea/estimaProd.aspx>
https://www.bcr.com.ar/GEA%20Archivos%20Diarios/Informes/Informe%20especial%20074%202016_03_09.pdf
70. Gökalp Muranli FD. & Güner U., 2011. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Mutat Res* 726: 104–108.

Bibliografía citada

71. González WL., 2015. Biodiesel Industria Nacional - La sustentabilidad en tensión-Informe IPID (Instituto por la igualdad y la democracia), 20 de Julio de 2015. [En línea] Consulta: Abril 2016. Disponible en: www.ipidar.org
72. Grün F. and Blumberg B., 2006. Environmental Obesogens: Organotins and Endocrine Disruption via Nuclear Receptor Signaling. *Endocrinology (Supplement)* 147 (6) 50-55.
73. Guilherme S., Gaivao I., Santos MA., Pacheco M., 2010. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup®—a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis* 25 (5): 523–530.
74. Guo FZ., Zhang LS., Wei JL., Li YB, Shi ZX., Yang YM., Zhou XQ., Sun ZW., 2015. Endosulfan induced the arrest of the cell cycle through inhibiting the signal pathway mediated by PKC- α and damaging the cytoskeleton in spermatogonial cells of mice *in vitro*. *Toxicol Res* 4: 508-518.
75. Hamlin HJ. & Guillette LJJ., 2011. Embryos as Targets of Endocrine Disrupting Contaminants in Wildlife. *Review. Birth Defects Res (Part C)* 93:19-33.
76. Hang S., Rampoldi EA., Negro GJ., 2011. Herbicide behavior in non-tillage systems. En: Piotrowski, K.D. (Ed.), *Herbicides: Properties, Crop Protection and Environmental Hazards*. Nova Science Publishers, New York, USA, ISBN: 978-1-61209-301-7. 3: 121-159.
77. Harabawy ASA., Mosleh YYI., 2014. The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Ecotox Environ Safe* 104:28–35.
78. Harikrishnan VR. & Usha S., 2004. Endosulfán – Hoja informativa y Respuestas a preguntas frecuentes. *Thanal Conservation Action / Information Network L-14* Jawahar Nagar, Kowdiar, Thiruvananthapuram, 695 003. Kerala, India. 22 p.
79. Hernández AF., Parrón T., Tsatsakis AM., Requena M., Alarcón R., López-Guarnido O., 2013. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology*, 307, 136–145.
80. Hopkins W., 2005. Use of Tissue Residues in Reptile Ecotoxicology: A Call for Integration and Experimentalism. En: *Toxicology of Reptiles. New perspectives: Toxicology and the Environment*. Gardner SC., Oberdörster E. (Eds.). Taylor & Francis Group. Florida, USA. 3: 35-62.

Bibliografía citada

81. Hunt H., CarlosBonetto Resh VH., ForsinBuss D., Marrochi N., Lydy MJ., 2016. Insecticide concentrations in stream sediments of soy production regions of South America. *Sci Total Environ.* 547: 114–124
82. International Agency for Research on Cancer (IARC), 2015. World Health Organization. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans Lyon, France. <http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/pdf/MonographVolume112.pdf>. Consultado: Julio de 2016.
83. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), 2015. Archivo: Plaguicidas agregados al suelo. Ediciones INTA. Libro de edición Argentina. ISBN 978-987-521-665-567 p.
84. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), 2016. Lacelli GA, Ybran RG. Informe estadístico del mercado de la soja [En línea]. Fecha de publicación: 14/03/2016. [http://inta.gob.ar/busqueda/tipo-de-contenido/documento/tipo-de-documento/informe-7783/tema/agricultura-extensiva-6832/palabra-clave/soja-7656/p/buscar//sort by/field fecha de publicacion/sort order/DESC](http://inta.gob.ar/busqueda/tipo-de-contenido/documento/tipo-de-documento/informe-7783/tema/agricultura-extensiva-6832/palabra-clave/soja-7656/p/buscar//sort%20by/field%20fecha%20de%20publicacion/sort%20order/DESC) <http://inta.gob.ar/documentos/informe-estadistico-del-mercado-de-la-soja>
85. IPCS Environmental Health Criteria 225. Principles For Evaluating Health Risks To Reproduction Associated With Exposure To Chemicals, Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, 2001.
86. Jindal R, Verma S, 2015. *In vivo* genotoxicity and cytotoxicity assessment of cadmium chloride in peripheral erythrocytes of *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotox Environ Safe* 118:1–10.
87. Kirschbaum AA., Seriani R., Pereira CDS., Assunção A., Abessa DMS., Rotundo MM., Ranzani-Paiva MJT., 2009. Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, São Paulo, Brazil. *Gen Mol Biol* 32 (1) 151-154.
88. Krieger R., 2010. Handbook of Pesticide Toxicology, Two-Volume Set: Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, Academic Press; México 3° ed. 1186 p.
89. Lajmanovich RC., Cabagna-Zenklusen MC., Attademo AM., Junges CM., Peltzer PM., Bassó A., Lorenzatti E., 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 769: 7-12.
90. Lajmanovich RC, Attademo AM., Simoniello MF, Poletta GL, Junges CM, Peltzer PM, Grenón P, Cabagna-Zenklusen MC, 2015. Harmful Effects of the

Bibliografía citada

- Dermal Intake of Commercial Formulations Containing Chlorpyrifos, 2,4-D, and Glyphosate on the Common Toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water Air Soil Pollut* 226: 427. DOI 10.1007/s11270-015-2695-9.
91. Larriera A., 1990. A program of monitoring and recovering of Caiman's populations in Argentina with the aim of management. En: Crocodiles. Proceedings of the 10th Working Meeting of the crocodiles specialist group of the IUCN. The World Conservation Union, Gland, Switzerland, 2: 1-5.
92. Larriera A. 1992. La conservación y el manejo de *Caiman latirostris* en la Argentina. Anais do II Workshop sobre Conservação e Manejo do Jacaré-de-Papo-Amarelo (*Caiman latirostris*). CIZBAS/ESALQ, Universidade de Sao Paulo. Piracicaba, Brasil, 8-17.
93. Larriera A., 1998. The *Caiman latirostris* ranching program in Santa Fe, Argentina. The first commercial rearing, en: Crocodiles. Proceedings of the 14th Working Meeting of the CSG/IUCN. The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge. 379-385.
94. Larriera A. & Imhof A., 2006. Proyecto Yacaré. Cosecha de huevos para cría en granjas del género Caimán en la Argentina. En: "Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina. Programas de uso sustentable". Bolkovic, M. L., Ramadori D. (Eds.). Dirección de Fauna Silvestre. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires, Argentina. 51-64.
95. Larriera A., Imhof A., Siroski P., 2008. Estado actual de los programas de conservación y manejo de género *Caiman* en Argentina. En: Contribución al conocimiento del Género Caiman de Suramérica. Castroviejo J., Ayarzagüena J., Velasco A. (Eds.), Public. Asoc. Amigos de Doña Ana 18. Sevilla, España. 139-179.
96. Latorre MA., Romito ML., Larriera A., Poletta GL., Siroski PA., 2016. Total and differential white blood cell counts in *Caiman latirostris* after *in ovo* and *in vivo* exposure to insecticides. *J Immunotoxicol* DOI: 10.1080/1547691X.2016.1236854
97. Lindberg HK., Wang X., Järventaus H., Falck GC., Norppa H., Fenech M., 2007. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat Res* 617: 33-45.
98. López González EC., Latorre MA., Larriera A., Siroski PA., Poletta G.L., 2013. Induction of micronuclei in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) hatchlings exposed *in vivo* to Roundup® (glyphosate) concentrations used in agriculture. *Pestic Biochem Phys* 105: 131-134.

Bibliografía citada

99. López González EC, Larriera A, Siroski PA, Poletta GL., 2017. Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. *Ecotox Environ Safe* 136: 84-91.
100. Lupi L., Miglioranza KSB., Aparicio VC., Marino D., Bedmar F., Wunderlin DA., 2015. Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Sci Total Environ* 536: 687–694.
101. Lydy M., Belden J., Wheelock C., Hammock B. and Denton D., 2004. Challenges in regulating pesticide mixtures. *Ecol Soc.* 9 (6) 1-15.
102. Magnasco E. & Di Paola MM., 2015. Agroquímicos en Argentina ¿Dónde estamos? ¿A dónde vamos? Informe ambiental anual. Fundación Ambiente y Recursos Naturales (FARN). Disponible en: <http://farn.org.ar/wp-content/uploads/2015/06/Agroqu%C3%ADmicos-en-Argentina-%C2%BFD%C3%B3nde-estamos-%C2%BFA-d%C3%B3nde-vamos.pdf>
103. Marino D. & Ronco A., 2005. Cypermethrin and Chlorpyrifos Concentration Levels in Surface Water Bodies of the Pampa Ondulada, Argentina- *Bull. Environ Contam Toxicol* 75: 820-826.
104. Martins AJ. & Denise V., 2012. The Pyrethroid Knockdown Resistance, En: *Agricultural and Biological Sciences* » "*Insecticides - Basic and Other Applications*", Soloneski, S. and Larramendy M. (Eds). ISBN 978-953-51 0007-2. Chapter 2. DOI: 10.5772/30588. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/insecticides-basic-and-other-applications/the-pyrethroid-knockdown-resistance>
105. Mayne GJ, Bishop CA, Martin PA, Boermans HJ, Hunter B., 2005. Thyroid function in nestling tree swallows and eastern bluebirds exposed to non-persistent pesticides and *p, p*-DDE in apple orchards of southern Ontario, Canada. *Ecotoxicology* 14: 381-396.
106. McCarroll N., Keshava N., Dearfield K., Owen R., Keshava C., Protzel A., Cimino M., Kligerman A., Putzrath R., Chu M., and Schoeny R., 2008. An Evaluation of the Mode of Action Framework for Mutagenic Carcinogens Case Study: Cyclophosphamide. Review article. *Environ Mol Mutagen* 49:117-131.
107. Medan D., Torretta JP., de la Fuente EB., Hodara K, Montaldo NH. 2011. Effects of agriculture expansion and intensification on the vertebrate and invertebrate diversity in the Pampas of Argentina. *Biodivers Conserv* 20:3077–3100

Bibliografía citada

108. Melo KM., Grisolia CK., Pieczarka JC., de Souza LR., de Souza Filho J., Nagamachi CY., 2014. FISH in micronucleus test demonstrates aneugenic action of rotenone in a common freshwater fish species, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mutagenesis* 29 (3) 215-219.
109. Messel H., King FW., Ross JP., 1995. Introducción: la conservación y el manejo de caimanes y cocodrilos, En: La conservación y el manejo de caimanes y cocodrilos de América Latina. Larriera A., Verdade LM. (Eds.). Fundación Banco Bica, Santo Tomé, Santa Fe, Argentina 1: 1-3.
110. Milnes MR, Bryan TA, Medina JG, 2005. Developmental alterations as a result of *in ovo* exposure to the pesticide metabolite p,p'-DDE in *Alligator mississippiensis*. *Gen Comp Endocrinol* 144: 257-263.
111. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca: Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGPyA). Mapa superficie cubierta Soja Argentina, Octubre 2015. Disponible en: http://www.agroindustria.gob.ar/site/swf/mapa_soja_octubre.pdf [En línea], Consulta: 11/7/16.
112. Mitchelmore CL., Rower CL., Place AR., 2005. Tools for Assessing Contaminant Exposure and Effects in Reptiles. En: *Toxicology of Reptiles*. New perspective: Toxicology and the Environment, Gardner SC. & Oberdörster E. (Eds.), Taylor & Francis Group, Boca Raton. Florida, USA. 4: 63-122.
113. Mostafalou S. & Abdollahi M., 2013. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. Invited Review Article. *Toxicol App Pharm* 268: 157-177.
114. Mouchet F., Landois P., Sarremejean E., Bernard G., Puech P., Pinelli E., Flahaut E., Gauthier L., 2008. Characterisation and *in vivo* ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquat Toxicol* 87 (2) 127-137. ISSN 0166-445X.
115. Mudry MD. & Abrevaya X., 2006. Evaluación de la Aneugenicidad y Clastogenicidad. En: *Genética Toxicológica*, Mudry MD., Carballo MA. (Eds.). De los Cuatro Vientos Editorial, Buenos Aires, Argentina. 5: 227-298.
116. Mugni H., Pardi M., Demetrio P., Paracampo A., Bonetto C., 2012. Toxicity Persistence in Runoff Water and Soil in Experimental Soybean Plots Following Chlorpyrifos Application. *Bull Environ Contam Toxicol* 89: 208-212.
117. Muller JK., Gross TS., Borgert CJ., 2007. Topical doses delivery in the reptilian eggs treatment model. *Environ Toxicol Chem* 26 (5) 914-919.

Bibliografía citada

118. Mussalli-Galante P., Tovar-Sánchez E., Valverde M., Rjas del Castillo E., 2013. Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystem. *Rev Int Contam Amb* 29 (1) 117-140.
119. Myburgh JG, Kirberger RM, Steyl JCA, Soley JT, Booyse DG, Huchzermeyer FW, Lowers RH, Guillette LJ., 2014. The postoccipital spinal venous sinus of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*): Its anatomy and use for blood sample collection and intravenous infusions. *J S Afr Vet Assoc* 85: (1) 1-10.
120. National Research Council (NRC- USA) 1987. Committee on biological markers of the National Research Council. Biological markers in environmental health research. *Eviron Health Perspect* 74: 3-9.
121. Newbold RR., 2010. Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones (Athens)* 9: 206-17.
122. Novillo A., Noppadon K., Marquez E., Callard IP., 2005. Reptilian Genotoxicity. En: *Toxicology of Reptiles. New perspective: Toxicology and the Environment*, Gardner SC., Oberdörster E. (Eds.). Taylor & Francis Group, Florida, USA. 9: 241-266.
123. Oliveira M., Ahmad I., Maria VL., Ferreira CSS., Serafim A., Bebianno MJ., Pacheco M., Santos MA., 2010. Evaluation of oxidative DNA lesions in plasma and nuclear abnormalities in erythrocytes of wild fish (*Liza aurata*) as an integrated approach to genotoxicity assessment. *Mutat Res* 703: 83-89.
124. Organización Mundial de la Salud (OMS), 2009. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva-Switzerland. 2010. ISBN 978 92 4 154796 - ISSN: 1684-1042. Disponible en: http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf?ua=1
125. Ortiz-Santaliestra MA, Egea-Serrano A., 2013. Análisis del impacto de la contaminación química sobre la herpetofauna: nuevos desafíos y aplicaciones prácticas. *Bol Asoc Herpetol Esp* 24 (1) 1-36.
126. Pampalona J., Soler D., Genescà A., Tusell L., 2010. Telomere dysfunction and chromosome structure modulate the contribution of individual chromosomes in abnormal nuclear morphologies. *Mutat Res* 683: 16-22.
127. Paracampo AH., Mugni HD., Demetrio PM., Pardi MH., Bulus GD., Asborn MD., Bonetto CA., 2012. Toxicity persistence in runoff and soil from experimental soybean plots following insecticide applications. *J Environ Sci Heal B* 47 (8) 761-768.

Bibliografía citada

128. Paracampo A., Solis M., Bonetto C., Mugni H., 2014. Acute toxicity of chlorpyrifos to the non-target organism *Cnesterodon decemmaculatus*. Int J Environ Heal R <http://dx.doi.org/10.1080/09603123.2014.903903>.
129. Patel S., Pandey AK., Bajpayee M., Parmar D., Dhawan A., 2006. Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: Evidence from the comet assay. Mutat Res 607: 176-183.
130. Pérez-Iglesias JM., Ruiz de Arcaute C., Nikoloff N., Dury L., Soloneski S., Natale GS., Larramendy ML., 2014. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). Ecotox Environ Safe 104: 120-126.
131. Polard T., Jean S., Gauthier L., Laplanche C., Merlina G., Sánchez-Pérez JM., Pinelli E., 2011. Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France. Aquat Toxicol 101 (1): 126-134. ISSN 0166-445X
132. Poletta GL., Larriera A., Kleinsorge E., Mudry MD., 2008a. *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. Mutat Res 650: 202-209.
133. Poletta GL., Larriera A., Siroski PA., 2008b. Broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) growth under different rearing densities. Short communication. Aquaculture 280: 264–266.
134. Poletta GL., Kleinsorge E., Mudry MD., Larriera A., 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. Mutat Res 672: 95-102.
135. Poletta GL., Kleinsorge E., Paonessa A., Mudry MD., Larriera A., Siroski PA., 2011. Genetic enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed *in ovo* to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. Ecotox Environ Safe 74: 852-859.
136. Poletta G.L., López González EC., Burella PM., Romito ML., Siroski PA., Mudry MD. Biomarkers of environmental contamination in reptile species: the effect of pesticide formulations on broad-snouted caiman *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). En: Larramendy ML. (Ed.) "Non-Conventional Animal Models in Ecotoxicological and Genotoxicological Studies, Volume 1: Aquatic Models", Royal Soc Chem. En Prensa.

Bibliografía citada

137. Pollo FE., Bionda CL., Salinas ZA., Salas NE., Martino AL., 2015. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environ Monit Assess* 187: 581.
138. Prieto Z., Leon-Incio L., Quijano-Jara C., Fernandez R., Polo-Benites E., Vallejo Rodriguez R., Villegas-Sanchez L., 2008. Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (Tilapia). *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 25 (1): 51-58.
139. Primost JE., 2013. Estudio de niveles ambientales de glifosato y AMPA en una zona modelo de intensa actividad agrícola en los alrededores de Urduyarrain. Entre Ríos. Para optar al título de Doctor: Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. 80 pp.
140. Reboratti C., 2010. Un mar de Soja: la nueva agricultura en Argentina y sus consecuencias. *Revista de Geografía Norte Grande* 45: 63-76.
141. Relyea, R. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159: 363-376.
142. Rodriguez EM., 2006. Biomarcadores de fauna acuática: estudio de campo y de laboratorio en un contexto ecotoxicológico. En: *Genética Toxicológica*. Mudry MD., Carballo MA. (Eds.). De los Cuatro Vientos Editorial, Buenos Aires, Argentina. 17: 459-479.
143. Ronco, A., Carriquiriborde, P., Natale, G. S., Martin, M.L., Mugni, H., & Bonetto, C., 2008. Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides impact on low order stream ecosystems of the Pampasic Region. En: *Ecosystem Ecology Research Trends*, Editors: J. Chen and C. Guo. Nova Publishers.
144. Ronco AE., Marino DJG., Abelando M., Almada P., Apartin CD., 2016. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ Monit Assess* 188: 458.
145. Ross JP., 1998. Status survey and conservation Action Plan: Revised Action Plan for Crocodiles. IUCN-The World Conservation Union, Gland, Switzerland, 96 pp.
146. Ruiz de Arcaute C., Demetrio PM., Ronco AE., 2012. Influence of existing site contamination on sensitivity of *Rhinella fernandezae* (Anura, Bufonidae) tadpoles to Lorsban® 48E formulation of chlorpyrifos. *Ecotoxicology* 21: 2338-2348.

Bibliografía citada

147. Sánchez-Bayo F., 2011. Impacts of agricultural pesticides on terrestrial ecosystems. En: Sánchez-Bayo, F., van den Brink, P.J., Mann, R.M. (Eds.), Ecological Impacts of Toxic Chemicals Bentham Publishers. 4: 75-107.
148. Scalabrini Ortíz, 2013. Costos y rentabilidad del cultivo de soja en la Argentina. Centro de estudios económicos y sociales (CESO). Informe económico especial N° 2: 28p. Disponible en: www.ceso.com.ar
149. Schaumburg, LG., Siroski PA., Poletta GL., Mudry MD., 2016. Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. Pest Biochem Phys 130: 71-78.
150. Schmid, W., 1975. The micronucleus test. Mutat Res 31: 9-15.
151. SENASA, 2011. Resol 511/11 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria-Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=%20n&in=1501&ino=1501&io=17737> [En línea] Consultado: 28/07/16.
152. Seriani R., Tavares Ranzani-Paiva MJ., Silva-Souza AT., Roseli Napoleão S., 2011. Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá 33 (1): 107-112.
153. Seriani R., Galvao Franc J., Lombardi JV., Brito JM., Tavares Ranzani-Paiva JM., 2014. Hematological changes and cytogenotoxicity in the tilapia *Oreochromis niloticus* caused by sub-chronic exposures to mercury and selenium. Fish Physiol Biochem DOI 10.1007/s10695-014-9984-x.
154. Sharma S., Nagpure NS., Kumar R., Pandey S., Srivastava SK., Singh PJ., Mathur PK., 2007. Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the comet assay. Arch Environ Contam Toxicol 53 (4): 617-623.
155. Shao B., Zhu L., Dong M., Wang J., Wang J., Xie H., Zhu S., 2012. DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in zebrafish (*Danio rerio*), Ecotoxicology 21(5) 1533-1540.
156. Sistema Integrado de Información Agropecuaria. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de la Nación (SIIA-MAGyP), 2016. [En línea] www.minagri.gob.ar
157. Simoncini MS., Fernández MS., lungman MJ., 2014. Cambios estructurales en cáscaras de huevos de *Caiman latirostris*. Structural changes in eggshells of *Caiman latirostris*. Rev Mex Biodivers 85: 78-83.

Bibliografía citada

158. Simoniello MF., Gigena F., Poletta G., Loteste A., Kleinsorge E., Campana M., Scagnetti J., Parma MJ., 2009. Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae), Bull Environ Contam Toxicol 83: 155-158.
159. Sinha N., Narayan R., Saxena DK., 1997. Effect of Endosulfan on the Testis of Growing Rats. Bull Environ Contam Toxicol 58: 79-86.
160. Siroski P A., 2004. *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* Population Surveys in Formosa Province, Argentina. En: Proceedings of the 17th Working Meeting of the CSG/IUCN - The World Conservation Union, Darwin, NT, Australia. 443-446 pp.
161. Soloneski S., Ruiz de Arcaute C., Larramendy ML., 2016. Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba and glyphosate-based commercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae) late-stage larvae. Environ Sci Pollut Res DOI 10.1007/s11356-016-6992-7.
162. Sparling DW, Matson C, Bickham J, Doelling-Brown P, 2006. Toxicity of glyphosate as Glypro® and LI700 to Read-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) embryos and early hatchlings. Environ Toxicol Chem 25 (10) 2768-2774.
163. Speit G., Autrup H., Crebelli R., Henderson L., Kirsch-Volders M., Madle S., Parry JM., Sarrif AM., Vrijhof H., 2000. Thresholds in genetic toxicology — concluding remarks. Mutat Res 464: 149-153.
164. SPSS para Windows. Versión: 17.0. SPSS Inc. Chicago, USA. Disponible en: <http://www.spss.com/>
165. Suárez RP., Calamari NC., Codugnello N., Vera-Candiotti J., Zaccagnini ME., Natale GS., Boca T., Babbitt KJ., Cerezo A., Damonte MJ., Gavier-Pizarro G.I., 2016. Anuran responses to spatial patterns of agricultural landscapes in Argentina. Landscape Ecol DOI 10.1007/s10980-016-0426-2.
166. Svartz G., Marino D., Ronco A., Pérez Coll CS., 2015. Differential Uptake of Endosulfan in the South American Toad Under Sublethal Exposure. Arch Environ Contam Toxicol. DOI 10.1007/s00244-015-0164-5
167. Tomasoni M. 2013. No hay fumigación controlable generación de derivas de plaguicidas. Red Universitaria de Ambiente y Salud /Red de Médicos de pueblos Fumigados. Disponible en: <http://www.reduas.com.ar/wp-content/uploads/downloads/2013/11/DERIVA-practica-incontrolable-2013.pdf>
[En línea] Consultado: Julio de 2016.

Bibliografía citada

168. Udroui I., 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. Review. *Aquat Toxicol* 79: 201-204.
169. Uggini G.K., Patel, P.V., Balakrishnan, S., 2010. Embryotoxic and Teratogenic Effects of Pesticides in Chick Embryos: A Comparative Study Using Two Commercial Formulations. *Environ Toxicol* DOI: 10.1002/tox.20627.
170. Urcola HA., de Sartre XA., Veira IJr., Elverdin J., Albaladejo C., 2015. Land tenancy, soybean, actors and transformations in the pampas: A district balance. *J Rural Stud* 39: 32-40.
171. US NRC. Scientific frontiers in developmental toxicology and risk assessment. Washington, DC, US National Research Council, National Academy Press, 2000.
172. Vera-Candiotti J., Soloneski S., Larramendy ML., 2013a. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Ecotox Environ Safe* 89: 166-173.
173. Vera-Candiotti J., Soloneski S., Larramendy ML. 2013b. Chlorpyrifos-Based Insecticides Induced Genotoxic and Cytotoxic Effects in the Ten Spotted Live-Bearer Fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Environ Toxicol* 29:1390-1398.
174. Verdade LM., 1997. Morphometric Analysis of the broad-snouted Caiman (*Caiman latirostris*): an assessment of individual's clutch, body size, sex, age, and area of origin. Ph.D. Dissertation, University of Florida, Gainesville, Florida, USA. 174 p.
175. Vieira CED, Gomes Costa P, Lunardelli B, Fernandes de Oliveira L, da Costa Cabrera L, Risso WE, Primel EG, Meletti PC, Fillmann G, Bueno dos Reis Martinez C., 2016. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Sci Total Environ* 542: 44-56.
176. Webb GJW., Manolis SC., Ottley B., Heyward A., 1992. Crocodile research and management in the Northern Territory: 1990-92. Proceedings of the 11th Working Meeting of the IUCN-SSC Crocodile Specialist Group, Zimbabwe, pp. 233–275.
177. World Health Organization (WHO), 1985. Guidelines for the study of genetic effects in human populations. *Environ Health Criteria* 46, Ginebra.

Bibliografía citada

178. Widder PD. & Bidwell JR., 2006. Cholinesterase activity and behavior in chlorpyrifos exposed *Rana sphenoccephala* tadpoles. Environ Toxicol Chem 25 (9) 2446-2454.
179. Yanosky AA., 1990. Histoire naturelle du Caïman á museau large (*Caiman latirostris*), un Alligatoriné mal connu. Rev Fr Aquariol Herpetol 17: 19-31.
180. Yin X., Zhu G., Li XB., Liu S., 2009. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by comet assay and micronucleus test. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen 680 (1): 2-6.
181. Zippel KC., Lillywhite HB., Mladinich CRJ., 2003. Anatomy of the crocodilian spinal vein. J Morphol 258: 327-335.

"Evaluación del efecto genotóxico producido por exposición a formulaciones comerciales de Cipermetrina, Clorpirifos, Endosulfán, Glifosato y mezclas de las mismas, en etapas tempranas del desarrollo de *Caiman latirostris*"

ANEXO I

ANEXO I



Registrada Bajo el N° 11820

Cámara de Senadores de la Provincia de Santa Fe

"Año del Padre de la Patria, General Don José de San Martín"

LA LEGISLATURA DE LA PROVINCIA SANCIONA CON FUERZA DE

LEY:

ARTICULO 1º - Ratificase en todos sus términos el Convenio suscripto el día 14 de Junio de 1994, entre el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Industria y Comercio y la Mutual del Personal Civil de la Nación, por el que se conviene realizar en forma conjunta el "Programa de Desarrollo e Implementación del Ranqueo (cría en granjas) del Yacaré Overo".

El mencionado convenio fue aprobado ad-referéndum de la Honorable Legislatura mediante Decreto N° 2154/94, e inscripto en fecha 16/06/94, en el Registro de Tratados, Convenios y Contratos Interjurisdiccionales, al Folio 183, Tomo I, que se agrega y forma parte integrante de esta ley.

ARTICULO 2º - Comuníquese al Poder Ejecutivo.

DADA EN LA SALA DE SESIONES, DE LA LEGISLATURA DE LA PROVINCIA DE SANTA FE, A LOS VEINTIOCHO DÍAS DEL MES DE SEPTIEMBRE DEL AÑO DOS MIL.

[Firma]
ROBERTO NAZARENO HAMMERLY
PRESIDENTE
CAMARA DE DIPUTADOS



AVELINO LAGO
SECRETARIO PARLAMENTARIO
CAMARA DE DIPUTADOS



[Firma]
ROBERTO BETIQUE
PRESIDENTE PROVISIONAL
CAMARA DE SENADORES

RECIBIDO
A LAS
11:12
4 OCT. 2000
Registro Graf. de Leyes

[Firma]
Dr. RICARDO W. PAULICHENGO
SECRETARIO LEGISLATIVO
CAMARA DE SENADORES

ESCOPIA
[Firma]
RAQUEL VICH de ALVARADO
DIRECTORA GENERAL DE DESPACHO
MINISTERIO DE AGRICULTURA.