

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias
Biológicas

Identificación y desarrollo de marcadores de expresión génica y daño genotóxico específico para evaluación del efecto inducido por plaguicidas en *Caiman latirostris*

Lic. Lucia Magdalena Odetti

Director de Tesis: Dra. Gisela L. Poletta

Co-director de Tesis: Dra. Ma. Fernanda Simoniello

Lugar de realización: Laboratorio y Cátedra de Toxicología,
Farmacología y Bioquímica Legal – FBCB - UNL

-2021-

Agradecimientos

En este trabajo de Tesis Doctoral han colaborado una gran cantidad de personas e instituciones, que me han acompañado de una forma u otra en este largo camino. A todos/as, simplemente gracias.

A la Universidad Nacional del Litoral y a toda su comunidad educativa por brindarme siempre un espacio para que pueda ser parte.

A la Facultad de Bioquímicas y Ciencias Biológicas y en especial a la Secretaría de Posgrado por permitirme realizar mi carrera de Doctorado. A todos/as, por su profesionalismo y dedicación en cada una de las etapas que transité.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme la beca, con la cual pude llevar adelante este trabajo de Tesis Doctoral.

A los proyectos de investigación que financiaron esta Tesis: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2016 - 2020), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP 11220130100478CO) y al Grant del Grupo de Especialistas de Cocodrilos de la UICN-SSC (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza- Comisión de Supervivencia de Especies).

A mis Directoras Gise y Fer, por su infinita paciencia, carisma, comprensión y dedicación. Por darme la posibilidad de realizar y terminar mi tesis. Por sus correcciones y por el esfuerzo que dedicaron en este trabajo. Gracias, sin ustedes no hubiese sido posible.

Al grupo humano de la Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal por permitirme el espacio para realizar mi trabajo de Tesis Doctoral y los buenos momentos compartidos.

A Enrique y Carlina por su colaboración en este trabajo, su calidez y ayuda en todo momento.

A los integrantes del "Proyecto Yacaré" por el espacio brindado y su calidez como grupo.

Al jurado, por su tiempo y corrección y en especial a mi Consejera de Estudio.

A mi familia ¡INFINITAS GRACIAS!, por ser mi motor y apoyo incondicional en todo. En especial mis viejos y hermanos por ser el sostén de todos los días.

A mi sobrina, Antonia.

A Sebas, por ser mi compañero a lo largo de todos estos años, mi mejor amigo.
Por su cariño y aguante.

A mis amigas por todo el camino recorrido y por siempre, siempre estar.

Publicaciones

Los resultados de este trabajo de Tesis Doctoral forman parte de los siguientes trabajos publicados:

- 1- **LM Odetti**, EV Paravani, MF Simoniello, GL Poletta (2021) Identification and evaluation of antioxidant and reference genes for quantitative real-time PCR in blood of *Caiman latirostris*. Heliyon at. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06253>
- 2- EV Paravani, **LM Odetti**, MF Simoniello, MF, GL Poletta (2020) Molecular analysis and bioinformatic characterization of cooper, zinc-superoxide dismutase (Cu/Zn-sod) gene of *Caiman latirostris*. Molecular Biology Reports. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05937-y>
- 3- **LM Odetti**, EC López González, ML Romito, MF Simoniello, GL Poletta (2020) Genotoxicity and oxidative stress in *Caiman latirostris* hatchlings exposed to pesticide formulations and their mixtures during development through incubation material. Ecotoxicology and Environmental Safety. 193, 110312. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110312>
- 4- EV Paravani, **LM Odetti**, MF Simoniello, MF, GL Poletta (2020) *Caiman latirostris* extracellular superoxide dismutase 3 (SOD3) mRNA, complete cds. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN326099.1/>
- 5- PM Burella, **LM Odetti**, MF Simoniello, GL Poletta (2018) Oxidative damage and antioxidant defense in *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) exposed *in ovo* to pesticide formulations. Ecotoxicology and Environmental Safety 161 (2018) 437–443. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.006>

Índice

| | |
|--|-----------|
| 1. Abreviaturas y símbolos | 1 |
| 2. Resumen | 4 |
| <i>ABSTRACT</i> | 6 |
| 3. Introducción | 8 |
| 3.1 Expansión de la frontera agrícola en la Argentina..... | 8 |
| 3.2 Plaguicidas | 12 |
| 3.2.1 Características generales | 12 |
| 3.2.2 Clasificación y consideraciones toxicológicas..... | 13 |
| 3.2.2.1 Herbicidas..... | 15 |
| 3.2.2.1.1 Glifosato | 16 |
| 3.2.2.2 Insecticidas | 18 |
| 3.2.2.2.1 Piretroides | 18 |
| 3.2.2.2.1.1 Cipermetrina..... | 18 |
| 3.2.2.2.2 Organofosforados..... | 19 |
| 3.2.2.2.2.1 Clorpirifos | 21 |
| 3.3 Problemática ambiental asociada a la expansión agrícola y al uso de plaguicidas | 22 |
| 3.4 Organismos centinelas | 26 |
| 3.4.1 Características generales | 26 |
| 3.4.2 Biomarcadores del efecto de los plaguicidas en especies centinelas | 28 |
| 3.4.2.1 Estrés oxidativo..... | 29 |
| 3.4.2.2 Daño al ADN | 33 |
| 3.4.2.3 Expresión génica..... | 37 |
| 3.4.2.4 Parámetros de crecimiento | 39 |
| 3.5 <i>Caiman latirostris</i> : especie centinela en la Provincia de Santa Fe | 41 |
| 3.5.1 Características y distribución | 41 |
| 3.5.2 Antecedentes en el área sobre <i>Caiman latirostris</i> | 43 |
| 3.6 Aporte original | 45 |
| 4. Objetivos | 47 |
| 4.1 Objetivo general | 47 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.2 | Objetivos específicos..... | 47 |
| 5. | Materiales y métodos | 48 |
| 5.1 | Identificación de genes de interés por PCR convencional..... | 48 |
| 5.1.1 | Ejemplares de <i>C. latirostris</i> | 48 |
| 5.1.2 | Extracción de ARN y síntesis de ADNc..... | 48 |
| 5.1.3 | Diseño de <i>primers</i> | 49 |
| 5.1.4 | Identificación de los genes mediante PCR convencional | 51 |
| 5.2 | Ensayos experimentales <i>in vivo</i> | 52 |
| 5.2.1 | Colecta de huevos de <i>C. latirostris</i> | 52 |
| 5.2.2 | Evaluación <i>in vivo</i> de los efectos de las formulaciones de GLI, CIP y CPF por separado y en mezclas durante el período embrionario y el primer año de vida..... | 54 |
| 5.2.2.1 | Ensayos de exposición embrionaria por pulverización sobre el material del nido | 55 |
| 5.2.2.1.1 | Diseño experimental y tratamientos | 55 |
| 5.2.2.2 | Ensayos de exposición <i>in vivo</i> de neonatos y juveniles en condiciones semi-naturales. | 59 |
| 5.2.2.2.1 | Diseño experimental y tratamientos..... | 59 |
| 5.2.2.3 | Variables registradas | 64 |
| 5.2.2.3.1 | Análisis de los plaguicidas | 64 |
| 5.2.2.3.2 | Obtención de la muestra de sangre | 65 |
| 5.2.2.3.3 | Detección del daño al ADN y daño oxidativo al ADN a través del ensayo cometa estándar y modificado con endonucleasas..... | 66 |
| 5.2.2.3.4 | Determinación de los niveles de expresión génica..... | 68 |
| 5.2.2.3.5 | Determinación del daño oxidativo a lípidos..... | 69 |
| 5.2.2.3.6 | Actividad de Catalasa (CAT)..... | 69 |
| 5.2.2.3.7 | Actividad de Superóxido dismutasa (SOD) | 69 |
| 5.2.2.3.8 | Determinación de proteínas..... | 69 |
| 5.2.2.3.9 | Parámetros de crecimiento | 70 |
| 5.2.2.4 | Análisis estadístico..... | 71 |
| 5.2.2.4.1 | Ensayo de exposición embrionaria por pulverización sobre el material del nido..... | 71 |
| 5.2.2.4.2 | Ensayos de exposición <i>in vivo</i> de neonatos y juveniles en condiciones semi-naturales..... | 72 |
| 6. | Resultados | 73 |
| 6.1 | Identificación de genes de interés por PCR convencional..... | 73 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 6.1.1 | Gen de referencia (β -actina) y genes relacionados con vías de defensa antioxidante (<i>cat</i> y <i>sod</i>)..... | 73 |
| 6.1.2 | Genes relacionados con sistemas de reparación del daño (<i>p53</i>), biotransformación (<i>p450</i> y <i>gst</i>) y reguladores del ciclo celular (<i>bcl2</i> y <i>bax</i>) | 75 |
| 6.2 | Ensayo de exposición embrionaria por pulverización sobre el material del nido. | 76 |
| 6.2.1 | Análisis de los plaguicidas | 76 |
| 6.2.2 | Detección del daño al ADN y daño oxidativo al ADN a través del ensayo cometa estándar y modificado con endonucleasas..... | 77 |
| 6.2.2.1 | Determinación de los niveles de expresión de los genes β -actina, <i>sod</i> y <i>cat</i> mediante la técnica de qPCR..... | 81 |
| 6.2.3 | Determinación del daño oxidativo a lípidos y actividad enzimática de SOD y CAT | 83 |
| 6.2.4 | Parámetros de crecimiento | 84 |
| 6.4 | Ensayos de exposición <i>in vivo</i> de neonatos y juveniles en condiciones semi-naturales..... | 85 |
| 6.4.1 | Análisis de los plaguicidas | 85 |
| 6.4.2 | Detección del daño al ADN y daño oxidativo al ADN a través del ensayo cometa estándar y modificado con endonucleasas..... | 86 |
| 6.4.3 | Determinación de los niveles de expresión génica de los genes β -actina, <i>sod</i> y <i>cat</i> mediante qPCR | 88 |
| 6.4.4 | Determinación del daño oxidativo a lípidos, actividad enzimática de SOD y CAT | 90 |
| 6.4.5 | Parámetros de crecimiento | 91 |
| 7. | Discusión | 92 |
| 7.1 | Identificación de genes de interés por PCR convencional..... | 92 |
| 7.2 | Ensayo de exposición embrionaria por pulverización sobre el material del nido. | 95 |
| 7.3 | Ensayos de exposición <i>in vivo</i> de neonatos y juveniles en condiciones semi-naturales..... | 101 |
| 8. | Conclusiones | 106 |
| 9. | Bibliografía..... | 108 |

1. Abreviaturas y símbolos

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPA: Ácido aminometilfosfónico

ANOVA: Análisis de la Varianza

AOX: Sistema antioxidante

ARN: Ácido ribonucleico

CAT: Catalasa

cat: Gen que codifica para catalasa

CIP: Cipermetrina

CIP1: Cipermetrina concentración al 0.12%

CIP2: Cipermetrina al 0.06%

cm: Centímetros

CN: Control negativo

CPF: Clorpirifós

CPF1: Clorpirifós concentración al 0.8%

CPF2: Clorpirifós al 0.4%

CV: Control de vehículo

DL50: Dosis letal 50

E1: Experimento 1

E2: Experimento 2

E3: Experimento 3

E4: Experimento 4

EC: Ensayo cometa

EE: Error estándar

ENDO III: Endonucleasa III

EO: Estrés oxidativo

EPSPS: Enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa:

EROs: Especies reactivas de oxígeno

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente

FPG: Formamido pirimidina ADN glicosilasa

g: Gramos

°C: Grados centígrados

GLI: Glifosato

GLI1: Glifosato concentración al 2%

GLI2: Glifosato al 1%

gst: gen que codifica para GST

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

Ha: Hectárea

LPO: Lipoperoxidación

LT: Longitud total

LHC: Longitud hocico-cloaca

Mx3: Mezcla de las tres formulaciones (GLI + CIP + CPF)

m: Metro

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

qPCR: PCR en tiempo real

R²: Coeficiente de correlación lineal

SOD: Superóxido dismutasa

sod: Gen que codifica para superóxido dismutasa

TAE: Tris-acetato-EDTA

T_m: Temperatura de melting

TBARS: Sustancias Reactivas al el Ácido Tiobarbitúrico

tn: Toneladas

2. Resumen

El yacaré overo (*Caiman latirostris*; Crocodylia, Alligatoridae) es una de las dos especies de cocodrilianos que habitan en la República Argentina, distribuyéndose en un área considerablemente amplia del centro-norte del país. Es considerada una especie de vital importancia ecológica y económica en gran parte de América del Sur. Desde hace varios años, muchas de las poblaciones naturales de caimanes se ven afectadas por la pérdida de hábitat como consecuencia de la expansión agrícola y la constante exposición a plaguicidas. El objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral fue identificar respuestas de daño oxidativo, genotóxico y moleculares de expresión génica específicas como biomarcadores sensibles de exposición a plaguicidas en *C. latirostris*. En una primera instancia, se estandarizó la técnica de extracción de ARN en sangre para determinar la presencia de los siguientes genes mediante PCR convencional: catalasa (*cat*), superóxido dismutasa (*sod*), glutatión-S-transferasa (*gst*), citocromo p450 (*p450*), y la familia de genes implicados en la vía intrínseca de la apoptosis celular (*bcl2*, *bax* y *p53*). Luego, se validó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real para genes *cat* y *sod*, con el fin de proponer el análisis de su expresión génica como biomarcadores del estrés oxidativo inducido por estresores ambientales.

Posteriormente, se evaluaron los efectos de las formulaciones de glifosato (GLI), cipermetrina (CIP) y clorpirifos (CPF) por separado y en forma de mezclas durante el período embrionario (experimento 1 y 2) al igual que en juveniles y neonatos en condiciones semi-naturales (experimento 3 y 4). Se realizaron cuatro ensayos de exposición a concentraciones recomendadas para su aplicación en cultivos de soja con los siguientes grupos experimentales: **experimento 1 y 2**): GLI (Roundup® Full II): 2% y 1%; CIP (Atanor®): 0.12% y 0.06%; CPF (Lorsban®): 0.8% y 0.4%; 3 grupos expuestos a mezclas binarias, un grupo expuesto a la mezcla de las tres formulaciones (mezcla ternaria), un control negativo y un control de vehículo; **experimento 3 y 4**): GLI (Roundup® Full II): 2%; CIP (Atanor®): 0.12%; CPF (Lorsban®): 0.8%, mezcla ternaria y un control negativo.

Para las aplicaciones se tuvieron en cuenta como área a fumigar la superficie de la batea de incubación (0.034 m²) en el ensayo de exposición embrionaria, y la superficie del recinto de experimentación (4.5 m²) en el ensayo de exposición semi-natural de *C. latirostris*.

Se tomaron muestras de sangre y se determinó el daño al ADN mediante la metodología del ensayo del cometa alcalino (EC), en su variante alcalina, el daño oxidativo al ADN a través del ensayo cometa modificado con enzimas de reparación Endonucleasa III

(ENDO III) y Formamido pirimidina ADN glicosilasa (fpg), al igual que la estimación de procesos de lipoperoxidación (LPO) y la actividad de enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) y la expresión de sus genes correspondientes (*cat* y *sod*). Además, se analizó el posible efecto sobre el desarrollo de los individuos.

Los resultados indicaron daño en el ADN, con una fuerte incidencia en la oxidación de purinas y pirimidinas en el caso de exposición a formulaciones de GLI, CIP y CPF, así como en todas las mezclas ensayadas. No se observó efecto sobre la LPO ni modificación de las enzimas antioxidantes en ninguno de los ensayos.

Sin embargo, encontramos variaciones significativas en los patrones de expresión de los genes *cat* y *sod*. Este es el primer análisis de expresión de genes asociados al estrés oxidativo y a defensas antioxidantes en *C. latirostris* y el primer reporte de su utilización como biomarcadores en respuesta a condiciones de estrés en este caso, ejercida por la exposición a plaguicidas.

Con respecto a las diferentes mezclas testadas, se observaron distintos tipos de interacciones entre los plaguicidas constituyentes, dependiendo el marcador analizado. Los ensayos realizados a lo largo de este trabajo de Tesis Doctoral representaron un modelo de exposición que intenta simular la situación ambiental que atraviesan durante el desarrollo embrionario y su primer año de vida las poblaciones naturales de caimanes que habitan en ambientes fragmentados. Se demostró que el uso de las formulaciones de plaguicidas a bajas concentraciones produce alteraciones del balance oxidativo y genéticas tanto a nivel celular como molecular en esta especie, que pueden amenazar, a largo plazo, el estado de salud y supervivencia de las poblaciones silvestres. El uso de biomarcadores sensibles es esencial para evaluar en profundidad el daño genético y el estrés oxidativo, que podrían tener consecuencias significativas a corto y largo plazo para las especies silvestres.

ABSTRACT

The broad snouted caiman (*Caiman latirostris*; Crocodylia, Alligatoridae) is one of the two species of crocodylians that inhabit in Argentina, distributed in a considerably wide area of the north-central part of the country. It is considered a species of vital ecological and economic importance for many countries in South America. For several years, many of the natural populations of the broad snouted caiman have been affected by habitat loss as a result of agricultural expansion and constant exposure to pesticides. The general aim of this thesis was to identify molecular responses of gene expression and specific genotoxic damage as sensitive biomarkers of exposure to pesticides in *C. latirostris*.

In the first instance, the RNA extraction technique from blood was standardized to determine the presence of the following genes by conventional PCR: catalase (*cat*), superoxide dismutase (*sod*), glutati3n-S-transferase (*gst*), cytochrome p450 (*p450*), B-cell lymphoma 2 (*bcl2*), *bax* and *p53*. Then, the quantitative real-time PCR technique was validating for *cat* and *sod* genes, in order to propose its expression level as biomarkers of oxidative stress induced by environmental stressors.

Subsequently, the effects of Glyphosate (GLY), Cypermethrin (CYP) and Chlorpyrifos (CPF) formulations were evaluated separately and in mixtures during the embryonic period (experiments 1 and 2) and in juveniles and neonates under semi-natural conditions experiments 3 and 4). For this, four experiments were carried out at concentrations of pesticides recommended for their application in soybean crops, including the following experimental groups: **experiments 1 and 2**): GLY (Roundup® Full II): 2% and 1%; CYP (Atanor®): 0.12% and 0.06%; CPF (Lorsban®): 0.8% and 0.4%; 3 groups exposed to binary mixtures, one group exposed to the mixture of the three formulations (ternary mixture), a negative control and a vehicle control; **experiments 3 and 4**): GLY (Roundup® Full II): 2%; CYP (Atanor®): 0.12%; CPF (Lorsban®*): 0.8%, ternary mixture and a negative control

For the applications, the area taken into account to be fumigated was the surface of the incubation tray (0.034 m²) in the embryonic exposure assay, and the surface of the experimentation area (4.5 m²) in the semi-natural exposure assay.

Blood samples were taken, and DNA damage was determined by the alkaline comet assay (CA), oxidative DNA damage by the modified comet assay with Endonuclease III (ENDO III) and Formamidopyrimidine DNA glycosylase (fpg), lipoperoxidation (LPO), the activity of antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) and the

expression of their corresponding genes (*cat* and *sod*). In addition, the possible effect on growth of individuals was analyzed.

The results indicated DNA damage, with a strong incidence in the oxidation of purines and pyrimidines in the groups exposed to GLY, CYP and CPF formulations, as well as in all the mixtures tested. No effect on LPO or modification of antioxidant enzymes was observed in any of the tests.

However, we found significant variations in the expression level of *cat* and *sod* genes. This is the first analysis of the expression of genes associated with oxidative stress and antioxidant defenses in *C. latirostris* and the first report of their use as biomarkers of exposure to a stressful situation, in this case pesticide exposure, for all crocodylians.

With respect to the different mixtures tested, different types of interaction were observed between the constituent pesticides, depending on the marker analyzed.

The experiments carried out tried to simulate the environmental situation that natural populations of caiman that inhabit in fragmented environments suffer during embryonic development and their first year of life.

The use of pesticide formulations at low concentrations has shown to produce genetic alterations at cellular and molecular level in this species, and can threaten, in the long term, the health status of wild populations. The use of sensitive biomarkers is essential to assess deeply genetic damage and oxidative stress, which could have significant short- and long-term consequences for wild species.

3. Introducción

3.1 Expansión de la frontera agrícola en la Argentina

A fines del siglo XIX la Argentina inició su etapa agroexportadora, convirtiéndose en uno de los principales países en exportar alimentos y materias primas [1]. En el siguiente siglo, la actividad agrícola incorporó grandes cambios tecnológicos con el objetivo de mejorar la calidad y la cantidad de los alimentos [2]. En este sentido, se introduce en la Argentina la primera variedad de semillas genéticamente modificadas (soja resistente al glifosato o soja RR) y la introducción masiva de insumos como herbicidas (principalmente glifosato) y fertilizantes [3].

Específicamente, la utilización inicial de estas variedades de soja ocurrió en 1996, y luego en 1999, representaba el 90% de las variedades sembradas con este cultivo [4],[5]. Durante la década del 90 se observó un aumento en la superficie sembrada con soja del 160%, ocupándose aproximadamente 5 a 8 millones de hectáreas (Ha). En la década siguiente, este número aumentó de 8.8 a 20 millones para la campaña 2015/2016 (55% aproximadamente de la superficie total sembrada) estabilizándose actualmente en aproximadamente 17 millones (45% aproximadamente de la superficie total sembrada [6]. En la última campaña se registró un descenso en la superficie debido a los problemas climáticos que afectaron a toda la región agrícola.

La tendencia al monocultivo de soja producto de la mecanización, el mejoramiento de las variedades de cultivos, y la disponibilidad y desarrollo de plaguicidas que simplifican la siembra directa trajo como consecuencias un efecto concentrador [1]. Un menor número de actores intervinientes en la cadena de valor, un aumento en la escala de producción, especialización (servicios profesionales y empresas privadas, como las compañías de semillas y productos químicos) y homogenización productiva permitieron el avance de la soja, su producción y comercialización a lo largo de todos estos años [1,7]. De esta manera, la soja llega a ocupar cerca de la mitad del total del área sembrada del país [6]. A su vez, la especialización en el monocultivo trajo consecuencias ecológicas tales como la disminución de la materia orgánica y diversas formas de deterioro estructural que favorecen el desarrollo de procesos erosivos en suelos descubiertos [7].

Este gran aumento refleja no solo la transición desde cultivos menos lucrativos como el trigo o el maíz que son reemplazados por soja, sino también un aumento en la producción general de tierra cultivable mediante la conversión de pastizales, la deforestación intensa y el consecuente aumento en el uso de agroquímicos [7], [8]. En toda la Argentina, se redujo en gran medida la diversidad de los sistemas de cultivo, especialmente en la zona núcleo, donde la soja RR representa ahora más de la mitad de la tierra cultivable [5], [9], [10]. Se conoce como zona núcleo a la región donde la productividad es mayor para el cultivo extensivo. La misma comprende al noroeste de la Provincia de Buenos Aires, sur de la Provincia de Santa Fe y sureste de la Provincia de Córdoba. Puntualmente esta zona presenta calidad de suelo, abundantes lluvias y proximidad a los puertos y cursos navegables permitiendo que la producción sea destacablemente rentable. Al mismo tiempo está incorporada social y políticamente como un recurso central en el desarrollo económico de la Argentina [6].

Favorecida por un conjunto de regulaciones legales e institucionales, la introducción de la soja RR desarrollada por la compañía Monsanto fue el punto de partida de una nueva era tecnológica [11]. La incorporación rápida y generalizada de semillas híbridas, insumos químicos sintéticos y maquinaria permitieron mejorar exponencialmente el rendimiento y la producción de soja en la Argentina a lo largo de los años [12], [10], (Figura 1).

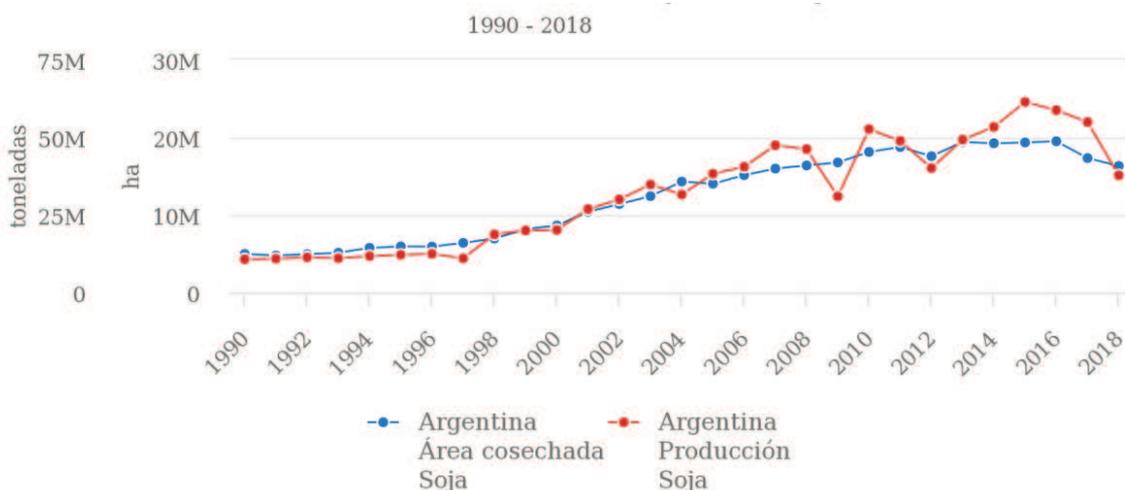


Figura 1. —●— Rendimiento/Área cosechada en la Argentina desde 1990 hasta 2018. Expresado en tn. —●— Producción de soja en Argentina desde 1990 hasta 2018. Expresado en Ha. Fuente: FAO, [10].

Esta nueva tecnología de semillas permite acortar los ciclos de siembra a cosecha, y que la producción se amplíe más allá del histórico cinturón de granos [13], [14], [15]. En la Figura 2 se muestra geográficamente cómo fue el avance de la superficie de

sembrada de soja en el territorio argentino, así como las mejoras en la producción y el rendimiento desde el año 1976 al 2010 [16]:

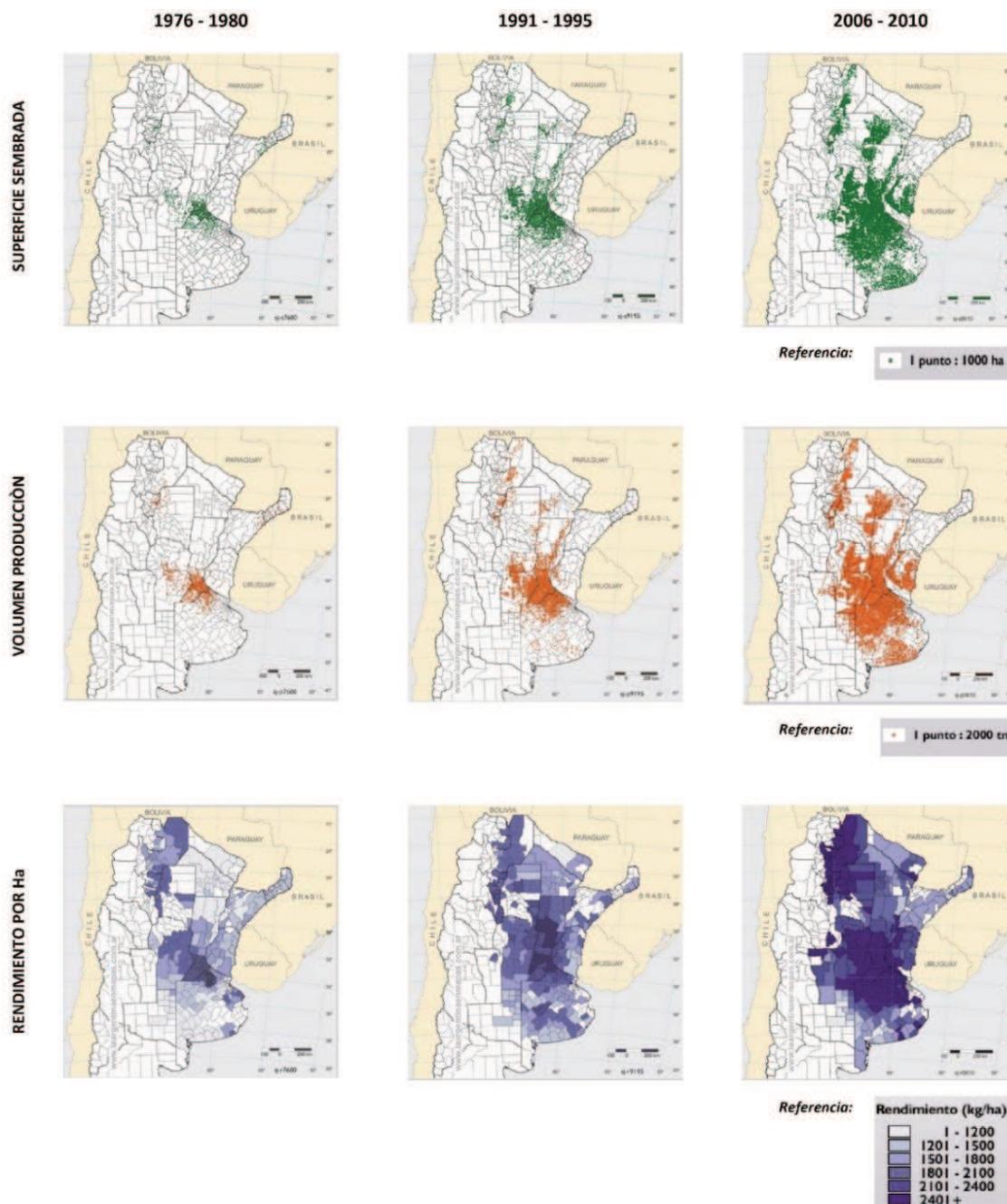


Figura 2. Mapa de la evolución histórica del cultivo de soja en Argentina 1976-2010 (Figura modificada del Instituto Multidisciplinario de Historia y Ciencias Humanas [16]). **A)** Evolución de la superficie sembrada. **B)** Evolución de la producción. **C)** Evolución del rendimiento.

La incorporación de semillas de soja RR, condujo a cambios en el uso de la tierra, la intensificación de la producción y la expansión de las fronteras agrícolas [17], [18], [19], [20]. Asociado al cultivo de soja RR, el uso de plaguicidas tuvo su consecuente aumento, entre los cuales se encuentran los herbicidas GLI y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,2 D) y los insecticidas CPF y CIP, clorantraniliprol e imidacloprid [21], [22], [23].

Como hemos visto hasta ahora, la incorporación de variedades de soja RR, ha sido extremadamente rápida en Argentina, convirtiéndola en el tercer país productor de soja en el mundo, después de Estados Unidos y Brasil [10]. En 2019, a nivel mundial, la producción de soja superó los 362 millones de tn y el aceite de soja alcanzó los 56.5 millones de tn. Tanto los aceites como las harinas muestran una producción creciente a nivel mundial, con una tasa de crecimiento acumulada anual del 3.8% y 3.7%, respectivamente [10]. Hoy en día, las diversas formas comerciales de soja (granos, harina, pasteles, aceite, etc) representan aproximadamente el 60% de las exportaciones de Argentina [24].

La soja se siembra en dos regiones diferentes del país que tienen potenciales productivos distintos [25]. La Región Pampeana, con suelos muy fértiles y un clima favorable, tiene una alta aptitud agrícola. Por otro lado, la región del Chaco es menos productiva, y los suelos y clima son menos óptimos para el cultivo de soja [26]. Generalmente, la campaña de soja se inicia en el mes de septiembre con la siembra de los suelos y finaliza en mayo con la cosecha (soja de 1ra). Algunos establecimientos productores de trigo incluyen la producción de soja en su sistema de rotación de cultivos conocido como soja de 2da. La época de siembra se inicia durante los meses de 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 más óptima (Figura 3) [27].

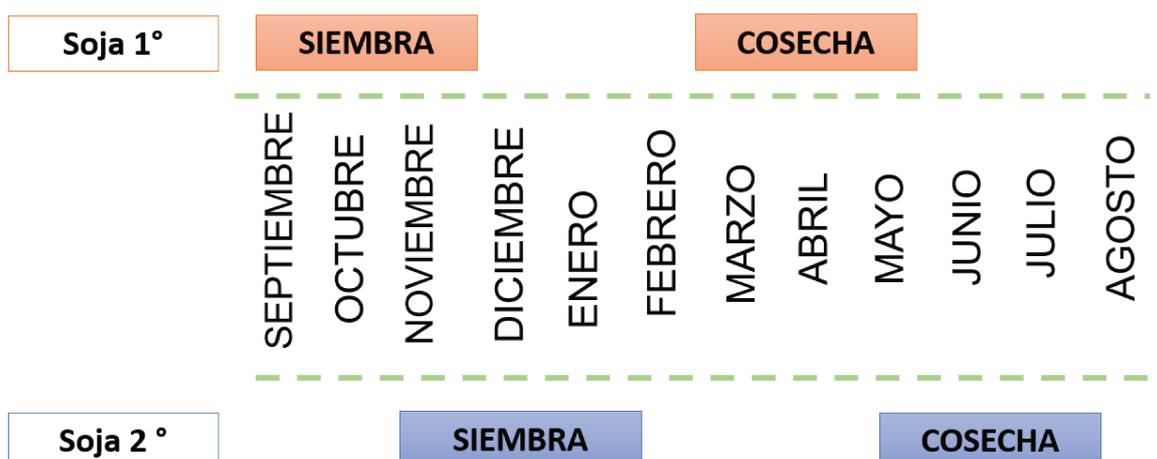


Figura 3. Fechas de siembra y cosecha de la soja de 1ra, y soja de 2da, en Argentina (Figura modificada de Zeolla, [27]).

3.2 Plaguicidas

3.2.1 Características generales

La FAO [28] define a los plaguicidas como *“cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte”*.

El uso de estas sustancias para la mitigación de plagas se ha convertido en una práctica común, aumentando sustancialmente en las últimas décadas a nivel mundial [29], [30]. Según una estimación de la FAO [10], se usan alrededor de 4 millones de tn de plaguicidas en todo el mundo por año. A partir de 1990, el uso de plaguicidas comenzó a expandirse en la Argentina. En ese año, se registró una aplicación de 26156 tn llegando en 2017 a una aplicación de 196008 tn anuales [10]. Esto representa un aumento aproximado del 800% de plaguicidas aplicados en los últimos 27 años.

Los plaguicidas suelen ser sustancias químicas y pueden categorizarse como herbicidas, insecticidas, fungicidas, acaricidas, raticidas, etc según el tipo de plaga que buscan controlar, prevenir, repeler o mitigar [31], [32], [33], [34]. Los mismos se comercializan en el mercado como formulaciones constituídas por el principio activo, y una combinación de varios ingredientes, denominados excipientes que deberían ser inertes o inactivos, teóricamente por su falta de acción biocida [35]. Sin embargo, diversos trabajos han demostrado un efecto geno y/o citotóxico aditivo mayor por parte de los componentes de los excipientes que el principio activo [36],[37], [38]. En general, los excipientes actúan como solventes, coadyuvantes, emulsionantes, tensoactivos y/o conservantes del principio activo, mejorando su penetración en la planta, extendiendo su vida útil o minimizando su degradación en la planta [39]. El principio o ingrediente activo es la parte biológicamente activa del plaguicida presente en la formulación, es

decir, es el químico responsable de controlar la plaga [40]. También forma parte de la formulación el vehículo o diluyente que en la mayoría de las formulaciones es agua. No obstante, existen algunas formulaciones cuyos diluyentes son solventes orgánicos (por ejemplo, xileno) en un solvente polar (Ej.: acetona, metanol, isopropanol, etc.) o no polar (hexano, tolueno, xileno, clorobenceno, etc.) [35].

3.2.2 Clasificación y consideraciones toxicológicas

La toxicidad se define como una “*propiedad fisiológica o biológica que determina la capacidad de una sustancia química para causar perjuicio o producir daños a un organismo vivo por medios no mecánicos*” [41]. Por su naturaleza, los plaguicidas son potencialmente tóxicos para los organismos, incluidos los seres humanos, y deben usarse de manera segura y eliminarse adecuadamente. En 2009 la OMS [42] recomendó la clasificación de plaguicidas según su peligrosidad (Tabla 1). Esta clasificación se basa en la toxicidad aguda (DL50) oral y dérmica para rata, ya que estas determinaciones son procedimientos estándar en toxicología. El valor DL50 es una estimación estadística del número de mg de tóxico por kg de peso corporal requerido para matar al 50% de una población de animales de prueba [43].

Tabla 1. Clasificación toxicológica general de los plaguicidas según la Organización Mundial de la Salud.

| Clase toxicológica | | DL50 para rata [mg/kg de peso corporal] | |
|--------------------|--|---|--------------------|
| | | Oral | Dérmica |
| Ia | Extremadamente peligroso | < 5 | < 50 |
| Ib | Muy peligroso | 5–50 | 50–200 |
| II | Moderadamente peligroso | 50–2000 | 200–2000 |
| III | Poco peligroso | por arriba de 2000 | por arriba de 2000 |
| IV | Poco probable de presentar peligro agudo | 5000 o superior | |

Fuente: The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, 2009.

Actualmente, el Sistema Globalmente Armonizado (SGA) de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos de las Naciones Unidas proporciona los criterios para abordar la clasificación de productos químicos, etiquetas y hojas de datos de seguridad en todo el mundo [44] (Tabla 2). El SGA tiene como objetivo proporcionar una aproximación común para definir y clasificar los peligros y comunicar la información sobre éstos en

etiquetas y hojas de seguridad. Los criterios se basan en el peligro intrínseco, y no en el riesgo [31].

Tabla 2. Clasificación toxicológica general de productos químicos según el SGA

| Categoría SGA | Criterio de clasificación | | | |
|---------------|---------------------------|--------------------------------|------------------------|--|
| | Oral | | Dérmica | |
| | DL50 [mg/kg peso vivo] | Indicación de riesgo | DL50 [mg/kg peso vivo] | Indicación de riesgo |
| Categoría 1 | < 5 | Letal por ingestión | < 50 | Letal por contacto con piel |
| Categoría 2 | 5 – 50 | Letal por ingestión | 50 – 200 | Letal por contacto con piel |
| Categoría 3 | 50 – 300 | Tóxico por ingestión | 200 – 1000 | Tóxico por contacto con piel |
| Categoría 4 | 300 - 2000 | Nocivo por ingestión | 1000 – 2000 | Nocivo por contacto con piel |
| Categoría 5 | 2000 - 5000 | Puede ser nocivo por ingestión | 2000 - 5000 | Puede ser nocivo por contacto con piel |

Fuente: *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*, 2011.

En Argentina, el servicio Nacional de Sanidad y calidad agroalimentaria (SENASA) clasifica los productos formulados y principios activos teniendo en cuenta los estudios toxicológicos presentados por los registrantes. Los estudios toxicológicos considerados son de toxicología oral aguda (DL50), de toxicología dermal aguda (DL50), de toxicología inhalatoria aguda (CL50), estudio de irritación ocular; de irritación dermal y de sensibilización [31].

Específicamente en este trabajo de tesis se utilizarán las formulaciones en base a GLI, CPF y CIP para llevar a cabo los ensayos. A continuación, se muestra la clasificación toxicológica según la OMS, de acuerdo con las categorías de peligro de toxicidad aguda del SGA de estas tres formulaciones y de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (USEPA) (tabla 3):

Tabla 3. Clasificación toxicológica de algunos de los plaguicidas más utilizados en cultivos extensivos de Argentina, según la OMS, SGA y USEPA evaluados en este trabajo de Tesis Doctoral.

| Compuesto | N°. CAS | Clase química | Estado físico ¹ | Uso principal | Principales formulaciones de Argentina | SGA ³ | USEPA ⁴ | DL50 |
|---|------------|------------------|----------------------------|---------------|--|------------------|--------------------|------|
| <i>Ingredientes activos de grado técnico moderadamente peligrosos (Clase II) ²</i> | | | | | | | | |
| CPF | 2921-88-2 | Organofosforado | Sólido | Insecticida | Lorsban®, Huagro®, Sinplag®, InsuAgro® | 3 | Grupo C | 135 |
| CIP | 52315-07-8 | Piretroide | Líquido | Insecticida | Atanor®, Glextrin®, Huagro®, Aranami® (AraCiper) | 3 | Grupo E | c250 |
| <i>Ingredientes activos de grado técnico ligeramente peligroso (Clase III) ²</i> | | | | | | | | |
| GLI | 1071-83-6 | Fosfoglifosinato | Sólido | Herbicida | Roundup®, Power plus II®, Panzer® Gold, Glifoglex® | 5 | P | 4230 |

¹Estado físico se refiere solo al ingrediente activo. ²Clasificación de la OMS. **c** indica que es un valor dentro de un rango más amplio que el habitual, adoptado con fines de clasificación. ³ Clasificación del SGA. ⁴ Clasificación de USEPA: Grupo C: Posible carcinógeno humano, Grupo E: Evidencia de no carcinogenicidad para humanos, P: Probable carcinógeno. Fuente: The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, 2009.

Como hemos visto en la sección 3.1, las formulaciones en base a GLI, CIP y CPF se encuentran entre los plaguicidas más utilizados en el sistema de siembra directa de cultivos genéticamente modificados en Argentina. En el año 2017 se aplicaron 183685 tn de GLI, 2211 tn de CPF y 591 tn de CIP [10].

3.2.2.1 Herbicidas

Los herbicidas pertenecen a una clase de plaguicidas que se utilizan en el manejo de plantas no deseadas en las áreas de agricultura, paisajismo, silvicultura, jardinería e industria [45]. Se clasifican en función de diferentes aspectos, como el modo de acción, el sitio de acción, las familias químicas, el tiempo de aplicación, la selectividad, etc. [46], [47]. Según el momento de la aplicación, los herbicidas se clasifican como pre-emergentes o post-emergentes [48]. Los denominados pre-emergentes, se aplican antes de la nacencia del cultivo y pueden ser efectivos contra malezas de hoja ancha [49], [50]. Por otro lado, cuando se aplican después de la nacencia (post-emergentes), pueden ser selectivos (objetivo específico) o no selectivos (objetivo amplio) [50]. Los herbicidas selectivos son altamente específicos y son los más adecuados para el control

de una maleza asociada con un cultivo específico [51]. Los herbicidas no selectivos, por otro lado, se aplican al suelo cuando debe ser eliminada toda la vegetación, o donde las malezas están localizadas, lejos de las plantas de interés [51].

3.2.2.1.1 Glifosato

El GLI [$C_3H_8NO_5P$; N-(fosfonometil) glicina; Figura 4] es un herbicida de amplio espectro y post-emergente que se utiliza en todo el mundo para el control de malezas anuales y perennes y es el ingrediente activo de más de 750 formulaciones herbicidas a nivel mundial [52], [53]. El GLI es soluble en agua (12 g/L a 25 °C y 60 g/L a 100 °C), e insoluble en otros solventes [43]. Las formulaciones comerciales generalmente están en forma de sal para garantizar una mayor solubilidad y al mismo tiempo mantener las propiedades herbicidas del compuesto parental [54]. Las formulaciones de GLI en forma de sal incluyen: sal de monoamonio, sal de diamonio, sal de isopropilamina, sal de potasio, sal de sodio y sal de trimetilsulfonio o trimesio. De estos, las formas de sal de isopropilamina, sodio y monoamonio se usan comúnmente en productos herbicidas formulados [55]. Los herbicidas a base de GLI, representados principalmente por la marca comercial Roundup®, tanto en Argentina como a nivel mundial, son las formulaciones comerciales de plaguicidas más utilizadas, cuyo principal ingrediente activo es la sal de isopropilamina. Su control de maleza perenne de amplio espectro lo convierte en un producto muy efectivo [52]. Las formulaciones a base de GLI, se aplican principalmente en los cultivos de soja, maíz, trigo, girasol, algodón, arroz, trigo, frutales y su uso ha ido aumentando enormemente en los últimos años, en particular en los países donde se utilizan cultivos genéticamente modificados, resistentes al glifosato [56], [57], [58].

Las plantas sintetizan los aminoácidos de anillo aromático triptófano, fenilalanina y tirosina, a través de la vía del ácido shikímico [59]. Particularmente el GLI actúa sobre la vía shikimato mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa (*EPSPS*) [60]. La inhibición de *EPSPS* por parte del GLI causa la disminución de la síntesis de proteínas que son esenciales para la supervivencia y crecimiento de la planta. Dado que esta vía no existe en los vertebrados, se supone que el GLI es seguro para los mamíferos, incluidos los humanos [61].

Las distintas formulaciones en base a GLI pueden contener muchas impurezas, donde la cantidad y el tipo dependen de la tecnología de producción del plaguicida [62]. El ácido aminometilfosfónico (*AMPA*) es el principal producto de degradación de los formulados de GLI [63], [64]. Este metabolito se ha observado en cantidades significativas durante la degradación del herbicida GLI en el suelo. En consecuencia, el

AMPA se ha incluido en los programas de monitoreo de aguas superficiales y se detecta con el mismo método analítico que el GLI [65]. El AMPA tiene una mayor persistencia ambiental que el GLI, 76–240 y 2–197 días de vida media del suelo para ambos, respectivamente [66]. A su vez hay evidencia que indica que el AMPA también puede representar un riesgo de contaminación de las aguas subterráneas [67].

Las formulaciones de los herbicidas contienen sustancias llamadas adyuvantes y tensioactivos que aumentan el efecto de la actividad de un herbicida. Un excelente tensioactivo es la polioxietileno amina (*POEA*), que facilita la adsorción y aumenta la eficiencia de penetración de la formulación en el tejido vegetal [62]. En diversos trabajos se ha observado que las formulaciones comerciales de GLI revelan una toxicidad más alta que la sustancia activa en sí debido a la presencia del *POEA* [68], [69], [70].

En 2015, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó al GLI como un compuesto probablemente carcinógeno para humanos (Clase 2 A) basándose en evidencia limitada en humanos y evidencia suficiente en animales de experimentación. También se concluyó que había una fuerte evidencia de genotoxicidad y estrés oxidativo. Esto a su vez generó preocupación pública sobre su presencia en el medio ambiente [53].

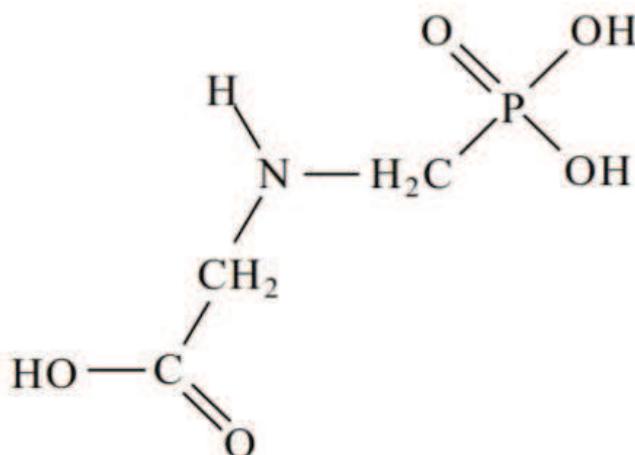


Figura 4. Estructura química de Glifosato: N- (fosfometil) glicina.

3.2.2.2 Insecticidas

Los cultivos pueden verse afectados por diversos insectos, causando daños graves a las plantas y, en consecuencia, importantes disminuciones de los rendimientos [71]. Por lo tanto, los insecticidas se usan ampliamente para controlar estas plagas, ejerciendo su acción en uno o en diferentes estados del desarrollo del insecto [72].

3.2.2.2.1 Piretroides

Los piretroides son un grupo de insecticidas sintéticos derivados de las piretrinas, que son las sustancias insecticidas activas en las flores de crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Se utilizan ampliamente en todo el mundo y representan el 25% del mercado mundial de insecticidas [73]. Se pueden clasificar en dos grandes grupos. Los piretroides tipo I no contienen un grupo ciano en sus moléculas, actúan causando hiperactividad e incoordinación e incluyen aletrina, tetrametrina, permetrina y fenotrina. [74]. Los piretroides tipo II contienen un grupo ciano en la posición de carbono α , inducen la despolarización de la neurona y, posteriormente, la parálisis del insecto e incluyen compuestos como deltametrina, cifenotrina, cipermetrina y fenvalerato [75]. Los piretroides son neurotóxicos, actúan sobre los canales de sodio dependientes de voltaje en los nervios y prolongan el tiempo de apertura de los mismos [76],[77]. Particularmente, interfieren en las señales del sistema nervioso, modificando la conducción axonal dentro del sistema nervioso central de los insectos al alterar la permeabilidad de la membrana nerviosa a los iones de sodio y potasio [59].

3.2.2.2.1.1 Cipermetrina

La CIP [$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$; (RS)- α -ciano-3-fenoxibencil (1RS)-cis-trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato; Figura 5] es un insecticida piretroide sintético tipo II, utilizado para controlar una amplia gama de insectos [78], [79]. Se ha convertido en uno de los insecticidas más importantes en el uso a gran escala y es ampliamente utilizada en la agricultura, hogares y programas de salud pública. En la agricultura se utiliza principalmente en los cultivos de soja, maíz, trigo, girasol, algodón, cereales, cebada, alfalfa y frutales [80].

Las formulaciones de CIP se caracterizan por interactuar con los canales de sodio en las células nerviosas a través de las cuales el sodio ingresa a la célula para transmitir una señal nerviosa. Bajo sus efectos estos canales pueden permanecer abiertos hasta segundos en comparación con el período normal de unos pocos milisegundos, después de que se haya transmitido una señal. La CIP también interfiere con otros receptores en

el sistema nervioso [77]. Desafortunadamente, el uso repetitivo e indiscriminado de la CIP da como resultado una exposición involuntaria a animales y humanos, lo que aumenta el riesgo de intoxicación en organismos no blanco [81].

La CIP esta considerada por su toxicidad aguada oral y dermica moderadamente toxica en los mamimeros y altamente toxica en los invertabrados acuáticos y peces. Los peces metabolizan y eliminan lentamente la CIP a diferencia de los mamíferos o aves [82], [43]. La IARC no registra a la CIP como un pagluicida potencialmente carcinogeno en humanos [53].

Históricamente, ha habido preocupaciones con respecto a la toxicidad de la CIP para los organismos acuáticos y cómo afecta a la cadena alimentaria [83]. La CIP tiende a unirse rápida y extensamente a partículas en suspensión, sedimentos y plantas acuáticas. Afecta a los organismos bentónicos y la infauna. Los piretroides se adsorben fácilmente en los sedimentos, lo que reduce gravemente la biodisponibilidad de los organismos en la columna de agua [83], [84]. A su vez, una vez asociados con sedimentos, existe la posibilidad de exposición de organismos bentónicos a través de partículas de sedimentos (por ingestión o contacto) o agua intersticial [84].

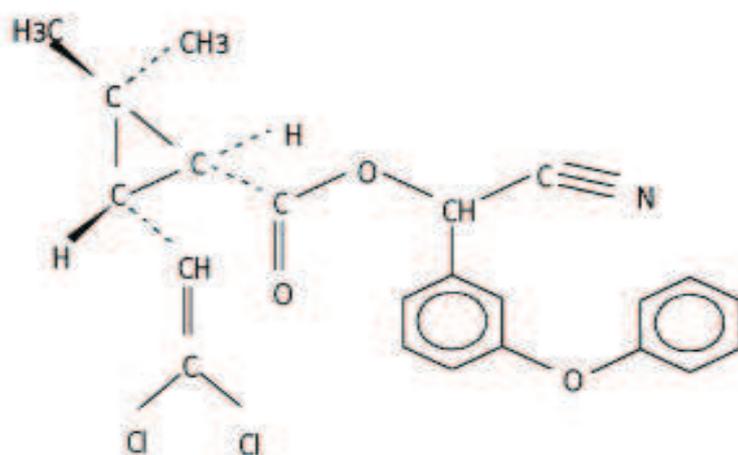


Figura 5. Estructura química de Cipermetrina: (R, S) -ciano-3-fenoxibencilo (1R, S) -cis-trans-3-(2,2-diclorovinil) -2,2-dimetilciclopropano carboxilato.

3.2.2.2.2 Organofosforados

Los organofosforados (OFs) son de gran interés comercial debido a que presentan efectividad, facilidad de aplicación y bajo costo [85]. Los insecticidas OFs son compuestos de hidrocarburos que contienen uno o más átomos de fósforo en su molécula [86]. Se utilizan para controlar a casi todas las especies de plagas de una amplia variedad de órdenes de insectos, incluidos los lepidópteros, coleópteros,

dípteros, hemípteros (incluidos los pulgones) y muchos más [87]. Esta ventaja de acción rápida y de amplio espectro convirtió a los OFs en un insecticida adecuado para el control de insectos [71]. En contraste, estas propiedades conducen a las dos desventajas principales en la mayoría de los OFs: su actividad contra los insectos beneficiosos y su elevada toxicidad aguda para los vertebrados, incluidos los humanos [88], [89], [90].

Los OFs tienen como objetivo inhibir una enzima llamada acetilcolinesterasa (*AChE*). Esta enzima es un componente esencial del sistema nervioso y juega un papel importante en los animales. La *AChE* hidroliza la acetilcolina (*ACh*), un éster liberado cuando se transmiten los impulsos nerviosos. Las sinapsis, las funciones mioneurales y los ganglios del sistema nervioso transmiten impulsos neuronales mediados por la *ACh*. Los insecticidas OFs tienen la capacidad de fosforilar el sitio activo esterático de la *AChE* la enzima fosforilada se inhibe irreversiblemente y no puede llevar a cabo su función normal de eliminación rápida de la *ACh*. Como resultado, la *ACh* se acumula e interrumpe el funcionamiento normal del sistema nervioso. Los carbamatos también son fuertes inhibidores de la *AChE* y pueden tener un efecto directo sobre sus receptores, pero a diferencia de los OFs esta unión es reversible [59].

3.2.2.2.1 Clorpirifos

El CPF [$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$; O, O-dietil O-3, 5, 6-tricloro-2-Piridil fósforo; Figura 6] es un insecticida OFs de amplio espectro para controlar números insectos plagas en campos agrícolas, casa, entre otros. Este insecticida se utiliza principalmente en los cultivos de soja, trigo, maíz, girasol, algodón, cebada, alfalfa, arroz, frutales [91], [92].

El CPF ejerce sus principales efectos tóxicos a través de la fosforilación no reversible de esterasas en el sistema nervioso central [93], que conducen a períodos prolongados de excitación nerviosa, lo que resulta en parálisis y, posteriormente, muerte de los insectos tratados [32]. El CPF es clasificado por su toxicidad oral y dérmica como moderadamente toxico en los mamíferos y altamente toxico en peces, anfibios, invertebrados acuáticos y aves. Tiene el potencial de almacenarse en los tejidos grasos de los organismos [43]. La IARC no registra al CPF como un pagluicida potencialmente carcinogeno en humanos [53].

El CPF es persistente durante largos períodos en el suelo y el agua, debido a su naturaleza no polar y es fácilmente soluble en solventes orgánicos [94]. Su vida media es por lo general entre 60 y 120 días, dependiendo del suelo, clima, materia orgánica, entre otras. Debido a su lenta tasa de degradación, puede ser un riesgo sustancial para los ecosistemas [95].

El clorpirifós–oxon (CPO) es el principal producto de degradación del CPF que se forma por metabolización en el organismo, y es el que genera el efecto inhibitorio en la *AChE* [96], [97].

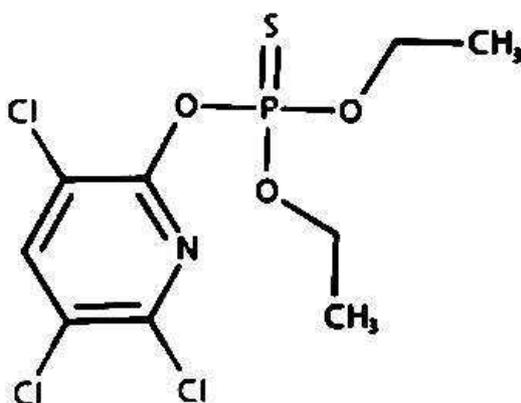


Figura 6. Estructura química del Clorpirifos: O, O-dietil O-3, 5, 6-tricloro-2-Piridil fósforo.

3.3 Problemática ambiental asociada a la expansión agrícola y al uso de plaguicidas

El incremento en el uso de plaguicidas ha generado una gran preocupación por el daño ambiental a nivel mundial, contribuyendo en gran medida a la contaminación del suelo, del agua y del aire [98], [99], [100],[101] . Argentina no estuvo ni está exenta de esta situación, dado que desde la década del 90 y en asociación al incremento de la superficie sembrada con soja, el uso de plaguicidas ha aumentado exponencialmente en nuestro país (Figura 7) [10].

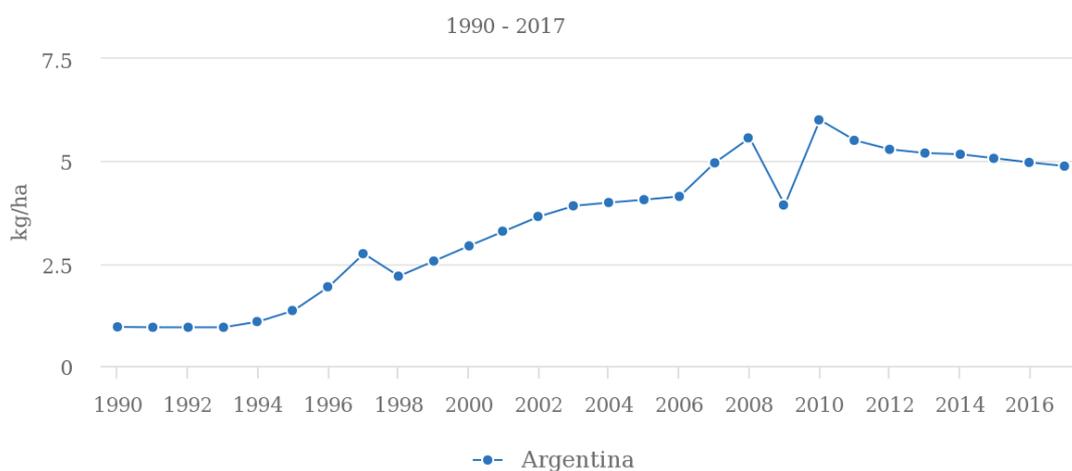


Figura 7. Uso de plaguicidas por superficie sembrada en la Argentina desde 1990 hasta 2017. Fuente: FAO, [10].

Unas de las consecuencias más graves del proceso de intensificación de la agricultura es su impacto sobre el ambiente, que ha desencadenado por un lado la destrucción del hábitat por deforestación y por otro la degradación de los ecosistemas remanentes (“parches”) por el uso masivo de agroquímicos [102], [103], [104]. Luego de la aplicación, un porcentaje importante de los plaguicidas aplicados se dispersa en el ambiente (agua, suelo y aire), afectando la fauna y flora nativas, muchas de las cuales representan, además de un componente ecológico invaluable, un recurso de gran importancia económica para la región [105], [106], [107].

Los plaguicidas son probablemente los contaminantes ambientales más estudiados [108]. La gran mayoría de los plaguicidas aplicados se desplaza hacia el medio ambiente circundante. Los métodos de aplicación no específicos, como la fumigación aérea desde aviones o la aplicación directa, y la falta de capacitación, servicios técnicos, regulaciones y control sobre el uso seguro de plaguicidas, son los principales contribuyentes a la acumulación de plaguicidas en el país [109], [110]. El destino de un plaguicida en el

medio ambiente se ve afectado por una variedad de procesos físicos, químicos y biológicos que pueden afectar su degradación, así como sus interacciones con los componentes ambientales [30]. A su vez, las condiciones de riego y la cantidad de aplicaciones son factores que también influyen en el destino final de los plaguicidas [111], [29].

Los plaguicidas se distribuyen en el medio ambiente por procesos físicos tales como sedimentación, adsorción y evaporación, dependiendo del ingrediente activo o de la formulación del plaguicida. Comúnmente ingresan a cuerpos de agua debido a la escorrentía de los campos y caminos adyacentes. Particularmente la presencia de plaguicidas en la atmósfera puede ocurrir como resultado de diferentes procesos tales como la volatilización, la erosión eólica de suelos históricamente contaminados y durante las operaciones de aplicación. Los procesos mencionados anteriormente suelen ser los principales factores que controlan la presencia de plaguicidas en la atmósfera [101]. Los plaguicidas pueden derivar directamente al medio acuático por transporte aéreo, o finalmente terminar allí a través de la escorrentía, la erosión, el drenaje, la volatilización seguida de la deposición húmeda o la lixiviación al agua subterránea [112]. La penetración de plaguicidas en el agua subterránea está controlada por dos factores: el agua aplicada y la interacción con organismos y partículas sólidas, es decir, un equilibrio entre absorción y adsorción (Figura 8) [30] [113], [114].

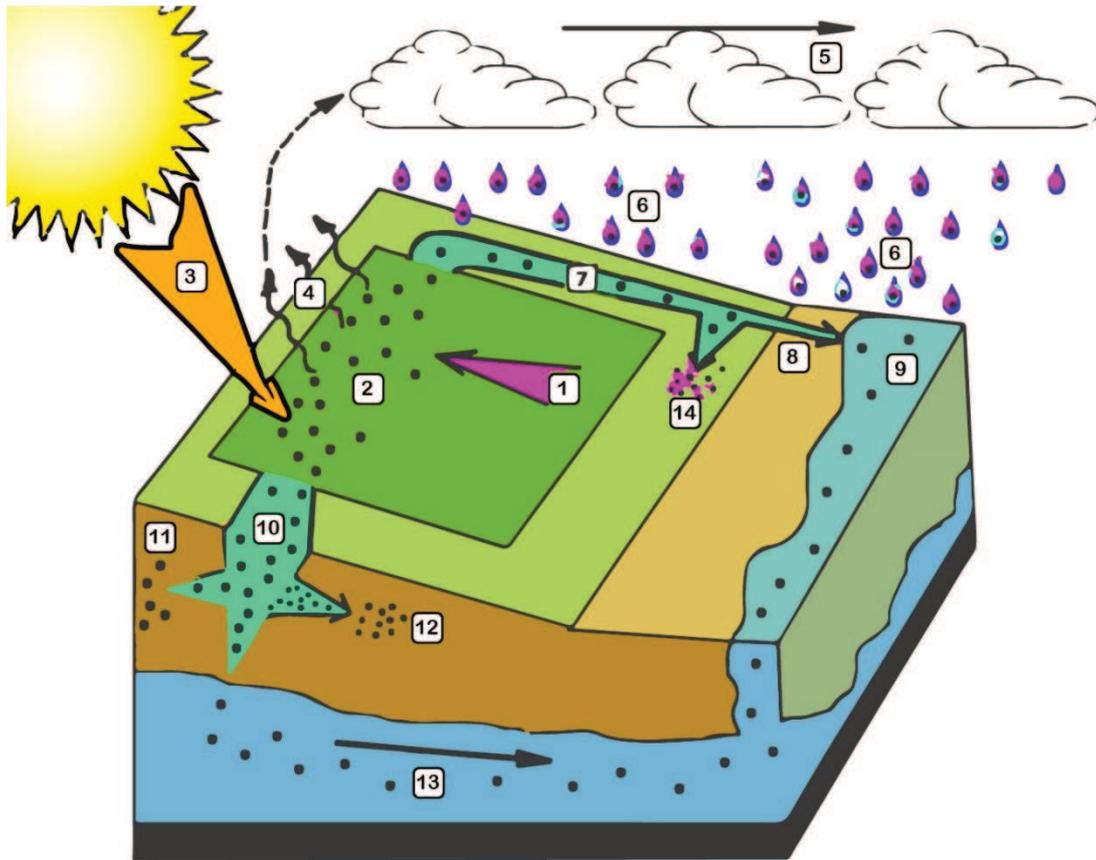


Figura 8. Movimiento de los plaguicidas en el ciclo hidrológico (Figura modificada de Lushchak et al. [30]). 1 - aplicación del plaguicida ; 2 - absorción por el cultivo; 3 – degradación por la luz ultravioleta; 4 - evaporación (vaporizado a la atmósfera); 5 - transporte de corta y larga distancia; 6 - deposición por la lluvia; 7 - escorrentía; 8 - escorrentía superficial a lagos y ríos; 9 - aguas contaminadas; 10 - infiltración; 11 - adherencia a las partículas del suelo; 12 - biodegradación (oxidación bacteriana o hidrólisis química); 13 - lixiviación (descarga de agua subterránea a arroyos); 14 - contaminación de los territorios circundantes.

Dependiendo de sus propiedades químicas, los plaguicidas pueden filtrarse a las aguas subterráneas y superficiales, persistir en el suelo o ingresar a los organismos e influir en la salud de las distintas especies, bioacumulándose en algunos casos en la cadena trófica [115], [116], [34].

Diversos trabajos han estudiado la presencia de residuos de plaguicidas en aguas superficiales y sedimentos en la Argentina. Aparicio et al. [114] estudiaron el destino ambiental del GLI y cuantificaron su concentración en las cuencas agrícolas de la Argentina. Este trabajo informó que los niveles de GLI en las aguas superficiales oscilaron entre 0.5 a 7.6 $\mu\text{g}/\text{L}^{-1}$, mientras que las concentraciones en el suelo variaron entre 35 a 1502 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ en GLI y 299 a 2256 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ en AMPA. Primost et al. [117] determinaron la presencia de GLI y AMPA en el suelo y agua en agroecosistemas de la Pampa mesopotámica, Argentina. Los niveles de concentración máximas reportados en las muestras de suelo fueron 8105 y 38939 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en GLI y AMPA respectivamente. En las muestras de agua se registró un valor máximo de 1.8 $\mu\text{g}/\text{L}$ de GLI y 1.9 $\mu\text{g}/\text{L}$ de

AMPA. Hunt et al. [118] midieron las concentraciones de 17 insecticidas en sedimentos recolectados de los arroyos pertenecientes a las principales regiones productoras de soja de América del Sur (Argentina, Paraguay y Brasil) durante los períodos de elevada aplicación. Las concentraciones máximas encontradas oscilaron entre: 1.2 – 7.4 ng/g de CPF; 0.9 – 8.3 ng/g de CIP; de 0.42 – 16.6 ng/g de lambda-cialotrina y de 0.49 – 2.1 ng/g de endosulfán (END). Etchegoyen et al. [119] determinaron la presencia de CPF, CIP y END en las aguas superficiales y los sedimentos del fondo de los principales afluentes y el principal curso de agua del río Paraguay-Paraná. Los rangos de las concentraciones totales de plaguicidas medidas en el agua y los sedimentos fueron, 0.004–6.62 µg/L y 0.16–221.3 µg/kg en peso seco, respectivamente. A su vez, los residuos de CIP han sido ampliamente detectados en muestras de aguas y sedimentos de arroyos y ríos que drenan los principales distritos agrícolas [120], [121].

Las concentraciones de las plaguicidas registradas en los trabajos pueden inducir efectos adversos en la biota terrestre y acuática no blanco (invertebrados, peces, anfibios, reptiles, entre otros).

3.4 Organismos centinelas

3.4.1 Características generales

El concepto de organismo centinela fue definido por Stahl (1997) como “*cualquier organismo no-humano que pueda reaccionar ante un acontecimiento ambiental antes de que el contaminante impacte sobre los humanos*”. La presencia/ausencia o abundancia de estos organismos indican los efectos de un contaminante de forma cualitativa. Esto quiere decir que los organismos centinela son, bioindicadores particulares utilizados para revelar de manera temprana la presencia y la toxicidad de uno o varios contaminantes en el medio ambiente [122], [123], [124]. Los xenobióticos se definen como sustancias químicas que se encuentran en un organismo determinado pero que no son producidas naturalmente por ese organismo. Se encuentran tanto en formas orgánicas como inorgánicas y hay dos tipos de xenobióticos, es decir, exógenos y endógenos. Algunos compuestos xenobióticos son dañinos para la vida humana, las plantas y el medio ambiente [125]. Cuando se introduce un xenobiótico en un entorno, sus primeros efectos se observan a nivel del organismo, luego de la población, la comunidad y, en última instancia, a nivel de todo el ecosistema.

Cuanto antes se detecten estos disturbios, mayores son las posibilidades de remediación y la oportunidad de detectar la fuente de contaminantes (Figura 9) [126]. Los plaguicidas provocan cambios en varios niveles de organización biológica (molecular, celular, fisiológico, individual, etc.) [127]. Por lo tanto, aunque permanecen presentes en el medio ambiente, los organismos centinelas pueden revelar cambios en su estado de salud o modificaciones de su comportamiento que podrían influir en su capacidad de reproducción y su supervivencia a largo plazo en el entorno que habitan, lo que podría conducir a la alteración de la salud, estructura y funcionamiento del ecosistema [128], [129], [130].

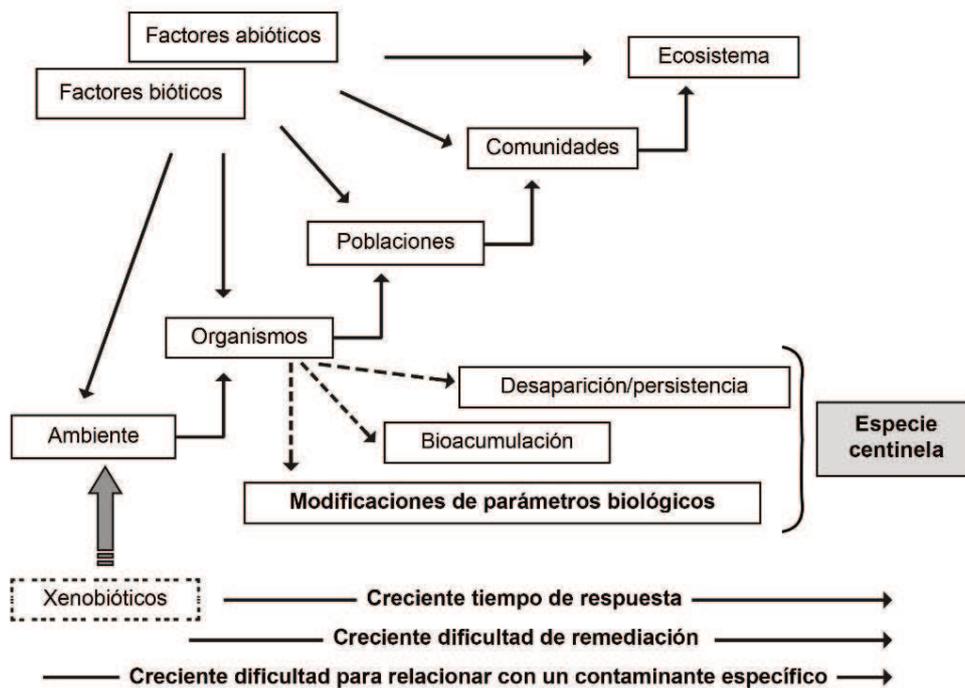


Figura 9. Relación entre las especies centinelas y los diversos niveles de organización biológica. (Figura modificada de Berthet, [126]).

Números estudios han elaborado criterios para la selección de especies centinelas [131], [132], [133], [134], de los cuales los más importantes se enumeran a continuación:

- Conocimiento de su biología, fisiología y hábitos nutricionales.
- Disponibilidad y abundancia. Es decir, un tamaño de población suficiente para que cualquier impacto de las colecciones regulares sea insignificante en la estructura y densidad de la población.
- Estabilidad genética y uniformidad de las poblaciones.
- Persistencia en el medio. Los animales que se mueven largas distancias o visitan los sitios estudiados solo ocasionalmente no pueden reflejar específicamente el nivel de contaminación en el sitio de captura.
- Amplia distribución geográfica: un rango de distribución amplio y conocido permite hacer comparaciones entre varios sitios y aumenta la probabilidad de encontrar sitios que estén muy afectados por la contaminación, así como otros que sirvan de control o referencia.
- Organismos autóctonos, representativos del ecosistema que se evalúa.
- Facilidad de identificación, captura o recolección durante todo el año, que requieren un buen conocimiento de la ecología de la especie y sus adaptaciones a las variaciones espacio - temporales de los factores ambientales.
- Preferencia por especies de importancia recreativa, comercial y/o ecológica, de tamaño reducido.

- Alta y constante sensibilidad frente a los tóxicos y/o cambios ambientales.
- Longevidad de varios años y resistencia a los contaminantes en el medio ambiente.

3.4.2 Biomarcadores del efecto de los plaguicidas en especies centinelas

La definición generalizada de biomarcador surge con Depledge en 1994 [135]: *“un biomarcador es un cambio bioquímico, celular, fisiológico o de comportamiento que puede medirse en tejidos o fluidos corporales o al nivel de todo el organismo que revela la exposición y/o los efectos de uno o más contaminantes químicos.”*

Actualmente, son una herramienta crucial, porque pueden usarse como señales de alerta temprana, antes del inicio de daños irreversibles a nivel poblacional [136]. La evaluación de los impactos de los contaminantes en la salud de los organismos y ecosistemas acuáticos es un desafío debido a la presencia de múltiples factores de estrés y la complejidad de los ecosistemas [137], [138]. Los biomarcadores se han utilizado y se utilizan ampliamente para proporcionar la conexión entre los niveles externos de exposición a contaminantes, los niveles internos de contaminación tisular y los efectos adversos tempranos en los organismos [139], [140], [141]. Como tales, se consideran señales de "alerta temprana" que tienen el potencial de detectar un efecto en la biota objetivo antes de que se observe a nivel de población, comunidad o ecosistema [137], [139]. Por lo tanto, el uso de biomarcadores puede ser una línea de evidencia crítica para comprender las relaciones entre los factores de estrés y los efectos sobre los distintos recursos y para prevenir los impactos perjudiciales de la contaminación en la estructura y función del ecosistema [137], [138].

Como hemos visto, la fauna se encuentra integrada al ambiente que habita, pudiendo ser esta indicativa de lo que sucede con los contaminantes. En este sentido, se pueden emplear numerosas especies biológicas para las evaluaciones de toxicidad de un contaminante. Sobre la especie indicadora recaen los análisis y el estudio de los biomarcadores cuya respuesta está relacionada con la presencia de uno o más xenobióticos [142]. La condición de las especies elegidas para la determinación de un biomarcador puede resumir la historia del contaminante en ese ambiente en particular [142], [143].

Según Carballo y Mudry [142] para la elección de un biomarcador, no solo se debe tener en cuenta a la especie centinela sino también los siguientes aspectos:

- Especificidad
- Sensibilidad
- Relevancia
- Factibilidad
- Variación interespecífica y estacional

Según Kendall et al. [144] los biomarcadores pueden ser de exposición, de efecto o de susceptibilidad. A continuación, se define a cada uno:

Biomarcador de exposición: Es la presencia de un xenobiótico o de sus metabolitos, así como el producto de su interacción con una diana molecular o celular medido en un compartimento de un organismo. Es decir, indica la exposición del organismo a un contaminante, sin que sus valores alterados conlleven a un perjuicio significativo al desempeño del individuo en cualquiera de sus actividades. Son considerados “biomarcadores de dosis efectiva biológica” y se obtienen midiendo su concentración en muestras apropiadas tales como orina, suero o sangre [142]. Se pueden mencionar metabolitos en orina, aductos de ADN, aductos de hemoglobina, aductos de albúmina.

Biomarcador de susceptibilidad: Es indicador de la sensibilidad particular de un individuo, heredada o adquirida. Es uno o varios criterios de valoración indicativos de una alteración bioquímica o fisiología que puede predisponer al individuo a los efectos de los agentes químicos, físicos o infecciosos. Se pueden mencionar el polimorfismo de enzimas, polimorfismo de diferentes genes (polimorfismo de un solo nucleótido, inserción/deleciones a pequeña escala – indels- microsátélites).

Biomarcador de efecto: No solo indica la exposición a contaminantes sino también alteraciones bioquímicas, fisiológicas, conductuales o de otro tipo que sufre el organismo y que, dependiendo de su magnitud, se identifican como un trastorno de la salud o una enfermedad potencial o definida, que puede o no ser irreversible. Dentro de los biomarcadores de efecto existen diferentes tipos, que se desarrollan a continuación.

3.4.2.1 Estrés oxidativo

El oxígeno (O₂) es un elemento esencial para la supervivencia de los organismos vivos y es utilizado por las células para la oxidación de compuestos orgánicos, respiración celular, producción de energía, entre otros [145]. Sin embargo, en todos estos procesos celulares el oxígeno genera radicales libres o especies reactivas de oxígeno (EROs), que puede dañar al organismo vivo [146]. Las EROs se producen en la reducción completa del O₂ al agua (Figura 10) [147]. Los productos de estas reacciones son el

radical anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) [148].

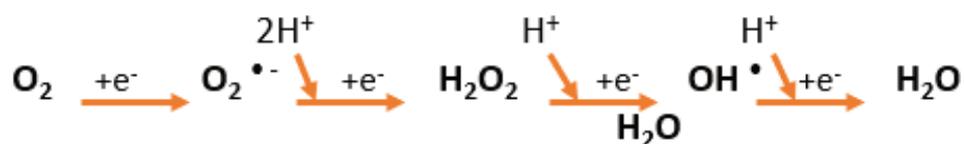


Figura 10. Vías en la reducción de oxígeno en agua que conducen a la generación de EROs (Figura modificada de Lushchak, [147]).

Tanto $O_2^{\cdot -}$ como OH^{\cdot} son radicales libres y se definen como especies químicas que tienen uno o más electrones no apareados en su orbital más externo. Para que un compuesto químico se convierta en un radical libre, es necesario que gane o pierda electrones [149]. El $O_2^{\cdot -}$ y el OH^{\cdot} son altamente reactivos y pueden causar daño molecular severo [150].

El H_2O_2 es un agente reductor y un oxidante débil. Por su naturaleza neutra le permite penetrar en las membranas celulares. Su mayor importancia en el estrés oxidativo (EO) se relaciona por la capacidad de servir como precursor del radical OH^{\cdot} [151].

Las EROs son muy reactivas y potencialmente deletéreas para los sistemas biológicos. Para minimizar los efectos que pueden generar las EROs, los organismos aeróbicos desarrollaron defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. Las defensas no enzimáticas incluyen a las vitaminas A, C y E, el glutatión, la ferritina, entre otras. Las defensas enzimáticas, como SOD, CAT, glutatión peroxidasa, protegen eliminando directamente los radicales superóxidos y el peróxido de hidrógeno, convirtiéndolos en especies menos reactivas [152], [153], [154].

SOD es la primera enzima de desintoxicación y el antioxidante más poderoso en la célula. Cataliza la dismutación de dos moléculas de $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 y O_2 , lo que hace que el $O_2^{\cdot -}$ potencialmente dañino sea menos peligroso. CAT cataliza la degradación o reducción del peróxido de hidrógeno H_2O_2 en agua y oxígeno molecular, completando así el proceso de desintoxicación. SOD y CAT son la primera línea de defensa antioxidante [155], [156], [157]. A su vez, GPx, metaboliza una variedad de peróxidos, incluido el H_2O_2 . Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentra el tripéptido glutatión en su forma reducida (GSH), que actúa como principal antioxidante en la célula y es cofactor de la acción de glutatión-S-transferasa (GST) y GPx [154]. GST es una enzima que actúa en el proceso de biotransformación, catalizando la conjugación de una variedad de metabolitos, incluyendo metabolitos xenobióticos y productos de

lipoperoxidación con GSH, transformando el compuesto tóxico en uno más fácilmente excretable [153].

Las EROs como $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 y OH^{\cdot} se producen en todos los organismos aeróbicos y normalmente existen en las células en equilibrio con el sistema antioxidante (AOX) (Figura 12) [145].

El EO se produce como resultados de un desequilibrio entre EROs y los mecanismos antioxidantes, lo que conduce a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos que causan deterioro celular y muerte [158], [159]. Esto ocurre debido a una disminución de las enzimas antioxidantes o a la acumulación excesiva de las EROs, o a ambos (Figura 11) [160], [161]. El EO puede causar daños a muchos componentes de la célula, incluidas las proteínas, los lípidos, el ADN y el ARN [162], [163], [164].

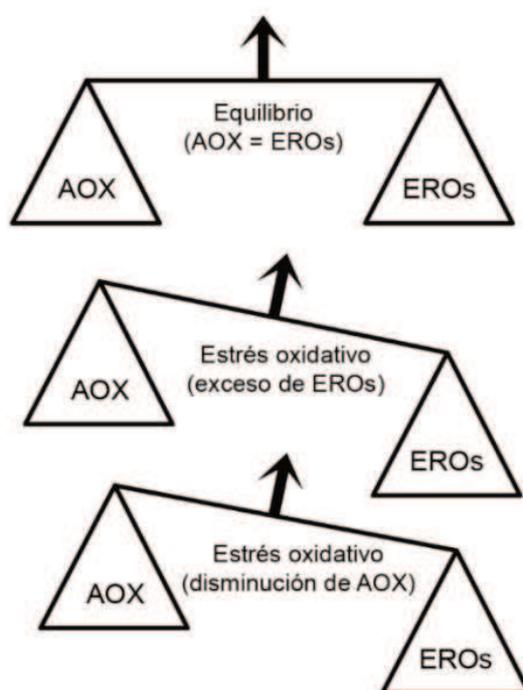


Figura 11. Las células normalmente pueden equilibrar la producción de oxidantes y antioxidantes para mantener el equilibrio redox (Figura modificada de Scandalios, [145]). El EO resulta del desequilibrio entre el AOX y EROs. El EO ocurre cuando este equilibrio se ve alterado por los niveles excesivos de EROS o por la disminución de las defensas antioxidantes.

Uno de los procesos biológicos más importantes relacionados con la actividad de EROs es la peroxidación lipídica (LPO). En las membranas celulares tiene lugar cuando se alcanzan niveles de EROs por encima del umbral, lo que no solo afecta directamente al funcionamiento celular normal, sino que también agrava el EO a través de la producción de radicales derivados de los lípidos [165], [166].

La LPO es una reacción compleja de ataques de radicales libres sobre ácidos grasos poliinsaturados (*PUFA*) que se conjugan con el glicerol o los fosfolípidos en la bicapa lipídica de las membranas biológicas, lo que resulta en una reacción en cadena debido a intermediarios inestables. Esta reacción puede conducir a una pérdida de propiedades de membrana y productos finales reactivos, que pueden interactuar aún más con otras moléculas causando daño a las proteínas y al ADN [167], [168],[153].

Los plaguicidas pueden actuar como potentes inductores de EO (Figura12) [169], [170]. En este sentido, actúan como prooxidantes en una variedad de tejidos; produciendo acumulación de EROs, daño en el ADN, alteración de las defensas antioxidantes y LPO, causando grandes perturbaciones a la homeostasis intra e intercelular [171], [159], [172], [173]. Un gran número de estudios llevados a cabo en mamíferos, anfibios y peces han demostrado que la exposición a estos compuestos produce EROs y daño oxidativo, generando así deficiencias en los organismos expuestos, como por ejemplo inhibición o sobreproducción de las defensas antioxidantes, reducción de la fluidez de la membrana hepática, lesiones hepáticas y tejido adiposo dañado junto con un aumento de la LPO [174], [175], [176], [177], [178], [179], [180], [181], [182], [183].

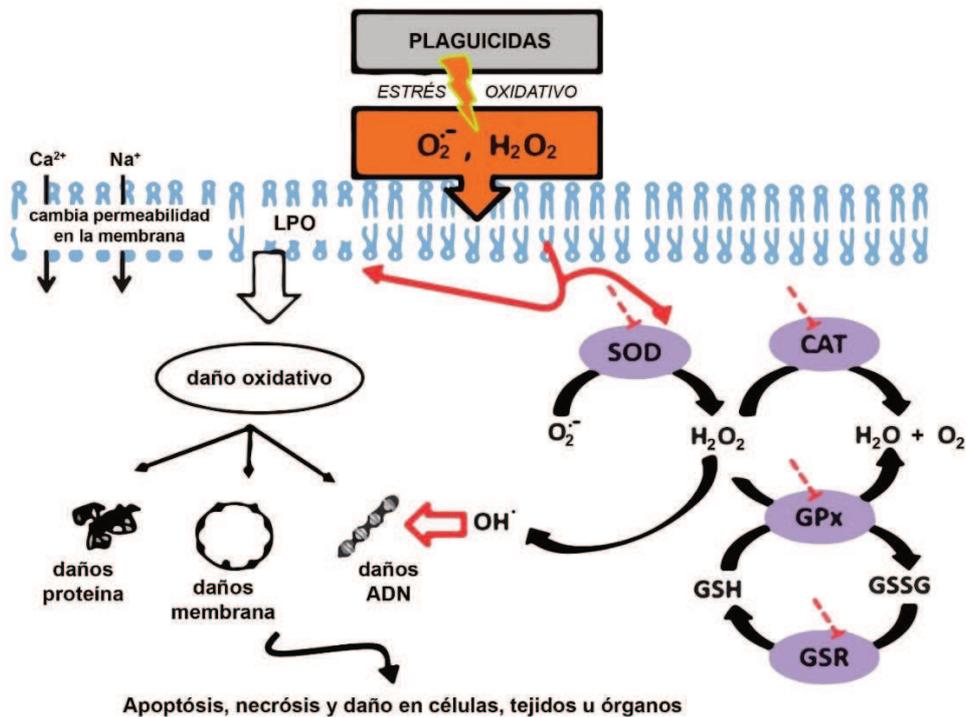


Figura 12. Representación esquemática del EO mediado por la acción de los plaguicidas (Figura modificada de Bhardwaj et al. [170]). Se produce un aumento de las especies oxidativas y deterioro del sistema de defensa antioxidante dentro de una célula. $O_2^{\cdot-}$: anión superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrógeno; OH^{\cdot} : radical hidroxilo; SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; GPx: glutatión peroxidasa; GSR: glutatión reductasa; GSSG: glutatión oxidado; GSH: glutatión reducido.

Estudios previos sobre GLI, CIP y CPF en diferentes especies y tejidos informaron que su toxicidad está relacionada con diferentes mecanismos, incluidos el daño oxidativo a lípidos y alteraciones de las defensas antioxidantes [184], [185], [186]. Por tal motivo, estos fueron los biomarcadores de EO seleccionados en este trabajo de Tesis Doctoral.

3.4.2.2 Daño al ADN

Los daños genéticos producidos por diferentes compuestos tóxicos pueden interrumpir los procesos celulares normales e interactuar directa o indirectamente con el ADN, causando inestabilidad genética [142]. Las alteraciones en la integridad del ADN se clasifican en tres grupos: 1. Daños premutagénicos como roturas simples o dobles de cadenas de ADN, formación de aductos al ADN o síntesis no programada de ADN no programada; 2. Daño mutagénico; 3. Aberraciones cromosómicas, incluida la pérdida o ganancia de un cromosoma completo (aneuploidía), deleción o roturas de brazos cromosómicos (clastogenicidad) y segmentos o reordenamientos cromosómicos (Figura 13) [187].

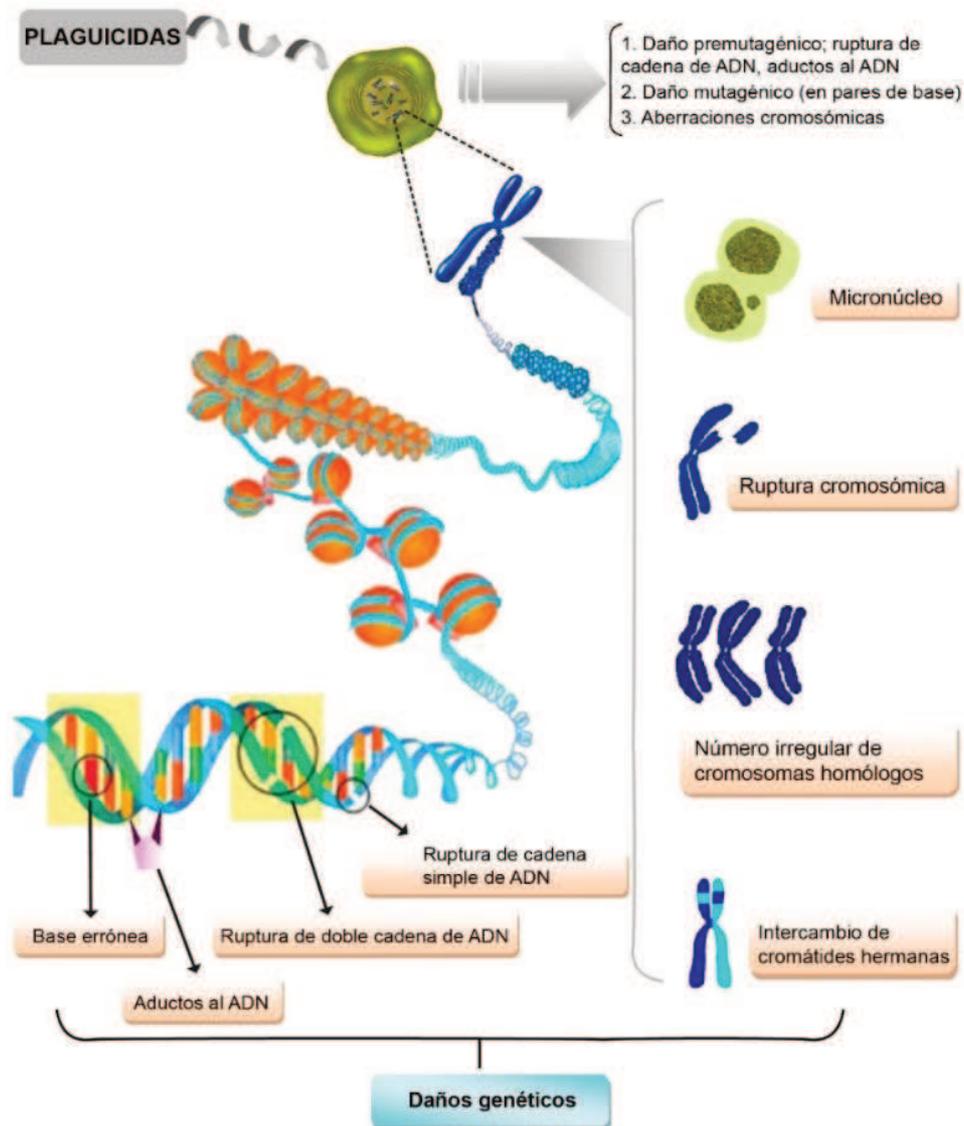


Figura 13. Esquema de la inducción de daños genéticos que incluye efectos premutagénicos, mutagénicos y cromosómicos por exposición a plaguicidas (Figura modificada de Mostafalou et al., [187]).

Como hemos visto, la genotoxicidad de muchos contaminantes puede generar diversas alteraciones estructurales en la secuencia y disposición del ADN [187]. Dichas alteraciones se pueden detectar mediante distintos tipos de pruebas de genotoxicidad [188], [189]. El ensayo cometa (EC) es una técnica sensible, rápida y simple para la detección de las primeras etapas del daño del ADN a nivel de una célula individual [190]. Es utilizada para analizar roturas de la molécula de ADN de simple o doble cadena, sitios sensibles al álcali, uniones cruzadas de ADN-AND y ADN-proteína y roturas de cadena simple asociadas a mecanismos de reparación del ADN [191], [192]. La técnica se basa en lisar las células, separando al ADN de los demás componentes celulares y de la envoltura nuclear, quedando una estructura en forma de "nucleoide" [193]. El daño al ADN se puede analizar en células individuales las cuales son embebidas en una capa

de gel de agarosa y posteriormente sometidas a un proceso de electroforesis; el daño al ADN es atraído hacia el ánodo, formando una cola de cometa. El mismo está formado por una cabeza (región nuclear) y una cola (formada por los fragmentos de ADN que han migrado en dirección del ánodo). La intensidad de la cola (generalmente medida por microscopía de fluorescencia) va a depender de la frecuencia de roturas, en el cual migran los bucles de ADN que contienen la ruptura [193], [194]. La migración es directamente proporcional al daño producido en la molécula de ADN. Cuantas más roturas de la molécula de ADN simple haya más será el desenrollamiento de la molécula de ADN y su alargamiento. [195]. Las principales ventajas del EC son: la recopilación de datos a nivel de célula individual, lo que permite análisis estadísticos más sólidos; un número pequeño de células por muestra de tejido; sensibilidad para detectar daño en el ADN; el uso de cualquier población de células individuales eucariotas tanto *in vitro* como *in vivo* [196], [197], [198], [199].

Las EROs están involucradas en varios tipos de lesiones en el ADN, incluyendo rotura de simple y doble cadena, sitios alcalinos-lábiles, así como la oxidación de purinas y pirimidinas [200]. El $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 no influyen directamente en los componentes del ácido nucleico [201]. El OH^{\cdot} es en gran parte responsable del daño oxidativo al ADN, provocando daño en las bases nitrogenadas [202]. Dos de las modificaciones más comunes en la base del ADN son 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua) y 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina [202]. Se acepta que las alteraciones en el ADN debidas a 8-oxoGua son parte del sitio de reconocimiento utilizado por las glicosilasas de ADN para detectar bases de guanina dañadas [203]. La interacción del radical OH^{\cdot} con pirimidinas (timina y citosina), puede producir varias lesiones en las bases y general productos reactivos como la 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina (timina glicol, Tg) y la 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrocitosina (citosina glicol) [204].

El EC en combinación con ciertas enzimas bacterianas (por ejemplo, formamidopirimidina glicosilasa, endonucleasa III, glicosilasas de uracilo-ADN, etc.) reconocen la oxidación de las bases de purinas y pirimidinas. Tal es así, que el EC se puede utilizar para determinar el daño oxidativo al ADN [205]. Con el fin de dilucidar el posible mecanismo de acción de los plaguicidas seleccionados, incluimos el EC modificado con el agregado de formamidopirimidina ADN glicosilasa (fpg), que detecta bases dañadas de ADN, principalmente 8-oxoGua y otros productos de oxidación de purinas y endonucleasa III (Endo III) que reconoce las pirimidinas oxidadas. La adaptación del EC incorporando estas enzimas, aumenta su especificidad y sensibilidad (en términos de la capacidad de detectar una gama más amplia de daños en general) a través del reconocimiento de lesiones específicas para revelar la presencia de

pirimidinas y purinas oxidadas [206]. Fpg actúa sobre 8-oxoGua y también sobre derivados de purina de anillo abierto o formamidopirimidinas, tales como 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FaPyGua), 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FaPyAde) y en menor medida, 8-oxoadenina. Las pirimidinas oxidadas, que incluyen timina glicol y uracil glicol, se reconocen con Endo III. Las glicosilasas tienen una actividad AP (sitios apurínicos / apirimidínicos) liasa o AP endonucleasa asociada, es decir, escinden el ADN en los sitios AP o azúcares sin base que quedan como intermediarios de la reparación de escisión de base después de la eliminación de la base dañada. Pero otros sitios AP, no relacionados con el daño por oxidación, pueden estar presentes en el ADN, y estos también son detectados y escindidos por fpg o Endo III. Por tanto, la especificidad de la enzima no es absoluta. Los sitios AP son lábiles a los álcalis, por lo que, en principio, se espera que aparezcan entre las roturas de hebras detectadas en el ensayo cometa estándar (alcalino) [194].

Diversos trabajos, en distintas especies centinelas tales como anfibios (*Bufo bufo gargarizans*, *Rhinella arenarum*, *Hypsiboas pulchellus*), reptiles (*Salvator merianae*) y peces (*Cnesterodon decemmaculatus*) han relacionado el daño al ADN y daño oxidativo al ADN con la exposición a plaguicidas [207], [207], [208], [209], [210] [211].

El ensayo de micronúcleos (MN) es otro método para evaluar daño ejercido en la molécula de ADN a nivel cromosómico [142]. Comúnmente se utiliza para detectar de forma temprana el daño inducido por agentes clastogénicos y/o aneugénicos sobre el material genético y la maquinaria mitótica asociada, siendo muy empleado en biomonitoreo ambiental [142], [187]. Específicamente, durante 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. Los MN se manifiestan en células en división que contienen roturas cromosómicas que carecen de centrómeros (fragmentos acéntricos) y/o cromosomas completos que no pueden migrar a los polos del huso durante la mitosis. En la telofase, se forma una envoltura nuclear alrededor de los cromosomas y fragmentos rezagados, que luego asumen gradualmente la morfología de un núcleo en interfase con la excepción de que son más pequeños que los núcleos principales de la célula, de ahí el término "Micronúcleo" [212].

Tanto el EC como el ensayo de MN se utilizan ampliamente como marcadores inespecíficos de genotoxicidad en diversas especies. Recientemente, estas técnicas fueron modificadas para detectar daño genotóxico específico mediante su combinación con la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*). El EC-*FISH* es un método que permite detectar el daño y la reparación del ADN en regiones genéticas específicas en

relación con el genoma general [213]. Su propósito es determinar si el daño primario que detecta el EC afecta a un gen específico (u otra secuencia) de interés [214]. La señal detectada en la cola del cometa indica daño a la secuencia de ADN de interés. El *EC-FISH* se ha utilizado en varios estudios que han localizado con éxito el daño del ADN dentro de los cometas utilizando sondas específicas de genes y cromosomas [215]. La capacidad de obtener este tipo de información es útil porque podría beneficiar a muchas áreas de investigación proporcionando información valiosa sobre las características intrínsecas del ADN de las células individuales y sus respuestas a diversos xenobióticos tales como la exposición a plaguicidas [216]. Por su parte, el ensayo de *MN-FISH* permite caracterizar daño clastogénico/aneugénico y blancos de ataque cromosómico específicos, favoreciendo el entendimiento de los mecanismos de formación de MN [217].

3.4.2.3 Expresión génica

La determinación de los niveles de expresión génica pertenece a una nueva familia de biomarcadores, basados en el análisis de la transcripción de genes relacionados al estrés celular, que pueden ser utilizados para detectar exposición a xenobióticos, actuando como sensores de alerta temprana [218]. Las respuestas a los contaminantes pueden manifestarse no solo en forma de un cambio en uno o en un pequeño número de genes, sino que también pueden involucrar una cascada de interacciones genéticas [219]. Está demostrado que la expresión génica se altera directa o indirectamente como resultado de la exposición a xenobióticos [220]. Particularmente, diversos trabajos han demostrado que los plaguicidas, provocan cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican para los sistemas antioxidantes, así como aquellos intervinientes en procesos de biotransformación, reguladores del ciclo celular y de reparación del daño, entre otros [89], [221], [222], [223], [224]

Como hemos visto en la sección la 3.4.2.1 SOD y CAT son dos enzimas que contribuyen a la primera línea de defensa antioxidante [225]. Cuando la producción de radicales libres excede el nivel que los mecanismos naturales de defensa antioxidante pueden hacer frente, se crea un entorno oxidativo celular [154]. Esta alteración en la respuesta del AOX puede modificar la expresión de los genes que codifican estas enzimas [145], [176]. Específicamente, la exposición a plaguicidas puede alterar la respuesta del AOX, modificando la expresión de los genes que codifican para estas enzimas [176]. Estos cambios son inmediatos y más sensibles que los puntos finales de uso tradicional en toxicología, por lo que constituyen marcadores de relevancia en situaciones de estrés [218]. Aunque muchos estudios indican que las células tienen los medios para detectar

las EROs, el mecanismo de acción de los xenobióticos y de los reguladores de EROs que activan la expresión de ciertos genes aun no están totalmente dilucidados [227], [228], [229], [226], [224]. La red transcripcional que responde a las EROs en eucariotas se está descifrando en la actualidad. Una gran cantidad de respuestas biológicas y vías de señalización celular están involucradas en los efectos toxicológicos inducidos por el EO. Durante el proceso, se observan cambios significativos en la expresión génica y la estimulación o inhibición de la transducción de señales [145]. En muchas especies de peces y mamíferos se ha informado que la expresión alterada de los genes *cat* y *sod* es una respuesta a la exposición a plaguicidas (atrazina, organoclorado, cipermetrina e indoxacarb) en diferentes tejidos como hígado, riñón, ovario y branquias [176], [230], [223], [224].

Los genes citocromo *p450* y glutatión-S transferasa (*gst*) están involucrados en los procesos de detoxificación. La superfamilia del citocromo *p450* (*cyp*) presenta una gran cantidad de genes que codifican enzimas *p450* [231]. Las *cyp* se encuentran presentes en todos los dominios de la vida y actúan generalmente como agentes oxidantes en una variedad de reacciones metabólicas y biosintéticas, que incluyen procesos de desintoxicación y regulación [232]. Están involucradas en reacciones de monooxigenación de una amplia gama de compuestos endógenos y exógenos en diversas especies de mamíferos y peces [232], [234]. Se ha demostrado que las familias *cyp1*, *cyp2* y *cyp3* son las responsables de una variedad de funciones del metabolismo xenobiótico, principalmente en el hígado [235]. La presencia y el nivel de expresión de estas enzimas influyen en la capacidad del tejido para metabolizar y/o desintoxicar los xenobióticos [235]. Por otro lado, GST se encuentra entre las principales enzimas antioxidantes y los indicadores de primera línea del estado antioxidante [236]. En la fase II de la biotransformación, GST juega un papel central a través de la desintoxicación y excreción de xenobióticos como los herbicidas y compuestos endógenos que se conjugan con el glutatión [237]. Numerosos estudios en peces y mamíferos han demostrado la utilidad de los genes *cyp* y *gst* como marcadores de expresión génica, estableciéndolos como una herramienta útil para los ensayos de biomonitorio y ecotoxicología [89], [222], [238]

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso altamente regulado por el cual un organismo elimina las células no deseadas sin provocar una respuesta inflamatoria [239], [240]. La apoptosis inducida por distintos xenobióticos, incluidos los plaguicidas, se registró en diversos trabajos publicados anteriormente [241], [242], [243]. Los procesos de señalización apoptótica están relacionados con alteraciones de moléculas relacionadas con la apoptosis, como los genes *p53*, *bcl₂*, *bax*, entre otros

[221]. El gen supresor de tumores *p53* juega un papel fundamental en la apoptosis y en la proliferación celular tras el daño del ADN [244]. Diversos trabajos han demostrado que la modulación del gen *p53* es un biomarcador potencial de la apoptosis inducido por contaminantes ambientales, entre ellos los plaguicidas [245], [246], [247], [248], [243].

El análisis de los patrones de expresión génica en respuesta al impacto negativo que puede llegar a producir distintos xenobióticos puede proporcionar una visión más completa del origen del daño tanto a nivel molecular como celular y [249]. Los estudios han demostrado que los compuestos tóxicos, incluidos los plaguicidas, tienen diversos efectos sobre la modulación en los niveles de expresión génica, incluyendo alteraciones en la expresión de enzimas detoxificadoras, enzimas antioxidantes, enzimas de reparación del ADN [250], [251], [176].

3.4.2.4 Parámetros de crecimiento

Los parámetros de crecimiento son una respuesta integrada a numerosos procesos fisiológicos que influyen en la producción del individuo. Se usan como un índice de salud individual, que integra aquellos factores que tienen efectos positivos y negativos en el balance de producción [252]. Durante la última década ha habido un interés renovado en la aplicación de los parámetros de crecimiento como biomarcador en respuesta a la exposición a plaguicidas [253], [254], [255], [256], [257]. Los parámetros de crecimiento pueden proporcionar la clave para integrar diversas respuestas moleculares y celulares en un organismo con una aptitud física deteriorada, porque estos procesos deben ser funcionales para que un organismo sobreviva [253].

Diversos trabajos han informado alteraciones en el crecimiento como consecuencia de la exposición a plaguicidas, indicando distintas estrategias fisiológicas dependiendo de la situación de estrés [257], [258], [259].

Teniendo en cuenta el uso extensivo de formulaciones de plaguicidas en los entornos agrícolas actuales en Argentina, la detección temprana de sus efectos a través de biomarcadores sensibles proporciona herramientas de gran valor para la evaluación de los efectos a mediano y largo plazo en la vida silvestre. La contaminación por plaguicidas afecta no solo a los suelos y a la biota directamente relacionados con los cultivos donde se aplican estos químicos, sino que también produce efectos adversos en los ecosistemas que rodean las áreas de cultivo y a los organismos que viven allí [260]. Diversos trabajos han demostrado que la exposición a plaguicidas influye en la morfología, fisiología, metabolismo y/o integridad del ADN de un organismo y, por lo tanto, afecta a la capacidad de adquirir recursos, crecer y reproducirse [261], [262]. La

posibilidad de integrar biomarcadores de crecimiento con marcadores de EO, genotoxicidad y de expresión génica mejorará la capacidad para predecir las consecuencias de exposición a distintos xenobióticos y nuestra comprensión sobre los mecanismos a través de los cuales las plaguicidas afectan a las distintas especies [253].

3.5 *Caiman latirostris*: especie centinela en la Provincia de Santa Fe

3.5.1 Características y distribución

Los reptiles son modelos importantes en la historia evolutiva y tienen una gran importancia ecológica, sociológica y comercial [263], [264]. Son trascendentales en los ecosistemas naturales, como presas, depredadores, herbívoros, dispersores de semillas y como bioindicadores de la salud ambiental [265], [266].

Caiman latirostris (vulgarmente conocido como yacaré overo), pertenece al orden Crocodylia, familia Alligatoridae, es una especie autóctona en la Argentina y tiene gran interés comercial y ecológico para gran parte de América del Sur (Bolivia, Paraguay, Uruguay y Brasil) [267].

La distribución geográfica de esta especie incluye a los afluentes del río Paraná, Paraguay, Uruguay y São Francisco, que se extienden por las regiones del noreste de Argentina, sureste de Bolivia, Paraguay, Brasil y norte de Uruguay. También incluye una gran cantidad de pequeños afluentes de la costa atlántica desde Natal, en el extremo oriental de Brasil, hasta el noreste de Uruguay (Figura 14) [268].



Figura 14. Distribución de *C. latirostris*. Países: Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Uruguay. Fuente: Siroski et al., [268].

Particularmente en Argentina, *C. latirostris* se distribuye en las provincias de Formosa, Santa Fe, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Chaco, Santiago del Estero, Salta y Jujuy [267]. Es una especie ectotérmica con un ciclo estacional bien definido que depende de factores climáticos (temperatura exterior y régimen hidrológico). En Argentina, su reproducción tiene lugar entre los meses de noviembre y enero, con un periodo incubación de 65-75 días aproximadamente a 31°C [267]. Cuando nacen las crías pesan unos 40 g y miden aproximadamente 22 cm. El tamaño de los adultos macho está en el orden de los 2.60 m de longitud y unos 80 kg de peso (Figura 15) [269].



Figura 15. *Caiman latirostris* adulto. Tamaño aproximado del animal de 1.5 m.

A partir del año 1990 las poblaciones silvestres de yacaré overo de la provincia de Santa Fe comenzaron a ser objeto de manejo a través de un programa para la preservación de la especie y la explotación racional de productos de interés comercial (Res 283/00, Sec. Amb. Des. Sust. Nac.). Este programa, basado en la técnica de “ranqueo” (cosecha de huevos en la naturaleza, cría en cautiverio y devolución a la naturaleza), permitió una importante recuperación de las poblaciones naturales, de manera que la especie fue transferida en el año 1997 al Apéndice II de CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres), permitiendo la comercialización de productos de esta especie cuando provengan de programas debidamente habilitados [267]. La implementación de esta metodología de manejo evita la pérdida de huevos producidos en la naturaleza y la gran mortandad de individuos con menos de un año de edad, contemplándose la reintroducción a la naturaleza de un

número de animales superior a aquellos que hubieran sobrevivido de forma natural, asegurando la conservación de la especie para beneficio de las futuras generaciones. Estos programas involucran activamente a los pobladores locales en la identificación y conservación de las áreas de nidificación, lo cual significa un beneficio, no sólo para las especies bajo manejo, sino para todos los taxa que comparten el hábitat [267].

3.5.2 Antecedentes en el área sobre *Caiman latirostris*

A pesar de la recuperación lograda en las poblaciones naturales de caimanes gracias a la implementación de estos programas en Argentina, hoy en día estos animales atraviesan una de las principales problemáticas que afectan, desde hace varios años, a muchas especies silvestres: la pérdida de hábitat como consecuencia de la presión antrópica, tendiente a destinar cada vez más tierras a la producción agrícola. Esto conlleva a una constante exposición a los agroquímicos utilizados para el control de plagas, principalmente formulaciones de GLI, CIP y CPF, entre otras [270]. Por otra parte, el período del año de máxima aplicación de plaguicidas coincide con la temporada reproductiva de esta especie, implicando un riesgo de contaminación particularmente importante durante los primeros meses de vida de estos animales [254].

C. latirostris es una especie considerada centinela para evaluar el efecto inducido por los plaguicidas [271]. La exposición a plaguicidas en las poblaciones naturales de *C. latirostris* es de gran preocupación. Atendiendo a esta problemática, se ha comenzado a estudiar, hace más de 14 años, los posibles efectos de plaguicidas ampliamente utilizados en la actividad agrícola. Se demostró el efecto genotóxico y menor crecimiento luego de exposición embrionaria y postnatal a la formulación Roundup® (glifosato 66.2%) [254], [272]. A su vez, la mezcla de formulaciones de GLI, END y CIP comúnmente utilizada en las prácticas agrícolas, produjo un efecto genotóxico mayor sobre los neonatos, además de inducir alteraciones bioquímico-enzimáticas luego de una exposición semi-controlada. A su vez, reportó diferencias en los parámetros de crecimiento de *C. latirostris* eclosionados en diferentes nidadas durante el primer año de vida, basadas en mediciones de longitud total, longitud hocico-cloaca y peso al nacer, 3 y 12 meses después de la exposición durante el desarrollo embrionario a GLI y la mezcla (CIP + END + GLI) [273]. Estos hallazgos fueron los primeros registros de efectos genotóxicos en todas las especies de cocodrilianos e incluso de reptiles [271], [254], [273]. López González et al. [274] informaron la inducción de genotoxicidad en eritrocitos de *C. latirostris* expuestos a concentraciones subletales de dos formulaciones de GLI: PanzerGold® y Roundup® Full II (500, 750, 1000 µg / huevo); a la formulación a base de END Galgofan® y de CIP Atanor® (1, 10, 100 y 1000 µg/ huevo) por aplicación

tópica a través de la cáscara del huevo desde la primera semana del período de incubación. Posteriormente, se estudiaron los efectos de tres mezclas binarias de formulaciones de CIP, CPF y GLY, reportando un aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos [256].

A partir de antecedentes sobre el daño oxidativo a biomoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) generado por plaguicidas por un exceso en la producción de EROs o por daño a las moléculas que intervienen en sistemas de defensa antioxidante, se pusieron a punto las técnicas de determinación de daño oxidativo a lípidos (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico - TBARS) y al ADN (EC con enzimas fpg y ENDO III) y actividad enzimática (CAT, SOD y Glutación) en sangre, para el estudio de los posibles mecanismos de daño de los plaguicidas de interés. Este también fue el primer reporte de la aplicación de estas técnicas en sangre periférica de reptiles, lo cual representa una ventaja enorme para el estudio de poblaciones silvestres, ya que pueden obtenerse muestras de sangre sin daño a los animales [275]. Burella et al. [276] aplicó estos biomarcadores para la evaluación del impacto de los plaguicidas en *C. latirostris*. Los autores informaron desequilibrios en el estado oxidativo a través de la LPO y el daño al ADN, así como en las actividades de las enzimas antioxidantes CAT y SOD en embriones de *C. latirostris* después de una exposición tópica a concentraciones subletales (1-1000 µg/huevo) de las formulaciones antes mencionadas.

3.6 Aporte original

La mayoría de los biomarcadores utilizados hasta el momento para identificar estrés por contaminación se basan en alteraciones de parámetros bioquímicos y/o anomalías citológicas o histológicas que pueden correlacionarse con la presencia de tóxicos en el ambiente [115], [277].

Los marcadores tales como EC, EC modificado, enzimas antioxidantes, TBARS tienen un procesamiento relativamente rápido, generando mucha información en poco tiempo. Estos puntos finales toxicológicos son herramientas útiles y convenientes para monitorear la calidad ambiental, evaluar los riesgos químicos y la seguridad, investigar los valores umbral y evaluar la vulnerabilidad de los organismos a químicos o tóxicos específicos, como los plaguicidas [183].

Las alteraciones en los patrones de expresión del ARNm ofrecen nuevas perspectivas sobre el papel de los genes en el contexto de toxicidad [219]. Estos cambios son inmediatos y generalmente más sensibles que los puntos finales utilizados tradicionalmente en toxicología, por lo que son marcadores relevantes en diversas condiciones de estrés [224]. En este sentido, la alteración de la expresión génica puede usarse para detectar toxicidad biológica y/o monitorear el impacto de diferentes xenobióticos en ambientes naturales [278]. Varios estudios en peces y mamíferos han demostrado su utilidad como marcadores de expresión génica, estableciéndolos como una herramienta útil para las pruebas de biomonitoreo y ecotoxicología [228], [89], [222], [279], [280].

Estudios recientes han caracterizado al gen que codifica para la enzima *sod* y los patrones de expresión del mismo en diferentes tejidos en la especie *Crocodylus siamensis* [281]. Sin embargo, no existe información sobre los cambios en los niveles de expresión de los genes *cat* y *sod* como respuesta a la exposición a plaguicidas en ninguna especie de cocodriliano, considerándose este un aporte original y relevante, de gran valor explicativo junto a los demás biomarcadores, para interpretar integralmente los efectos tóxicos de los plaguicidas sobre *C. latirostris*, tal como lo plantea en esta Tesis Doctoral.

La posibilidad de aplicar marcadores moleculares de expresión génica en yacaré overo permitirá comprender el significado específico de muchas alteraciones producidas por los plaguicidas y observadas mediante marcadores de daño al ADN, EO, alteraciones inmunológicas, entre otros. Además, estos se han puesto a punto en sangre para evitar el sacrificio de los animales.

La determinación de todos los marcadores mencionados anteriormente puede proporcionar información integrada sobre las consecuencias ecotoxicológicas del uso de plaguicidas [282].

En el presente estudio, las condiciones controladas de exposición utilizadas pretenden simular la situación real de exposición que tiene lugar en las poblaciones naturales de caimanes durante la temporada reproductiva, tanto para las concentraciones aplicadas de las formulaciones a base de GLI, CPF y CIP (recomendadas para los cultivos de soja) como el método de aplicación de los plaguicidas utilizados.

Teniendo en cuenta la amplia utilización de las formulaciones plaguicidas antes nombradas en los ambientes agrícolas actuales, la detección temprana de sus efectos mediante marcadores sensibles provee herramientas de gran valor para la conservación a mediano y largo plazo de las especies silvestres. Esto permite la identificación de problemas ambientales antes de que los sistemas biológicos se vean seriamente afectados [277], considerándose de importancia primordial para la sustentabilidad de los ambientes naturales.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

El impacto biológico de los plaguicidas es el resultado de una cascada de eventos que puede manifestarse a distintos niveles de organización biológica, ejerciendo a largo plazo un efecto marcado sobre las poblaciones. Las células responden a estas alteraciones mediante un reajuste en el metabolismo, normalmente activando o sintetizando proteínas específicas para compensar el daño, a partir de los ARNm que codifican para estas proteínas. Así, los biomarcadores de expresión génica pueden ser utilizados para detectar exposición a xenobióticos, actuando como sensores de alerta temprana. El objetivo de este trabajo es identificar respuestas moleculares de expresión génica y daño genotóxico específico como biomarcadores potenciales de exposición a los plaguicidas GLI, CIP y CPF en *Caiman latirostris*.

4.2 Objetivos específicos

1- Evaluar el daño oxidativo a lípidos y ADN, y la modulación de defensas antioxidantes en sangre periférica de yacaré overo por exposición embrionaria y durante los primeros meses de vida a formulaciones de glifosato, cipermetrina y clorpirifós.

2- Estudiar los niveles de expresión de genes que codifican enzimas que participan en la respuesta antioxidante, para identificar marcadores sensibles de exposición a plaguicidas y relacionarlos con el perfil de estrés oxidativo evaluado en iguales condiciones.

3- Identificar otros genes que codifiquen proteínas de interés intervinientes en sistemas de defensa antioxidante, reparación del daño y reguladores del ciclo celular, para el desarrollo de nuevos marcadores de expresión génica.

4- Promover la formación de recursos humanos calificados en las principales problemáticas que afectan a las especies de fauna silvestre, favoreciendo así las estrategias de conservación, manejo y concientización en el uso sustentable de esta especie tan importante para nuestra región.

5. Materiales y métodos

El presente estudio fue evaluado y aprobado por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina) (Acta N° 01-15).

5.1 Identificación de genes de interés por PCR convencional

Esta sección se relaciona principalmente con los objetivos específicos 2 y 3 de esta Tesis Doctoral.

5.1.1 Ejemplares de *C. latirostris*

Se utilizaron ocho crías (cinco días de edad) de *C. latirostris*, provenientes de dos nidos distintos, del programa de uso sustentable Proyecto Yacaré (PY). Cinco días después de la eclosión, se tomaron muestras de sangre (0.5 ml) de la vena espinal con jeringas heparinizadas y agujas de 25G x 5/8 [283].

5.1.2 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

En una primera etapa se procedió a estandarizar la técnica de preservación y aislamiento de ARN de alta calidad en sangre periférica de *C. latirostris* (Figura 16 A y B) [284].

Se utilizó el reactivo TRIzol® LS (Ambion, Life Technologies) para la extracción de ARN de sangre entera en una proporción 1:4 a 1:5. En primer lugar, se añadieron 200 µl de cloroformo a cada muestra, se homogenizó y se centrifugó a 4 °C. Luego, la fase superior se transfirió a un nuevo tubo y se realizó una segunda extracción. Posteriormente se agregó isopropanol (0.5 ml) y se dejó precipitar el ARN durante toda la noche a -20°C, lo cual aumenta la eficiencia del proceso y mejora en gran medida la relación 260-230 nm. Posteriormente se centrifugó durante 45 min a 4 °C y se procedió a lavar dos veces con etanol al 75%. Finalmente se descartó el sobrenadante y se dejó secar durante 1–2 h bajo campana de extracción. Para la reconstitución de ARN, se añadió una cantidad apropiada (15-20 µl) de ARNsecure™ (Invitrogen, reactivo de inactivación de ARNasa), y se incubó durante 10 min a 60 °C para solubilizar el ARN e inactivar la contaminación por ARNasa.

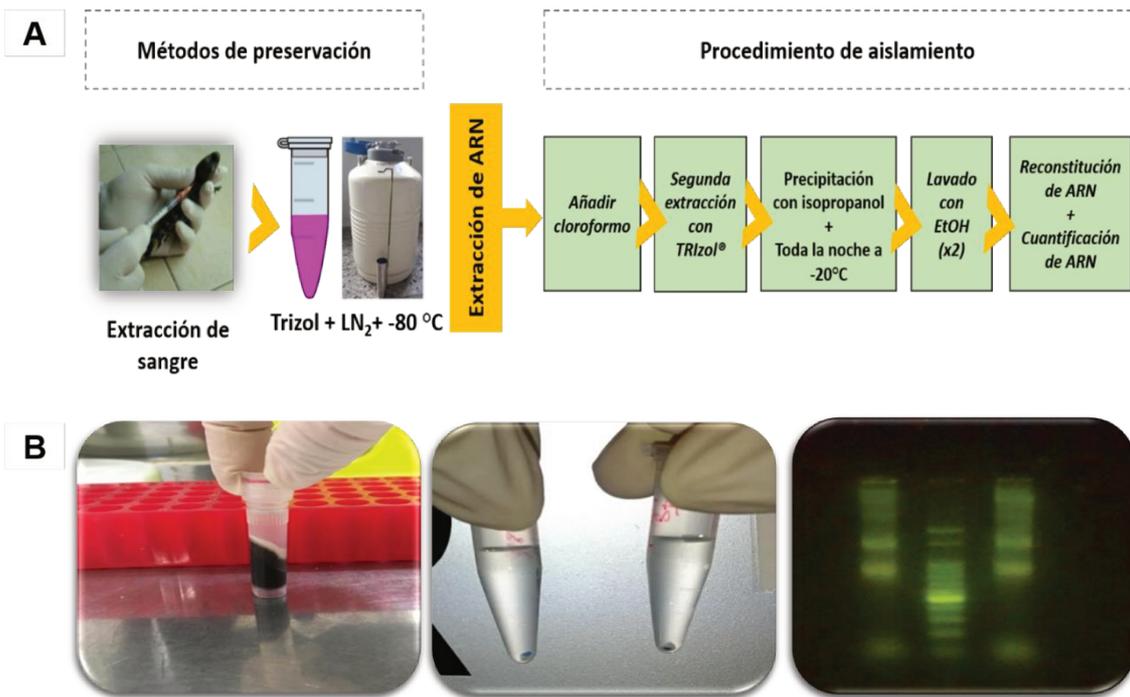


Figura 16. A) Representación esquemática de la técnica de extracción de ARN según protocolo adaptado en sangre periférica para *C. latirostris*. **B)** Imagen correspondiente a las distintas etapas de la extracción de ARN. Marcador de tamaño molecular: 100 pb (Plus DNA - TransGen Biotech).

Posteriormente se realizó el tratamiento con DNasa I libre de ARNasa (PBL Productos Bio-Lógicos) para eliminar cualquier ADN genómico remanente, siguiendo el procedimiento detallado por el fabricante. La calidad del ARN se verificó mediante la medición de absorbancia a 260 nm-280 nm en cada muestra. A su vez, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Finalmente, se usó el kit RevertAid First Strand (Thermo Scientific®) para la síntesis de ADNc (RT), siguiendo los procedimientos detallados por los fabricantes.

5.1.3 Diseño de *primers*

Se determinó la presencia/ausencia a través de una PCR convencional de genes de interés tales como β -actina, cat, sod, gst, citocromo p450, bcl₂, bax y p53 en sangre de *C. latirostris*. Los *primers* se diseñaron a través de la página de Integrated DNA Technologies [285] (IDT - <https://www.idtdna.com/pages>; Tabla 4).

A partir del genoma de *Alligator mississippiensis* se diseñaron los siguientes *primers*: β -actina ARNm (GenBanck DQ421415.1), cat ARNm (GenBanck XM_006259972.3) y bcl₂ ARNm (GenBank: XM_019490401.1).

A partir del genoma de *Alligator sinensis* se diseñaron los *primers* de: *bax* ARNm (GenBank: XM_014517177.1), *p53* ARNm (GenBank: XM_006038654.2), *p450* ARNm (GenBank: XM_014523553.1) y *gst* ARNm (GenBank: XM_006030870.2).

Para el gen *sod*, se utilizaron los *primers* informados por Sujiwattanarat et al. [281] de *Crocodylus siamensis*.

El gen de referencia seleccionado fue validado para *C. latirostris* en el trabajo de Paravani et al. [286]. A su vez, este gen fue utilizado previamente en otros trabajos con cocodrilianos [287], [281], [288].

Tabla 4. Información de genes estudiados y *primers* utilizados.

| Genes | Forward (F) y Reverse (R) Secuencia del <i>primer</i> (5'–3') | Tamaño del amplicon (pb) | Contenido GC% | T _m (°C) |
|---|--|-----------------------------|--------------------|---------------------|
| Gen de referencia | | | | |
| <i>β -actina</i> | F: TCACGAGACCACTTTCAACTC R: AGGGCTGTGATTTCTTCTG | 138 | F: 47.62 R: 50 | 59.4 58.4 |
| Genes involucrados en sistema antioxidante | | | | |
| <i>sod</i> | F: GATGAGAGGCATGTTGGAG R: CCACCATGGTACGTCCA | 124 | F: 52.6 R: 58.8 | 60.9 61.6 |
| <i>cat</i> | F: TGAGCCTAGCCCTGATAAAATG R: CTCTGATAGTTAGCGACACGAG | 135 | F: 45.45 R: 50 | 60.3 62.3 |
| Genes involucrados en los procesos de biotransformación | | | | |
| <i>gst</i> | F: GGCAAGGCCATTCCACAAAG R: CTACAACCCCTCGGTTTAC | 838 | F:55 R:60 | 60.5 62.5 |
| <i>p450</i> | F: GGAATAAAAGCTCCTGCC R: CCAACATGGCTAAATGCTGGC | 674 | F:55 R:55 | 60.5 60.5 |
| Genes reguladores del ciclo celular | | | | |
| <i>bcl2</i> | F: TGCTTATTTGTACCGGGCGT R: GCCCCAACATTGTGGGTATG | 842 | F:50 R:55 | 58.4 60.5 |
| <i>bax</i> | F: ACATCCTGCTCAAGGGGTTT R: ATCCAGACCAAAACATGCTCG | 406 | F:55 R:47.62 | 60.5 59.4 |
| Genes relacionados con el sistema de reparación del daño | | | | |
| <i>p53</i> | F: GCCCAATCCTGGCTATCCTC R: GGATTCGGGACTCGCTTCTT | 217 | F:60 R:60 | 62.5 60.5 |

T_m: Temperatura de melting

5.1.4 Identificación de los genes mediante PCR convencional

La reacción de PCR se llevó a cabo de la siguiente manera: 2.5 µL de buffer *EasyTaq* (con Mg²⁺), 0.5 µL de ADN polimerasa *EasyTaq*, 2 µL de dNTPS (2.5 uM), 1 µL de *forward* (10 uM), 1 µL de *reverse* (10 uM), 2 µL de ADNc y 16 µL de H₂O, con un volumen final de 25 µl. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización durante 3 min a 95 °C; 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 57 °C y 90 s a 72 °C, y una extensión final a 72 °C durante 30 min. Para detectar la presencia de productos de PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con TAE (Tris-acetato-EDTA), utilizando como referencia un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Plus DNA - TransGen Biotech).

5.2 Ensayos experimentales *in vivo*

Esta sección se relaciona principalmente con los objetivos específicos 1, 2 y 4 de esta Tesis Doctoral.

5.2.1 Colecta de huevos de *C. latirostris*

Los huevos de *C. latirostris* fueron cosechados en la Reserva Natural Provincial Manejada “El Fisco” (30° 15' S; 60° 50' W, Dpto. San Cristóbal, Santa Fe; Figura 17). Esta reserva es un Área Natural Protegida (Ley Provincial 12.930, 2008) situada a más de 20 km de cualquier actividad agrícola que implique aplicación de plaguicidas u otra actividad contaminante, y es parte de la distribución natural de la especie [267].

La misma ha sido empleada en numerosos estudios previos como área control [271], [254], [255], [272], [274], [256], [276]. Después de la recolección, los huevos fueron transportados según procedimientos de rutina a las instalaciones del Proyecto Yacaré (PY-Laboratorio de Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados, FHUC – UNL/MMA,) situado en la ciudad de Santa Fe, Provincia de Santa Fe.

Una vez allí, se seleccionaron por ovoscopía los huevos viables [289] para llevar a cabo los ensayos experimentales. La incubación artificial se realizó en condiciones controladas de temperatura (31.5 ± 0.5 °C) y humedad (95 %).

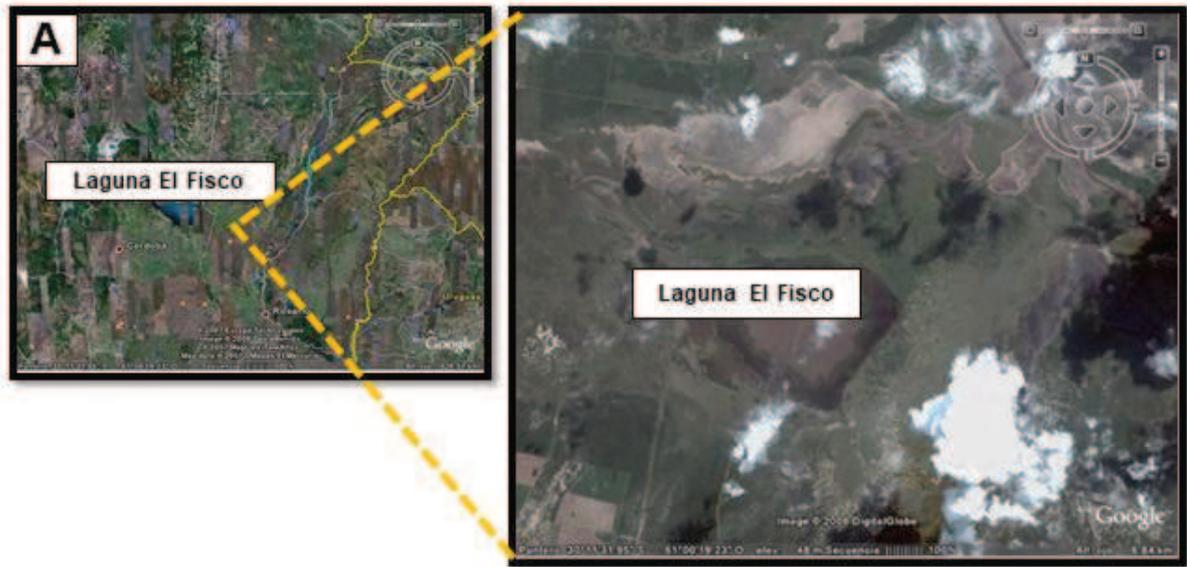


Figura 17. A) Localización de la Reserva Natural Manejada “El Fisco” (Dpto. San Cristobal, Santa Fe, Argentina). **B)** Nido y técnica de rancho.

5.2.2 Evaluación *in vivo* de los efectos de las formulaciones de GLI, CIP y CPF por separado y en mezclas durante el período embrionario y el primer año de vida.

Como hemos visto en la sección de introducción, *C. latirostris* se puede emplear como un indicador biológico para las evaluaciones del efecto deletéreo que inducen los plaguicidas. En nuestra región, el período del año de máxima aplicación de plaguicidas asociado principalmente al cultivo de soja coincide con la temporada reproductiva de esta especie, e implica un riesgo de contaminación particularmente importante durante los primeros meses de vida (Figura 18) [271]. En este sentido, se realizaron dos tipos de ensayos que buscaron simular la situación de exposición real que sucede en el habitat natural de *C. latirostris*:

- 1) Ensayos durante el período embrionario por pulverización sobre el material del nido.
- 2) Ensayos de exposición durante el primer año de vida en neonatos y juveniles (7-8 meses de edad), bajo condiciones semi-controladas.

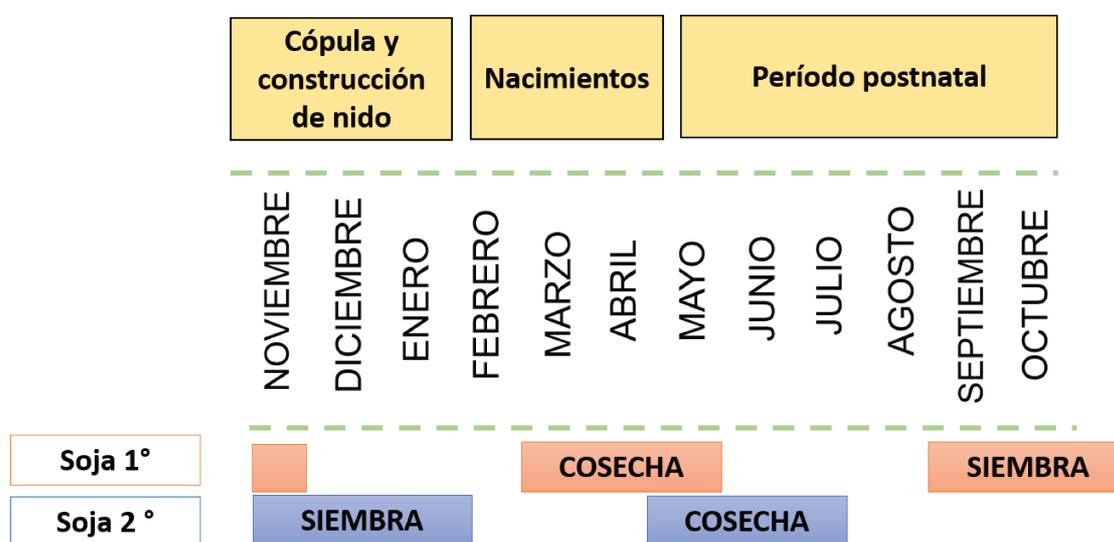


Figura 18. Representación esquemática de la relación entre las fechas de siembra-cosecha de soja y el período embrionario, peri y posnatal de *C. latirostris*.

5.2.2.1 Ensayos de exposición embrionaria por pulverización sobre el material del nido

Se realizaron dos experimentos en dos años consecutivos durante el desarrollo embrionario de *C. latirostris*.

La exposición embrionaria se llevó a cabo con las formulaciones de GLI, CIP y CPF por separado y sus mezclas mediante pulverización sobre el material del nido en contacto con los huevos. Las concentraciones utilizadas en ambos experimentos fueron las recomendadas para su aplicación a campo en cultivos de soja y un 50% de las mismas.

5.2.2.1.1 Diseño experimental y tratamientos

Se realizaron dos experimentos (Experimento 1 y Experimento 2) con el objetivo de evaluar la reproducibilidad de los resultados.

En el experimento 1 (E1) se utilizaron ciento veinte huevos de tres nidos diferentes (40 huevos por nido) distribuidos equitativamente en diez grupos experimentales con dos réplicas de 6 huevos cada uno (Tabla 5).

En el experimento 2 (E2) se emplearon ciento ochenta huevos de cinco nidos (36 huevos por nido) distribuidos equitativamente en doce grupos experimentales con tres réplicas de 5 huevos cada uno (Tabla 5).

Las formulaciones de plaguicidas aplicadas fueron las siguientes:

1. Roundup® Full II (66.2% - GLI), herbicida soluble en agua (12000 mg/L), que contiene sal de potasio GLI [N-(fosfonometil) sal monopotásico de glicina, $C_3H_7KNO_5P$] como ingrediente activo (a.i.) (CAS N° 70901-12-1) [43].
2. Cipermetrina Atanor® (25% - CIP), una mezcla insoluble en agua (0.01 mg/L) de diferentes isómeros de cipermetrina ($C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$), (CAS N° 52315-07-8) [43].
3. Clorpirifós Lorsban® (48% - CPF) insecticida insoluble en agua (2 mg/L) (O, O-dietilo O-3, 5, 6-tricloro-2-piridyl fósforo) (CAS N°: 2921-88-2) [43].

Tabla 5. Grupos experimentales correspondientes al experimento 1 y 2 (E1 y E2). Huevos de *C. latirostris* expuestos a formulaciones de plaguicidas a base a GLI, CIP y CPF, y sus mezclas binarias y ternarias al inicio del desarrollo embrionario.

| Tratamiento | Compuesto | Concentración | N° de huevos por replica | | N° de huevos por grupo experimento | |
|-------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------|----|------------------------------------|----|
| | | | E1 | E2 | E1 | E2 |
| CN | Agua destilada | -- | 6 | 5 | 12 | 15 |
| CV | Etanol | 10 % | 6 | 5 | 12 | 15 |
| GLI1 | Roundup® Full II (GLI 66. 2 %) | 2 % | 6 | 5 | 12 | 15 |
| GLI2 | Roundup® Full II (GLI 66. 2 %) | 1 % | 6 | 5 | 12 | 15 |
| CPF1 | Lorsban® (CPF %) | 48 0.8 % | 6 | 5 | 12 | 15 |
| CPF2 | Lorsban® (CPF %) | 48 0.4 % | 6 | 5 | 12 | 15 |
| CIP1 | Atanor® (CIP 25 %) | 0.12 % | 6 | 5 | 12 | 15 |
| CIP2 | Atanor® (CIP 25 %) | 0.06 % | 6 | 5 | 12 | 15 |
| M1 | GLI1 + CIP1 | 2% + 0.12% | - | 5 | - | 15 |
| M2 | CPF1 + CIP1 | 0.8% + 0.12 % | - | 5 | - | 15 |
| M3 | GLI1 + CPF1 | 2% + 0.8 % | - | 5 | - | 15 |
| Mx3.1 | GLI1 + CIP 1+ CPF1 | 2% + 0.12% + 0.8% | 6 | 5 | 12 | 15 |
| Mx3.2 | GLI2 + CIP2 + CPF2 | 1% + 0.06% + 0.4% | 6 | - | 12 | - |

CN: Control negativo; CV: Control de vehículo; GLI1: Formulación de glifosato al 2%; GLI2: Formulación de glifosato al 1%; CPF1: Formulación de clorpirifós al 0.8%; CPF2: Formulación de clorpirifós al 0.4%; CIP1: Formulación de cipermetrina al 0.12%; CIP2: Formulación de cipermetrina al 0.06%; M1: Mezcla GLI1 + CIP1; M2: Mezcla CPF1 + CIP1; M3: Mezcla CPF1 + GLI1; Mx3.1: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones de campo: CIP1 + CPF1 + GLI1; Mx3.2: Mezcla de las tres formulaciones al 50% de las concentraciones de campo: CIP2 + CPF2 + GLI2.

Las concentraciones aplicadas corresponden a las recomendadas para su aplicación en cultivos de soja. Por lo tanto, como se muestra en la tabla 5, en el caso de la formulación basada en GLI - Roundup®, la concentración más alta aplicada fue del 2% (2L de RU en 100L H₂O por Ha. de cultivo), considerando la superficie de la bandeja de incubación (0.034 m²) como el área a fumigar, y aplicando la cantidad correspondiente de plaguicida diluido en la cantidad correspondiente de agua o solución etanólica (10%) según fueran o no solubles en agua, respectivamente.

Se incluyeron dos controles: para los grupos expuestos a las formulaciones GLI (solubles en agua) se usó agua destilada (control negativo–CN), mientras que para CPF, CIP y todas las mezclas ensayadas (insolubles en agua) se usó etanol como control de vehículo (CV).

La exposición de los huevos a los plaguicidas se llevó a cabo en una etapa temprana del desarrollo embrionario (dentro de los 5 días posteriores a la puesta). Se realizó una única aplicación, en la cual se roció (durante 2 min) el material del nido con el contaminante correspondiente mediante un pulverizador (Figura 19).

Utilizamos huevos de diferentes nidos en cada grupo experimental para homogeneizar cualquier efecto asociado al nido de origen, considerando que el efecto de nidada es una de las causas más importantes de variabilidad observada en los cocodrilianos [290], [291].

Cada réplica se colocó en un recipiente de plástico por separado, usando vermiculita (mineral formado por silicatos de hierro o magnesio de los grupos de micas) como sustrato y cubriéndolos con material vegetal similar al material de anidación, libre de cualquier sustancia exógena (Figura 19). Todos los huevos fueron incubados, a una temperatura de 31.5 ± 0.5 °C y 95% de humedad en la incubadora del PY.



Figura 19. Pasos para el armado de los diferentes grupos experimentales (réplicas en cada bandeja) con huevos de *C. latirostris*. **A)** Ovoscopia para determinar la viabilidad; **B)** Llenado de bandejas plásticas con vermiculita; **C)** E1 – Distribución equitativa de los huevos pertenecientes a diferentes nidadas en cada grupo experimental; **D)** Aplicación por pulverización sobre material de nido de las soluciones correspondientes en cada grupo.

Una semana antes de la fecha estimada de eclosión cada huevo fue envuelto en tul para impedir que los animales provenientes de distintos nidos se mezclen en caso de eclosionar al mismo tiempo. Cuando las crías estuvieron listas para nacer, comenzaron a vocalizar dentro de los huevos y fueron retiradas de la incubadora. Si la eclosión no se producía espontáneamente durante las siguientes 24 hs, se procedía a asistirlos en el nacimiento de acuerdo con la técnica descrita por Larriera et al. [267] (Figura 20).



Figura 20. A) Nacimiento de *C. latirostris*; B y C) registro de los parámetros de crecimiento; D) neonato de *C. latirostris* luego de su individualización mediante corte de verticilos caudales.

5.2.2.2 Ensayos de exposición *in vivo* de neonatos y juveniles en condiciones semi-naturales.

En este experimento se evaluó el posible efecto de las formulaciones de GLI, CIP y CPF y sus mezclas sobre neonatos y juveniles de *C. latirostris* en condiciones similares a las que podrían ocurrir en la naturaleza durante el primer año de vida de estos animales.

5.2.2.2.1 Diseño experimental y tratamientos

Se realizaron dos experimentos (Experimento 3 y 4) en iguales condiciones a excepción de la edad de los animales que fue diferente, pero en ambos casos durante el primer año de vida:

Experimento 3 (E3): se utilizaron 100 ejemplares de *C. latirostris* de 7 a 8 meses de edad (juveniles), nacidos de huevos cosechados de cinco nidos diferentes (de más de 20 huevos cada uno) recolectados durante la temporada reproductiva 2016-2017.

Experimento 4 (E4): se utilizaron 100 ejemplares de *C. latirostris* de 20 días de edad nacidos de huevos cosechados de cinco nidos diferentes (de más de 20 huevos cada uno) recolectados durante la temporada reproductiva 2017-2018.

Las cosechas se realizaron en el marco del programa de uso sustentable PY (Gob. Santa Fe -MUPCN).

Después de la eclosión, en ambos experimentales, los animales de cada nido fueron identificados individualmente mediante una combinación de cortes de los verticilos caudales dobles y simples (Figura 21) [292]. Estos animales se mantuvieron bajo condiciones controladas hasta el comienzo del estudio.

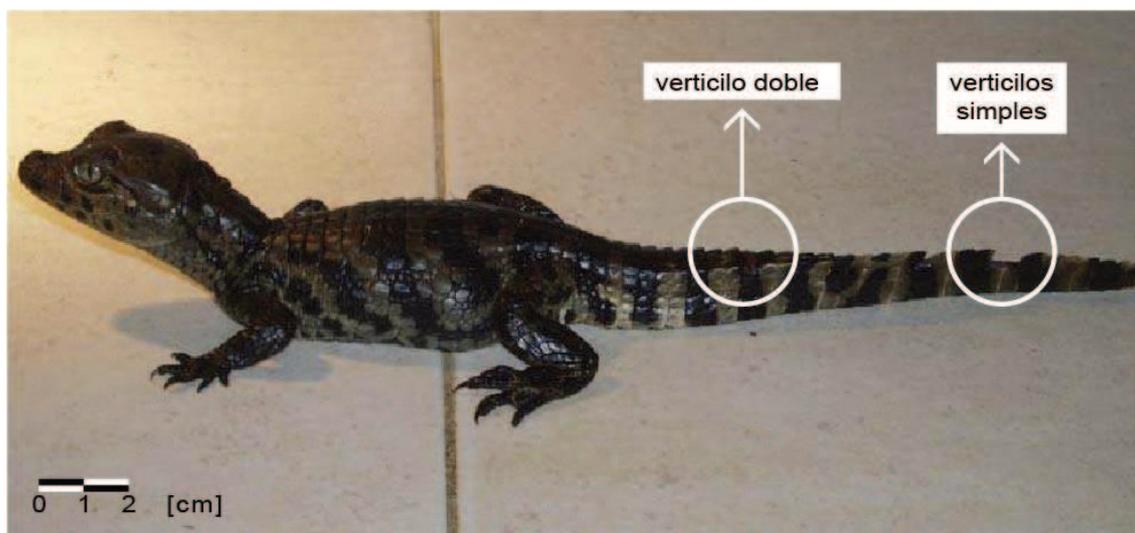


Figura 21. Sistema de marcación por corte de verticilos caudales utilizado para la individualización de los neonatos y juveniles. Barra=1cm.

Los experimentos se llevaron a cabo durante los meses cálidos, con una duración de dos meses y medio. Cada nido se distribuyó equitativamente en 5 recintos, cada uno con 20 animales (n=100) (Tabla 6). Los tratamientos del E3 y E4 fueron los siguientes:

- 1) un CN sin exposición a plaguicidas, rociado con agua potable;
- 2) un grupo expuesto a la formulación de GLI (2%);
- 3) un grupo expuesto a la formulación de CIP (0.12 %);
- 4) un grupo expuesto a la formulación de CPF (0.8%) y
- 5) un grupo expuesto a la mezcla de los tres plaguicidas (CIP+ CPF+ GLI).

Las concentraciones fueron equivalentes a las recomendadas para su aplicación en cultivos de soja, como fue descrito en la sección 5.2.2.1.1.

Tabla 6. Grupos experimentales de *C. latirostris* expuestos a formulaciones de plaguicidas a base de GLI, CIP, CPF, y su mezcla ternaria en juveniles y neonatos evaluados en el experimento 3 y 4 (E3, E4, respectivamente).

| Tratamiento | Compuesto | Concentración | Nº de animales por nido | Nº total de animales por grupo experimental |
|-------------|-------------------------------|----------------|-------------------------|---|
| CN | Agua potable | 100 mL | 4 | 20 |
| GLI | Roundup® Full II (GLI 66.2 %) | 2% | 4 | 20 |
| CPF | Lorsban® (CPF 48 %) | 0.8% | 4 | 20 |
| CIP | Atanor® (CIP 25 %) | 0.12% | 4 | 20 |
| Mx3 | GLI + CIP + CPF | 2%+0.8%+ 0.12% | 4 | 20 |

CN: Control negativo; GLI: Formulación de glifosato al 2%; CPF: formulación de clorpirifós al 0.8%; CIP: Formulación de cipermetrina al 0.12%; Mx3: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones de campo: CIP+ CPF+ GLI.

Los experimentos 3 y 4 se llevaron a cabo en condiciones seminaturales (*ex situ*). Los recintos estuvieron a la intemperie dentro de las instalaciones del PY, separados unos de otros por una distancia suficiente para evitar la contaminación cruzada (más de 50 m). Los recintos presentaron un tamaño aproximado de 4.5 m², cerrados en la parte superior con tejido de trama pequeña para evitar el ingreso de depredadores (Figura 22).

Cada recinto contó con un cuerpo de agua artificial, un comedero, un bebedero y una cubierta para generar sombra. Durante todo el experimento, los animales fueron alimentados cada 2 días con una mezcla que consiste en 50% de cabeza de pollo molida y 50% de pellets secos para reptiles [267], suministrados *ad libitum*. El agua fue renovada y rellenada todos los días.

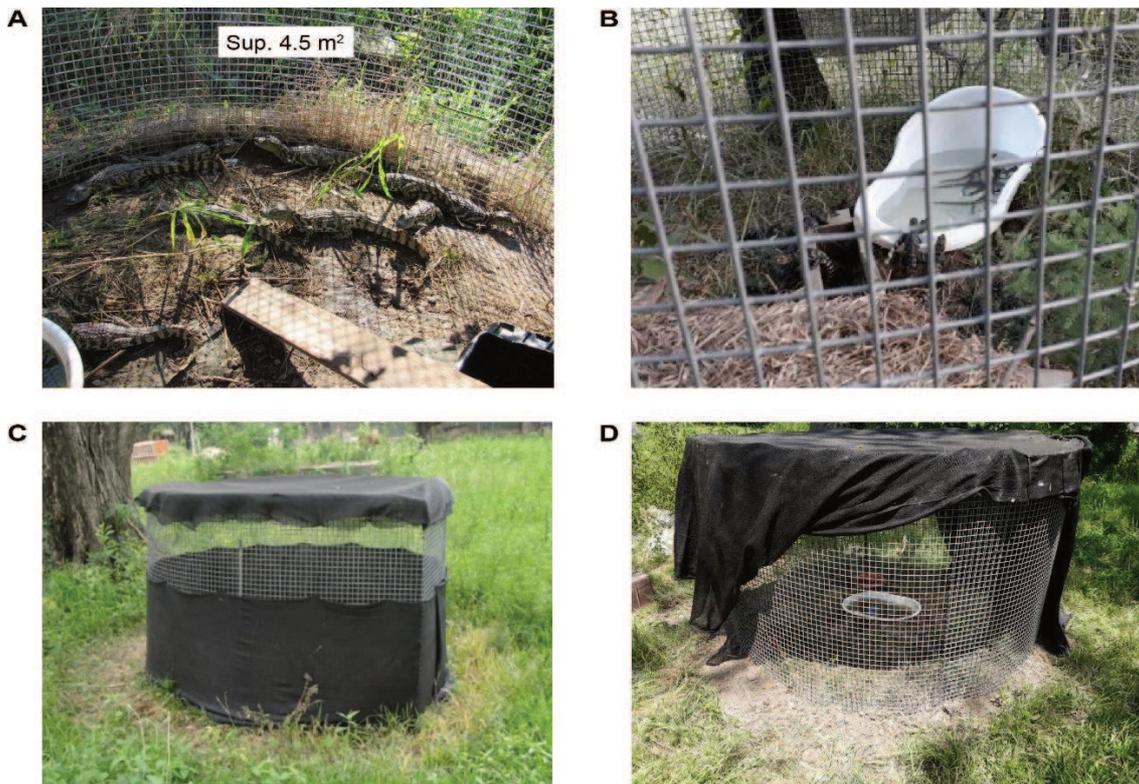


Figura 22. **A)** Ejemplares juveniles; **B)** Ejemplares recién nacidos; **C)** Recinto a la intemperie. Se puede observar el efecto de la aplicación del herbicida por fuera del recinto y **D)** Recinto con bebedero y cubierta parcial para generar sombra.

El E3 se llevó a cabo durante los meses de octubre-diciembre mientras que el E4 se realizó en febrero-abril, coincidiendo en ambos casos con el momento de máxima aplicación de plaguicidas en cultivos de soja de primera y segunda en nuestra región, respectivamente.

Todos los caimanes se aclimataron durante 10 días en cada recinto en condiciones naturales de temperatura, régimen de lluvia, humedad y fotoperíodo.

Después de aclimatarse e inmediatamente antes de la pulverización con los plaguicidas, los animales fueron retirados de los recintos para evitar la pulverización directa sobre ellos, y se los colocó nuevamente 24 h más tarde (Figura 23). El grupo de control también se retiró para mantener las mismas condiciones en todos los grupos. Se realizaron dos aplicaciones mediante un pulverizador manual, rociando toda la superficie del recinto desde una altura de 60 cm. El GLI, que es un herbicida de amplio espectro y no selectivo, se aplica en distintas etapas del ciclo del cultivo, generalmente en la pre-siembra para la desecación de las malezas y después de la nacencia (post-emergencia) para controlar las malezas antes de la cosecha [56]. Los insecticidas, como el CIP o el CPF, suelen aplicarse antes de la floración de la soja o cuando aparece alguna plaga puntual durante el cultivo, en general, por única vez [80], [91].

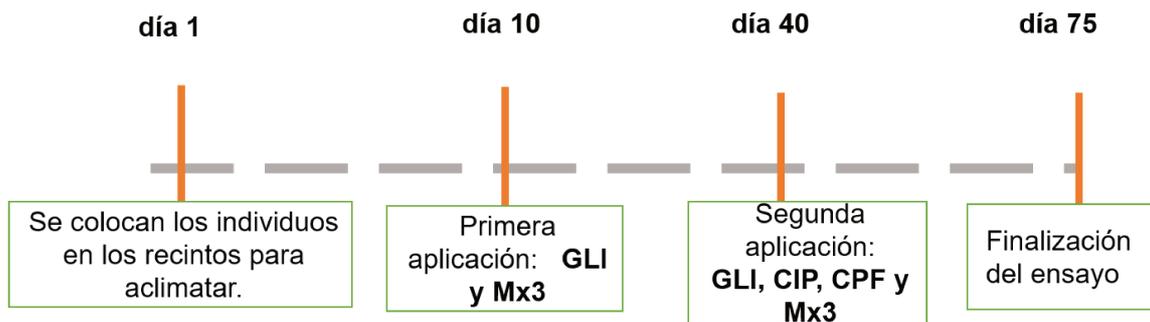


Figura 23. Esquema representativo del cronograma seguido en los experimentos 3 y 4.

5.2.2.3 Variables registradas

5.2.2.3.1 Análisis de los plaguicidas

En el ensayo de exposición embrionaria por pulverización sobre el material del nido la determinación de GLI se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con derivatización previa a la columna usando cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC-Cl), como está descrito en Poletta et al. [255]. Las determinaciones de CIP y CPF se realizaron por el método de cromatografía de gases (GC-TOF) con un límite de detección de 0.10 µg/L. Las determinaciones se realizaron sobre las soluciones preparadas inmediatamente antes de la aplicación y fueron analizadas en los Laboratorios Fox (Venado Tuerto, Santa Fe, Argentina).

Para el ensayo de exposición en condiciones semi-naturales se recolectaron muestras de suelo y agua de los recintos correspondiente a GLI, CIP y CPF luego de 15 días después de la aplicación de cada formulación de plaguicida. Las muestras fueron analizadas en el laboratorio PRINARC de la Facultad de Ingeniería Química (Universidad Nacional del Litoral). La determinación de GLI y AMPA se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem (UHPLC MS/MS) siguiendo la metodología de Demonte et al. [293]. Las determinaciones de CIP y CPF se llevaron a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa en tándem (GC-MS/MS) según procedimiento de Regaldo et al. [294]. Las metodologías se validaron de acuerdo al documento de orientación de la Comisión Europea sobre el control de calidad analítico y el procedimiento de validación de métodos para residuos de plaguicidas, SANTE / 2017/11813 [295].

5.2.2.3.2 Obtención de la muestra de sangre

En los experimentos 1 y 2 se procedió a la toma de muestras de sangre inmediatamente después de la eclosión, mientras que en los experimentos 3 y 4 las muestras de sangre se tomaron al finalizar el ensayo.

Se tomó un 1 ml de sangre periférica de la vena espinal [283] de cada ejemplar con jeringa heparinizada y aguja TERUMO® 25G x 5/8"- (0.5 mm) para recién nacidos y neonatos de 20 días de edad y aguja TERUMO® 21G x 1 ½"- (5 mL) para los juveniles. Está demostrado que este método no causa daño a los animales, incluso a los recién nacidos, si se realiza con el debido cuidado (Figura 24) [274], [276].

Para la técnica de EC estándar y modificado la sangre fue inmediatamente colocada en un buffer fosfato salino (PBS), en una dilución 1:20 [271], [275].

Para la extracción de ARN, la sangre (300 µl) fue inmediatamente preservada en TRIzol® LS Reagent (1:4, Ambion, Life Technologies), congelada instantáneamente en nitrógeno líquido (LN₂) y luego almacenada a -80° C hasta su posterior análisis [284].

Para las técnicas de evaluación de EO se centrifugaron las muestras de sangre entera y los glóbulos rojos fueron lavados 2 veces con solución fisiológica, lisados mediante agua bidestilada fría (1:5) y luego mantenidos a -20°C hasta su análisis [296], [275].



Figura 24. Extracción de sangre de la vena espinal a un ejemplar recién nacido. Técnica de Myburgh et al., 2014

5.2.2.3.3 Detección del daño al ADN y daño oxidativo al ADN a través del ensayo cometa estándar y modificado con endonucleasas

El EC estándar se llevó a cabo en eritrocitos de *C. latirostris* según el protocolo adaptado para la especie por Poletta et al. [271]. Para discriminar el daño al ADN producido por la oxidación de bases se aplicó la técnica de EC modificado utilizando las endonucleasas fpg y ENDO III, siguiendo el protocolo de Poletta et al. [275] (Figura 25).

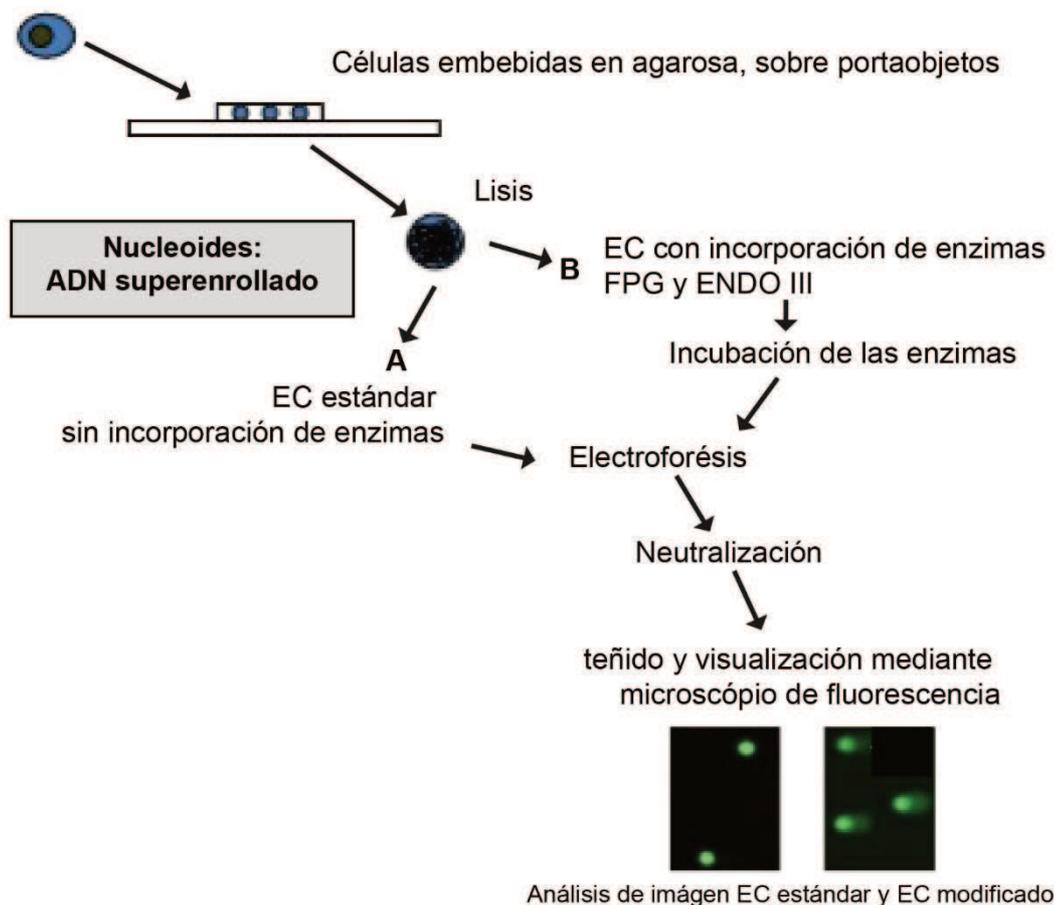


Figura 25. Representación esquemática de la técnica del EC (modificado de Azqueta y Collins, [194]). **A)** EC estándar. **B)** Ensayo cometa modificado.

Todas las muestras fueron codificadas para un análisis a ciegas, los portaobjetos se tiñeron con naranja de acridina y las imágenes se analizaron bajo un microscopio de fluorescencia (Olympus CX 40 equipado con un filtro de excitación U RFLT 50). Las imágenes de 100 nucleoides seleccionados al azar se clasificaron visualmente en cuatro categorías arbitrarias de daño de acuerdo con el tamaño y la intensidad de la cola. Teniendo en cuenta el trabajo de Collins, [205] se calculó el índice de daño en el ADN ($ID = n_1 + 2 n_2 + 3 n_3 + 4 n_4$) para cada animal, donde n es el número de nucleoides

de cada categoría (1 a 4): **1**= daño leve (cola de longitud menor al diámetro del nucleoide); **2**= daño moderado (longitud de la cola mayor al diámetro de un nucleoide pero menor al diámetro de dos); **3**= daño alto (cola de longitud mayor al diámetro de dos nucleoides y menor al de tres) y **4**= daño extremadamente alto (cola de longitud mayor al diámetro de tres nucleoides). El daño oxidativo al ADN se calculó restando las roturas observadas con buffer de aquellas observadas con fpg o ENDO III y se designa como “sitios fpg o ENDO III” de la siguiente manera: sitios fpg/Endo III = ID con fpg/Endo III - ID con buffer [Figura 26].

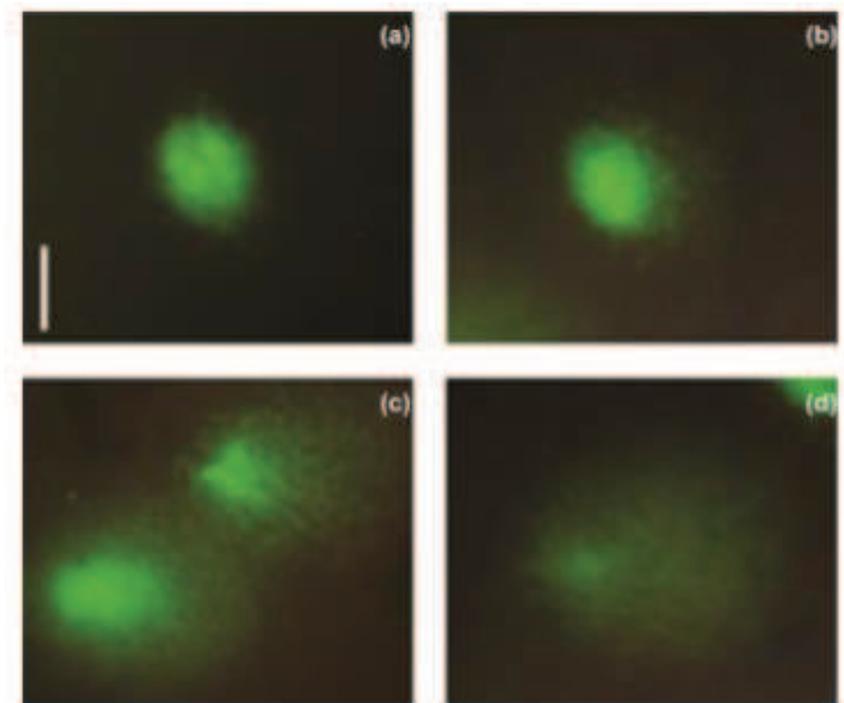


Figura 26. Análisis de imágenes pertenecientes al EC estándar y modificado. Diferentes clases de daño obtenidas de los eritrocitos de sangre periférica de *C. latirostris*: (a) clase 1, (b) clase 2, (c) clase 3 y (d) clase 4. Barra=10 μ m.

5.2.2.3.4 Determinación de los niveles de expresión génica

La determinación de los niveles de expresión a través de qPCR puede verse afectada por varios factores, por lo que es extremadamente importante tener una buena cantidad y calidad de ARN, una síntesis eficiente de ADNc, y un buen diseño de *primers* [297], [298]. Las principales características que deben cumplir los *primers* para poder realizar una qPCR adecuada son las siguientes [299], [300]:

- La longitud del amplicón debe ser pequeña para garantizar la eficiencia de la qPCR. Pueden estar entre 75- 200 pb.
- Tener un contenido de GC del 50-60%.
- No contener estructuras secundarias.
- Tener una temperatura de fusión de 55-65 °C.

En este trabajo de Tesis Doctoral los niveles de expresión génica se determinaron específicamente en el E2 y E4.

En el E2 se determinaron los niveles de expresión en seis muestras en los siguientes grupos experimentales: CN, GLI1, CPF1, CIP1, M1, M2, M3 y Mx3.1, es decir no se incluyeron los grupos expuestos al 50% de las concentraciones de campo.

En el E4 los niveles de expresión se determinaron en seis muestras de cada uno de los grupos experimentales incluidos en el ensayo.

Los *primers* utilizados en los experimentos fueron β -*actina*, *cat* y *sod* cuyas características se especificaron en la sección 5.1.3. Los mismos se diseñaron específicamente para qPCR.

Para cada par de *primers* y en cada ensayo se realizaron las correspondientes curvas de calibrado. Para ello, un conjunto de muestras de ADNc constituido por muestras representativas de todos los tratamientos se diluyó en 5 preparaciones en base 10. Las técnicas de extracción de ARN y síntesis del ADNc fueron descritas en la sección 5.1.2.

Una vez establecida la concentración de ADNc a utilizar, cada muestra se procesó por triplicado bajo las siguientes condiciones: 4 μ L 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus, 14 μ L H₂O para PCR, 0.5 μ L de cada uno de los *primers* (*forward* y *reverse*: 10 μ M), y 1 μ L de molde de ADNc. El programa utilizado fue el siguiente: 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 s, 57 °C durante 20 s, 72 °C durante 20 s, 77 °C durante 10 s, y finalmente, 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min y 95 °C durante 15 s. Se utilizó el equipo StepOne™- 48 PCR en tiempo real Sistema (Applied Biosystem™).

5.2.2.3.5 Determinación del daño oxidativo a lípidos

Se utilizó el método de TBARS de Buege and Aust [301] y adaptado para su aplicación en sangre de *C. latirostris* [275]. Esta técnica mide la formación del color producido durante la reacción del ácido tiobarbitúrico con malondialdehído, principal producto de la peroxidación lipídica.

La absorbancia de la muestra se determinó por espectrofotómetro a 535 nm, la concentración de TBARS fue calculada usando el coeficiente de extinción: $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y referenciada a la cantidad de proteína de la muestra.

5.2.2.3.6 Actividad de Catalasa (CAT)

Se aplicó el método descrito por Aebi [302] y adaptado para la especie en sangre por Poletta et al. [275] que mide la disminución de H_2O_2 a 240 nm, a 25 °C durante 60 s. en un espectrofotómetro.

Se considera que una unidad de CAT es equivalente a la cantidad de proteína necesaria para descomponer $1\mu\text{M}$ de H_2O_2 por minuto bajo condiciones específicas. La actividad específica de CAT fue referenciada a la cantidad de proteína de la muestra.

5.2.2.3.7 Actividad de Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de SOD se determinó utilizando el kit comercial 19160⁻¹KT (SIGMA) que emplea una sal de tretrazolio altamente soluble en agua, que al reducirse con O_2^- produce un colorante formazán. La tasa de reducción con O_2^- , está relacionada linealmente con la actividad de la xantina oxidasa y es inhibida por SOD. Ya que la absorbancia a 440 nm es proporcional a la cantidad de anión superóxido, la actividad de SOD, como una actividad inhibitoria, se cuantifica por la disminución del color a 440 nm [275].

5.2.2.3.8 Determinación de proteínas

La actividad específica de CAT y la concentración de TBARS se referenciaron a la cantidad de proteína en la muestra, determinada con el kit comercial 1690007 Proti U/LCR (Wiener Lab, Rosario, Argentina).

5.2.2.3.9 Parámetros de crecimiento

Se evaluaron los siguientes parámetros de crecimiento en todos los animales:

- Peso: los recién nacidos (E1 y E2) y neonatos de 20 días de edad (E4) se pesaron mediante una balanza OHAUS® Compact scale CS200, precisión 0.1 g. Los juveniles (E3) se pesaron mediante una balanza Electronic Compact Scale, TH 5000, precisión 0.1 g).
- Se midieron en longitud total (TL) y en longitud hocico - cloaca (LHC) (cinta métrica, precisión 0.1 cm).

En los experimentos 1 y 2, las variables de crecimiento se registraron una vez nacidos los neonatos.

En los experimentos 3 y 4 se registraron antes y después de la exposición para evaluar los efectos de los plaguicidas en el crecimiento de los animales durante este período (valor final - valor inicial).

5.2.2.4 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron a través del software SPSS versión 22.0. [303].

5.2.2.4.1 Ensayo de exposición embrionaria por pulverización sobre el material del nido.

Las réplicas se compararon para todas las variables utilizando la prueba t de Student en el E1 y el ANOVA de una vía en el E2. Como no hubo diferencias significativas entre las réplicas en ninguno de los dos experimentos, todos los análisis se realizaron considerando los grupos experimentales como variable de agrupación.

Para todos los parámetros analizados, se calcularon los valores de la media \pm el error estándar (EE) a partir de los datos de todos los neonatos de cada grupo experimental, en los dos experimentos (E1 y E2).

Los mismos fueron evaluados en normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza entre los grupos fue verificada mediante el test de Levene.

Se utilizó ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey para las comparaciones de SOD, EC, sitios fpg y ENDO III en el E1, así como el peso, LT, LHC, CAT y TBARS en el E2.

Los datos no paramétricos fueron analizados mediante el test de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney para los valores de LT, LHC, peso, TBARS y CAT en el E1; y EC, sitios fpg y ENDO III y la expresión génica de *sod* y *cat* en el E2.

Los grupos control (CN y CV) se compararon entre sí para todas las variables. Luego cada grupo expuesto se comparó con su control correspondiente: CN para los grupos expuestos a las formulaciones GLI y CV (etanol) para los demás grupos.

Del mismo modo, las dos concentraciones aplicadas para cada compuesto se compararon entre sí. A su vez, se realizaron comparaciones de todas las mezclas con los compuestos individuales que las constituyen.

Los valores se consideraron estadísticamente significativos con un $p \leq 0.05$.

5.2.2.4.2 Ensayos de exposición *in vivo* de neonatos y juveniles en condiciones semi-naturales.

Para todos los parámetros analizados, los datos se presentaron con los valores de la media \pm el EE, calculados a partir de todos los animales de cada grupo experimental.

Los datos fueron evaluados en normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza entre los grupos fue verificada mediante el test de Levene.

Se utilizó ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey, para las comparaciones de peso, LT, TBARS, CAT y SOD en el E3, así como TBARS, CAT, SOD, ID y sitios ENDO III y fpg en el E4.

En el caso de los datos no paramétricos, se utilizó la prueba de Mann-Whitney para los sitios fpg y ENDO III, ID y LHC del E3 y en el E4 para las comparaciones de LT, peso y la expresión de los genes *sod* y *cat*.

Para todas las variables, los grupos expuestos se compararon con el CN. También se comparó la mezcla con los tres componentes individuales que la constituyen.

Los valores se consideraron estadísticamente significativos con un $p \leq 0.05$.

6. Resultados

6.1 Identificación de genes de interés por PCR convencional

6.1.1 Gen de referencia (β -actina) y genes relacionados con vías de defensa antioxidante (*cat* y *sod*)

En una primera etapa se procedió a identificar y validar los genes β -actina, *cat* y *sod* en 8 crías de *C. latirostris* para luego analizar los niveles de expresión en los animales bajo las condiciones de experimentación descritas en la sección 5.2.

La concentración media de ARN en sangre después del tratamiento con ADNsa fue de $87.23 \text{ ng } /\mu\text{l} \pm 6.02$ (media \pm EE). La relación de densidad óptica de A260-280 nm medida con un espectrofotómetro Nanodrop fue de 1.89 ± 0.06 (media A260/280 nm \pm EE). La integridad del ARN se evaluó mediante un gel de agarosa con el buffer de electroforesis TAE, lo que indica dos bandas bien definidas correspondientes al ARNr (28s y 18s; Figura 27).

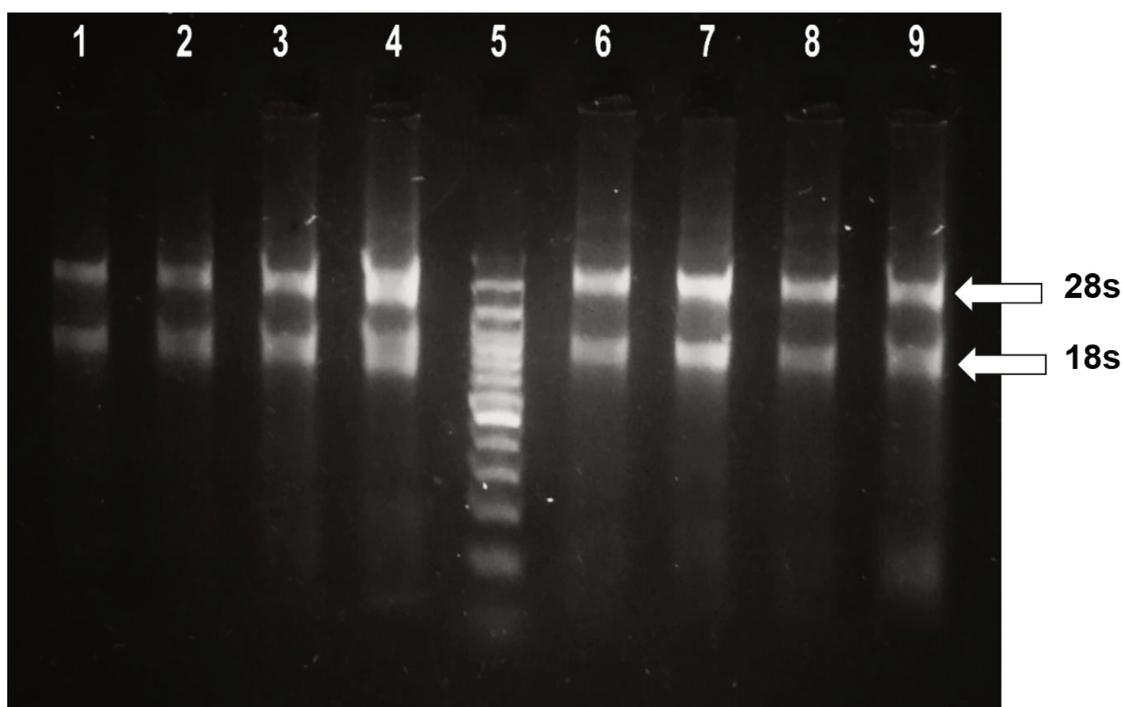


Figura 27. Gel de agarosa al 2% con TAE 1x que muestra la extracción de ARN obtenida de sangre de 8 crías de *C. latirostris*, a partir del protocolo adaptado para la especie. Calles: 1–4 y 6–9: extracción de ARN de sangre de distintos animales; Calle 5: marcador de tamaño molecular de 100 pb (Plus DNA - TransGen Biotech).

Se procedió a la identificación de los *de los genes* β -actina, sod y cat a través de una PCR convencional. Los productos de PCR fueron sembrados en un gel de agarosa convencional para verificar la presencia de los genes y la efectividad de los primers diseñados, antes de ser utilizados en la técnica qPCR (Figura 28).

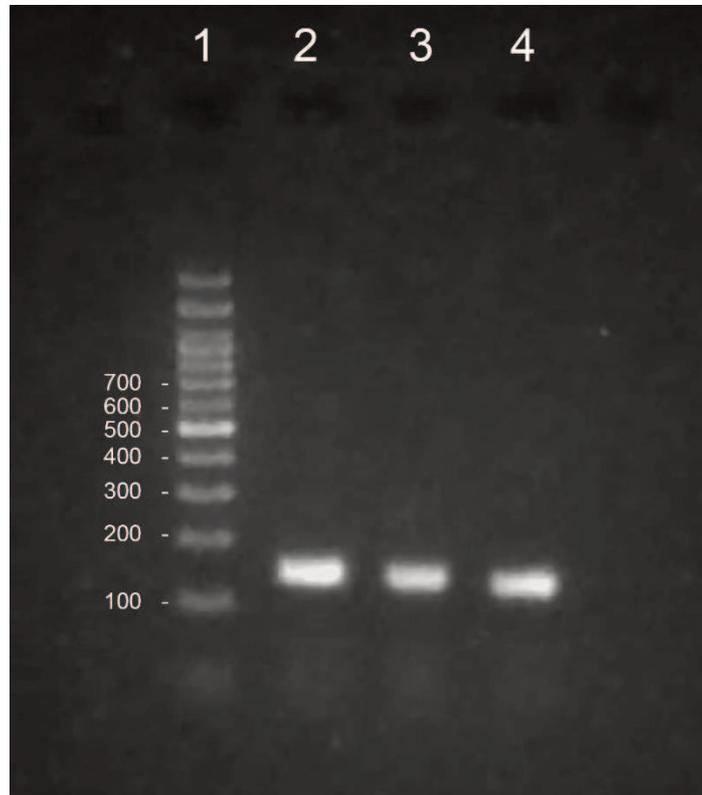


Figura 28. Gel de agarosa (2%) con TAE 1x que muestra los productos de PCR específicos para cada gen. Calle 1: marcador de tamaño molecular de 100 pb (Plus DNA - TransGen Biotech); calle 2: β -actina - 138 pb; calle 3: cat - 135 pb calle 4: sod- 124 pb.

6.1.2 Genes relacionados con sistemas de reparación del daño (*p53*), biotransformación (*p450* y *gst*) y reguladores del ciclo celular (*bcl₂* y *bax*)

Se llevó a cabo la visualización de los genes *gst*, *bcl₂*, *bax*, *p53* y *p450* a través de una electroforesis en gel de agarosa al 2% con TAE. En el mismo se determinó la presencia de todos los genes mencionados (Figura 29)].

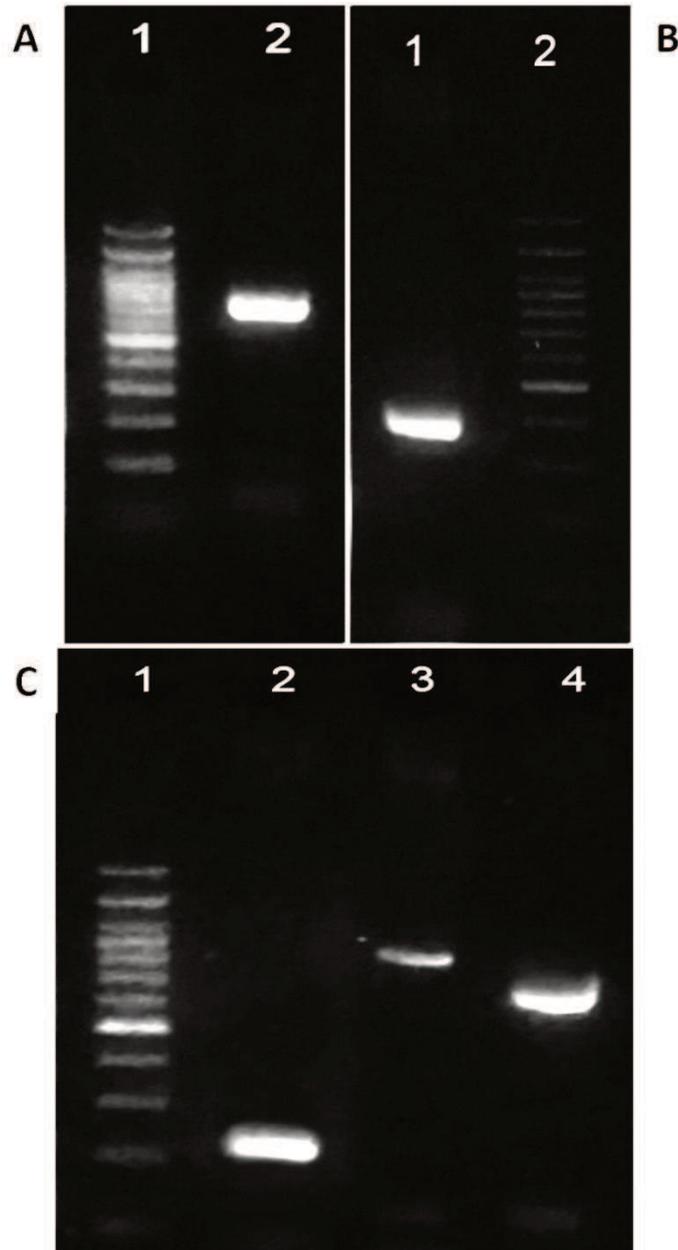


Figura 29. Gel de agarosa (2%) con TAE 1x que muestra el producto de PCR específico para los siguientes genes: **A)** Calle 1: marcador de tamaño molecular de 100 pb (Plus DNA - TransGen Biotech); calle 2: *gst*– 838 pb; **B)** Calle 1: *bax* – 406 pb; Calle 2: marcador de tamaño molecular de 100 pb (Plus DNA - TransGen Biotech); **C)** Calle 1: marcador de tamaño molecular de 100 pb (Plus DNA - TransGen Biotech); calle 2: *p53* – 217 pb; calle 3: *bcl₂* – 842 pb; Calle 4: *p450*- 674 pb.

6.2 Ensayo de exposición embrionaria por pulverización sobre el material del nido.

6.2.1 Análisis de los plaguicidas

Los resultados obtenidos de las determinaciones analíticas de plaguicidas se presentan en la Tabla 7, como % de recuperación según la concentración informada para el p.a. en el marbete del producto.

Tabla 7. Determinación analítica de glifosato, clorpirifós y cipermetrina.

| Plaguicida | Método | % de recuperación |
|------------|--------------|-------------------|
| GLI | HPLC-FMOC-Cl | 97% |
| CPF | GC-TOF | 89% |
| CIP | GC-TOF | 95% |

HPLC-FMOC-Cl: Cromatografía líquida de alto rendimiento con derivatización previa a la columna utilizando cloroformiato de 9-fluorenilmetilo. GC-TOF: Método de cromatografía de gases-tiempo de vuelo. Porcentajes de recuperación en relación con el porcentaje del principio activo indicado en la fórmula.

6.2.2 Detección del daño al ADN y daño oxidativo al ADN a través del ensayo cometa estándar y modificado con endonucleasas

La figura 30 muestra los resultados de la EC estándar (media \pm EE).

En el E1 se observó un aumento significativo en el índice de daño al ADN para todos los grupos con respecto a sus controles correspondientes ($p < 0.05$, ANOVA-Tukey, Figura 30A).

En el E2 se observó un resultado similar, excepto en el caso de CPF2 y CIP2, respecto al CV ($p < 0.05$, prueba de Mann Whitney, Figura 30B).

Cuando se analizaron las diferentes concentraciones de los mismos compuestos (1 versus 2), encontramos diferencias significativas para GLI en ambos experimentos (E1 < 0.0001 , ANOVA-Tukey; E2: $p = 0.02$, prueba de Mann Whitney, Figura 30A y B) y para CIP sólo en E2, con mayor daño en la concentración más alta ($p = 0.0122$, prueba de Mann Whitney, Figura 30B).

Cuando se compararon las mezclas con sus componentes individuales, encontramos un daño significativo en el ADN en la Mx3.1 en comparación con CPF1 y CIP1 ($p < 0.0001$, prueba de Tukey, Figura 30A) en el E1. Sin embargo, en el E2 no observamos diferencias entre las mezclas y los componentes individuales de las mismas. A su vez, cuando en el E2 se comparó cada una de las mezclas binarias con la mezcla ternaria (Mx3.1) se encontraron diferencia significativa entre Mx3.1 y M2 ($p = 0.043$, prueba de Mann-Whitney, Figura 30B).

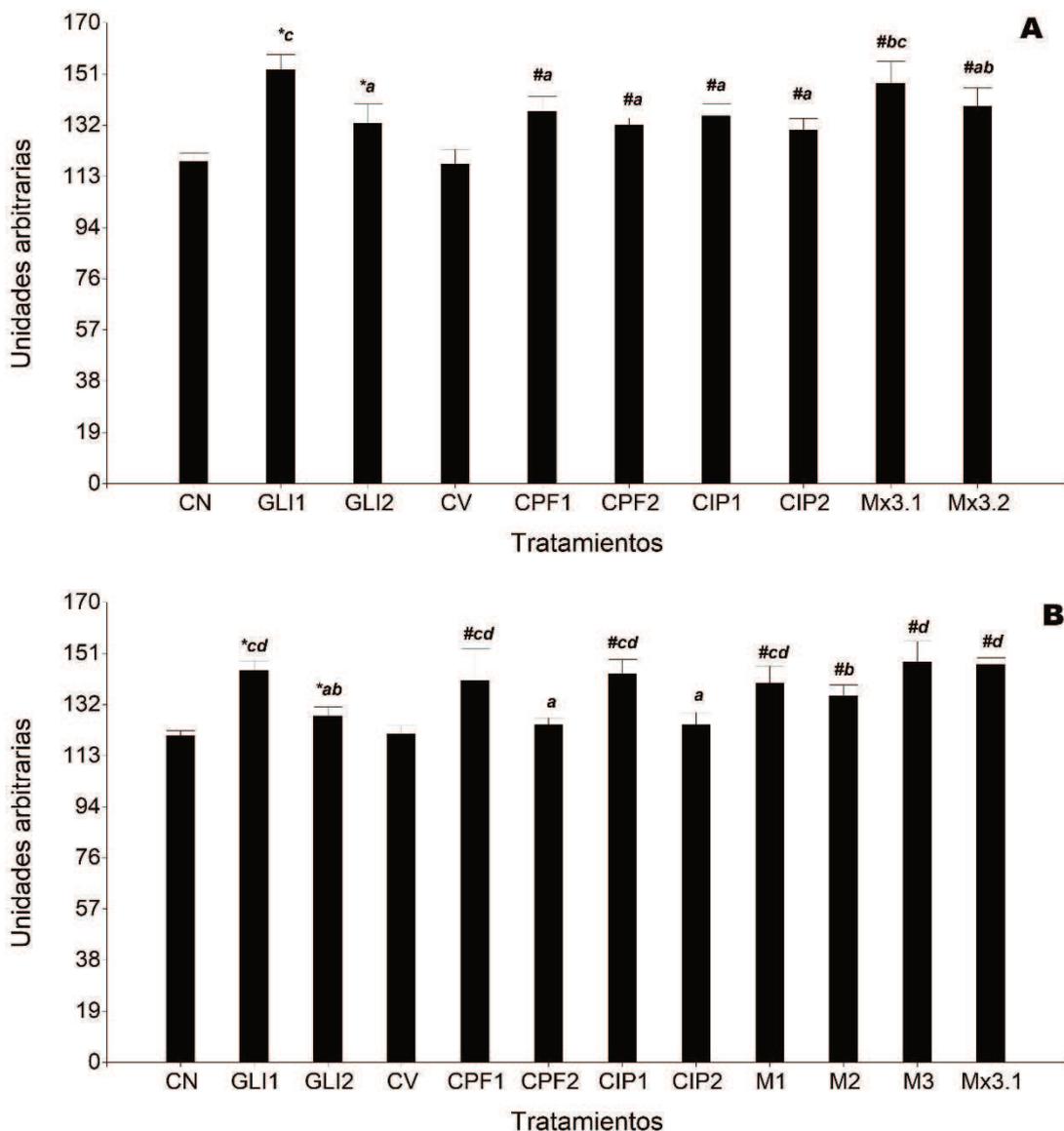


Figura 30. Índice de daño del ADN en crías de *C. latirostris* con diferentes tratamientos. Experimento 1 (A) y 2 (B). CN: Control negativo; CV: Control del vehículo; GLI1: Formulación de glifosato al 2%; GLI2: Formulación de glifosato al 1%; CPF1: Formulación de clorpirifós al 0.8%; CPF2: Formulación de clorpirifós al 0.4%; CIP1: Formulación de cipermetrina al 0.12%; CIP2: Formulación de cipermetrina al 0.06%; M1: mezcla GLI1 + CIP1; M2: mezcla CPF1 + CIP1; M3: Mezcla CPF1 + GLI1; Mx3.1: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones de campo: CIP1 + CPF1 + GLI1; Mx3.2: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones al medio de las recomendadas a campo: CIP2 + CPF2 + GLI2.

* $p < 0.05$ estadísticamente significativo en comparación con CN.

$p < 0.05$ estadísticamente significativo en comparación con CV.

La ausencia de letras en común (a, b, c y d) indica diferencias significativas con $p \leq 0.05$ (test de Tukey – E1- y Mann-Whitney – E2-) entre: 1) las mezclas ternarias y sus componentes individuales constituyentes (A y B); 2) las dos concentraciones aplicadas para cada plaguicida por separado (A y B); 3) las mezclas binarias (M1, M2 y M3) y sus componentes individuales constituyentes (B); 4) la mezcla ternaria y las mezclas binarias (B)

La figura 31 muestra los resultados observados en el EC modificado (media \pm EE). En el E1 los sitios fpg y ENDO III fueron significativamente mayores en todos los grupos expuestos con respecto al CN y el CV ($p < 0.0001$, prueba de Tukey, Figura 31A).

En el E2, la oxidación de purinas y pirimidinas fue significativamente mayor en GLI1 en comparación con el CN ($p = 0.0159$ y $p = 0.0259$, respectivamente) y en CPF1, CIP1, M1, M2, M3 y Mx3.1 con respecto al CV ($p < 0.05$, prueba de Mann-Whitney, Figura 31B).

En relación con las mezclas, en el E1 observamos diferencias significativas solo en los sitios ENDO III entre Mx3.1 con GLI1 y CPF1, mostrando los componentes individuales, mayor daño que la mezcla ($p < 0.0001$, prueba de Tukey, Figura 31A).

En el E2 los sitios fpg fueron significativamente más altos en Mx3.1 que en CPF1 y CIP1 ($p = 0.0081$ y $p = 0.0122$, respectivamente), pero no hubo diferencias con GLI1 ($p > 0.05$, prueba de Mann-Whitney, Figura 31B). En las mezclas binarias, GLI1 mostró un daño significativamente mayor que M1 ($p = 0.0081$) y M3 ($p = 0.0472$), y lo mismo se observó entre CIP y M1 ($p = 0.0137$); mientras que CPF1 causó un daño menor que M3 ($p = 0.0106$, prueba de Mann-Whitney, Figura 31B). En el caso de ENDO III, M2 causó un daño significativamente menor que sus componentes constituyentes: CIP y CPF1 ($p = 0.0118$ y $p = 0.0101$, prueba de Mann-Whitney, Figura 31B).

Considerando las dos concentraciones aplicadas de cada compuesto individual, se encontraron diferencias para los tres compuestos en ENDO III y para los sitios fpg en GLI1 y CPF1 en el E1 ($p < 0.0001$, prueba de Tukey, Figura 31A); mientras que en el E2 los tres compuestos (GLI1, CIP1 y CPF1) mostraron diferencias tanto en los sitios fpg ($p < 0.0137$, prueba de Mann-Whitney, Figura 31B) como ENDO III ($p < 0.0122$; prueba de Mann-Whitney, Figura 31B), siendo el daño siempre mayor a la concentración más alta. A su vez en el E2, particularmente en fpg se encontró diferencia significativa entre las tres mezclas binarias (M1, M2 y M3) y la Mx3.1, siendo el daño mayor en la mezcla de las tres formulaciones ($p < 0.0079$, prueba de Mann-Whitney, Figura 31B).

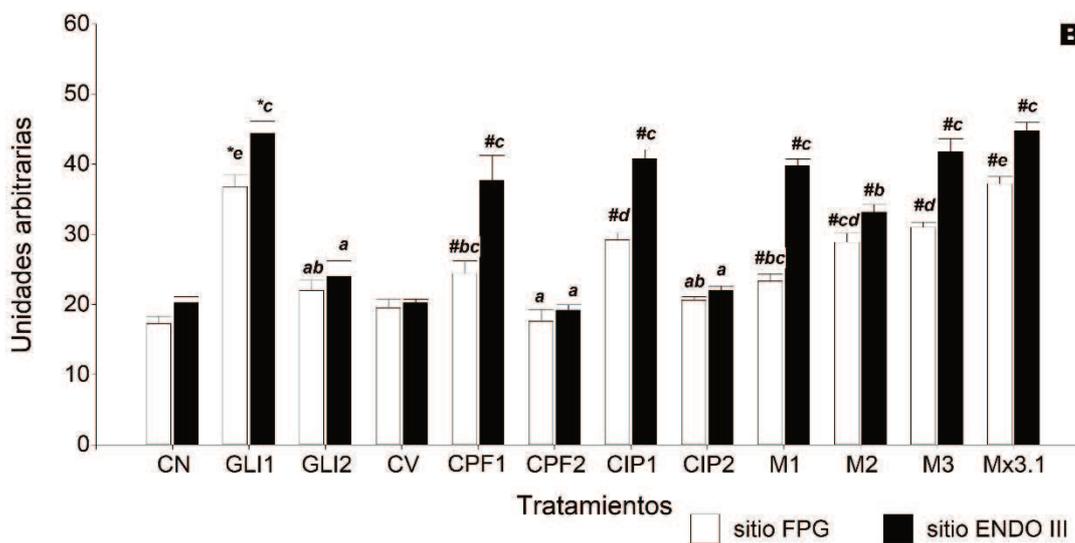
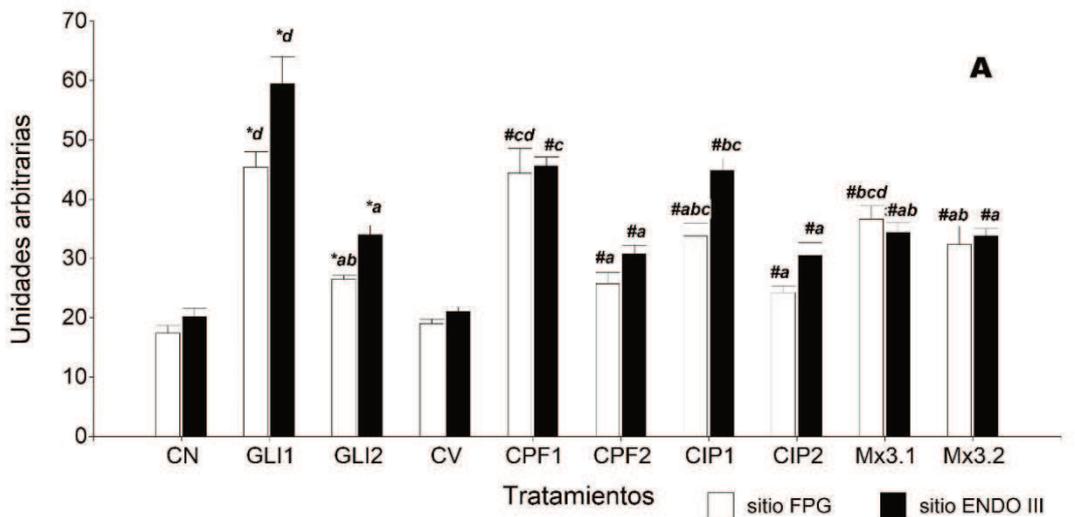


Figura 31. Daño oxidativo del ADN detectado mediante el ensayo del cometa modificado en crías de *C. latrostris* en diferentes tratamientos. Experimento 1 (A) y 2 (B). CN: Control negativo; CV: Control del vehículo; GLI1: Formulación de glifosato al 2%; GLI2: Formulación de glifosato al 1%; CPF1: Formulación de clorpirifós al 0.8%; CPF2: Formulación de clorpirifós al 0.4%; CIP1: Formulación de cipermetrina al 0,12%; CIP2: Formulación de cipermetrina al 0.06%; M1: Mezcla GLI1 + CIP1; M2: Mezcla CPF1 + CIP1; M3: Mezcla CPF1 + GLI1; Mx3.1: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones de campo: CIP1 + CPF1 + GLI1; Mx3.2: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones al medio de las recomendadas a campo: CIP2 + CPF2 + GLI2. * p < 0.05 estadísticamente significativo en comparación con CN. # p < 0.05 estadísticamente significativo en comparación con CV. La ausencia de letras compartidas (a, b, c, d y e) indica diferencia significativa con p ≤ 0.05 (test de Tukey – E1- y Mann-Whitney – E2-) entre: 1) las mezclas ternarias y sus componentes individuales constituyentes (A y B); 2) las dos concentraciones aplicadas para cada plaguicida por separado (A y B); 3) las mezclas binarias (M1, M2 y M3) y sus componentes individuales constituyentes (B); 4) la mezcla ternaria y las mezclas binarias (B)

6.2.2.1 Determinación de los niveles de expresión de los genes β -actina, sod y cat mediante la técnica de qPCR

En el E2 se cuantificaron los niveles de expresión de los genes *sod*, *cat* y β -actina mediante la técnica de qPCR.

La concentración media de ARN extraída de sangre de todas las muestras después del tratamiento con ADNsa fue de 86.91 ng/ μ l \pm 4.52 (media \pm EE). La relación de densidad óptica media de A260-280 nm medida con un espectrofotómetro Nanodrop fue de 1.92 \pm 0.03 (media \pm EE).

La Tabla 8 muestra las eficiencias de las reacciones de qPCR para este estudio. Los porcentajes de eficiencia de los genes oscilaron entre 96% y 103%, el coeficiente de correlación lineal (R^2) varió de 0.996 a 0.999 y la pendiente entre -3.256 y -3.399.

Tabla 8. Eficiencia de las reacciones de qPCR para β -actina, *sod* y *cat* en ejemplares de *C. latirostris* del E2.

| Genes | Curva de eficiencia de amplificación (%) | R^2 | Pendiente |
|--|--|-------|-----------|
| Gen de referencia | | | |
| <i>β-actina</i> | 102.83 | 0.999 | -3.256 |
| Genes involucrados en el sistema antioxidante | | | |
| <i>sod</i> | 96.86 | 0.999 | -3.999 |
| <i>cat</i> | 101.53 | 0.996 | - 3.28 |

Los niveles de expresión se determinaron en los siguientes grupos experimentales: CN, GLI1, CPF1, CIP1, M1, M2, M3 y Mx3.1.

La Figura 32 muestra los niveles de expresión de los genes *sod* y *cat*. Los resultados obtenidos muestran que la expresión génica de *sod* y *cat* fue significativamente más baja en M3 en relación al CV ($p=0.0357$ y $p=0.0357$, respectivamente prueba de Mann Whitney, Figura 32) y lo mismo se observó para *sod* en M1 y M2 ($p=0.0357$ y $p=0.0286$, prueba de Mann Whitney, Figura 32). No se observó efecto estadísticamente significativo en ninguno de los compuestos por separado.

En la comparación de las mezclas con los compuestos individuales, encontramos una subexpresión de ambos genes (*cat* y *sod*) en M3 en comparación con GLI ($p=0.0071$ y $p=0.0014$, respectivamente; prueba de Mann Whitney, Figura 32).

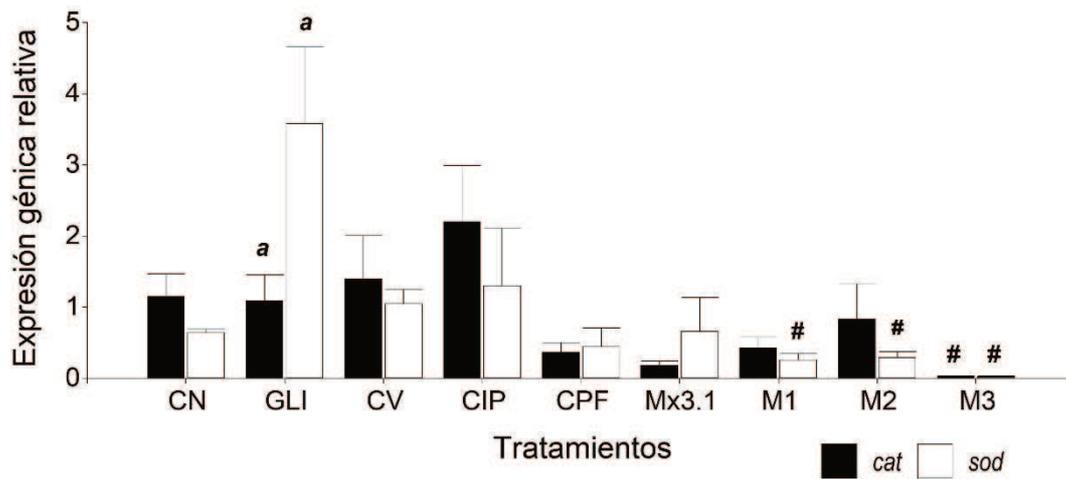


Figura 32. Expresión del gen *sod* y *cat* en crías de *C. latirostris* expuestas durante el desarrollo embrionario a diferentes tratamientos. CN: Control negativo; CV: Control del vehículo; GLI: Formulación de glifosato al 2%; CPF: Formulación de clorpirifós al 0.8%; CIP: Formulación de cipermetrina al 0.12%; M: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones de campo: CIP + CPF + GLI; M1: Mezcla GLI + CIP; M2: Mezcla CPF + CIP; M3: Mezcla CPF + GLI. # $p < 0.05$ estadísticamente significativo en comparación con CV. La letra "a" indica diferencia significativa entre los compuestos individuales y la M3. $P < 0.05$ (Mann-Whitney).

6.2.3 Determinación del daño oxidativo a lípidos y actividad enzimática de SOD y CAT

No se observaron diferencias significativas en los niveles de TBARS o actividades de CAT y SOD entre todos los grupos expuestos y sus controles correspondientes en ninguno los dos experimentos (E1 y E2, Tabla 9).

Tabla 9. Parámetros de estrés oxidativo evaluados en neonatos (E1) y juveniles (E2) de *C. latirostris*. Los valores se expresan como media \pm EE por grupo experimental.

| | Tratamientos | TBARS [nmol/mg prot] | CAT [KU/mg prot] | SOD [% inhibición] |
|-------|-----------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| E1 | CN | 1.74 \pm 0.11 | 207.02 \pm 36.31 | 84.08 \pm 3.31 |
| | CV | 2.64 \pm 0.49 | 190.25 \pm 40.52 | 85.19 \pm 3.48 |
| | GLI1 | 1.78 \pm 0.15 | 303.42 \pm 75.78 | 79.39 \pm 12.73 |
| | GLI2 | 2.03 \pm 0.16 | 155.57 \pm 33.08 | 74.84 \pm 4.59 |
| | CPF1 | 1.73 \pm 0.21 | 212.46 \pm 34.11 | 87.23 \pm 3.51 |
| | CPF2 | 1.61 \pm 0.16 | 205.39 \pm 27.44 | 78.68 \pm 3.68 |
| | CIP1 | 2.01 \pm 0.15 | 196.73 \pm 33.96 | 85.66 \pm 5.42 |
| | CIP2 | 1.87 \pm 0.26 | 245.27 \pm 32.69 | 77.98 \pm 9.10 |
| | Mx3.1 | 1.86 \pm 0.21 | 147.68 \pm 25.60 | 80.88 \pm 10.46 |
| | Mx3.2 | 1.77 \pm 0.22 | 137.16 \pm 27.13 | 69.04 \pm 4.77 |
| E2 | CN | 4.11 \pm 0.76 | 130.60 \pm 17.01 | - |
| | CV | 5.49 \pm 0.60 | 113.72 \pm 11.98 | - |
| | GLI1 | 4.28 \pm 0.78 | 139.62 \pm 12.73 | - |
| | GLI2 | 3.02 \pm 0.71 | 208.42 \pm 30.59 | - |
| | CPF1 | 4.05 \pm 0.53 | 68.77 \pm 22.39 | - |
| | CPF2 | 3.27 \pm 0.32 | 131.67 \pm 47.01 | - |
| | CIP1 | 6.67 \pm 1.94 | 97.13 \pm 26.45 | - |
| | CIP2 | 4.01 \pm 0.80 | 153.1 \pm 44.24 | - |
| | M1 | 3.39 \pm 0.93 | 182.99 \pm 26.05 | - |
| | M2 | 4.82 \pm 0.80 | 135.06 \pm 38.20 | - |
| | M3 | 4.58 \pm 0.60 | 121.97 \pm 13.20 | - |
| Mx3.1 | 4.02 \pm 0.43 | 130.7 \pm 41.27 | - | |

TBARS: Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico; CAT: Actividad de la enzima catalasa; SOD: Actividad de la enzima superóxido dismutasa. CN: Control negativo; CV: Control del vehículo; GLI1: Formulación de glifosato al 2%; GLI2: Formulación de glifosato al 1%; CPF1: Formulación de clorpirifós al 0.8%; CPF2: Formulación de clorpirifós al 0.4%; CIP1: Formulación de cipermetrina al 0.12%; CIP2: Formulación de cipermetrina al 0.06%; M1: Mezcla GLI1 + CIP1; M2: Mezcla CPF1 + CIP1; M3: Mezcla CPF1 + GLI1; Mx3.1: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones de campo: CIP1 + CPF1 + GLI1; Mx3.2: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones de medio campo: CIP2 + CPF2 + GLI2.

6.2.4 Parámetros de crecimiento

No se observaron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento (Tabla 10) entre todos los grupos expuestos y sus controles correspondientes en ninguno de los dos experimentos (E1 y E2).

Tabla 10. Parámetros de crecimiento de *C. latirostris* evaluados al nacer en todos los grupos experimentales del experimento 1 y 2. Todos los valores se expresan como media \pm EE.

| | Tratamientos | LT [cm] | LHC [cm] | Peso [g] |
|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| E1 | CN | 23.47 \pm 0.22 | 10.78 \pm 0.22 | 25.77 \pm 4.81 |
| | CV | 23.82 \pm 0.14 | 11.05 \pm 0.18 | 28.71 \pm 4.11 |
| | GLI1 | 23.44 \pm 0.28 | 10.5 \pm 0.25 | 42.69 \pm 4.38 |
| | GLI2 | 23.67 \pm 0.24 | 11.11 \pm 0.25 | 25.47 \pm 4.24 |
| | CPF1 | 23.22 \pm 0.18 | 10.9 \pm 0.15 | 22.74 \pm 3.18 |
| | CPF2 | 23.4 \pm 0.21 | 11 \pm 0.15 | 20.26 \pm 1.67 |
| | CIP1 | 23.75 \pm 0.13 | 10.75 \pm 0.17 | 31.57 \pm 3.71 |
| | CIP2 | 23.1 \pm 0.40 | 10.6 \pm 0.16 | 42.15 \pm 3.97 |
| | Mx3.1 | 22.99 \pm 0.71 | 10.68 \pm 0.29 | 38.06 \pm 4.31 |
| | Mx3.2 | 23.67 \pm 0.13 | 11.08 \pm 0.14 | 22.25 \pm 1.46 |
| | E2 | CN | 23.65 \pm 0.48 | 9.92 \pm 0.08 |
| CV | | 23.62 \pm 0.24 | 9.83 \pm 0.21 | 42 \pm 1.97 |
| GLI1 | | 22.93 \pm 0.72 | 9.83 \pm 0.17 | 40 \pm 2.03 |
| GLI2 | | 24.06 \pm 0.33 | 10.43 \pm 0.17 | 43 \pm 1.31 |
| CPF1 | | 23.90 \pm 0.21 | 10.09 \pm 0.11 | 42.75 \pm 1.19 |
| CPF2 | | 23.44 \pm 0.29 | 10.06 \pm 0.24 | 43 \pm 2.38 |
| CIP1 | | 24.03 \pm 0.25 | 10.21 \pm 0.18 | 43.57 \pm 1.13 |
| CIP2 | | 23.75 \pm 0.14 | 10.15 \pm 0.08 | 43.20 \pm 1.32 |
| M1 | | 23.66 \pm 0.18 | 10 \pm 0.09 | 44.38 \pm 1.68 |
| M2 | | 23.56 \pm 0.21 | 10 \pm 0.15 | 43.09 \pm 1.28 |
| M3 | | 23.40 \pm 0.35 | 9.88 \pm 0.08 | 42.13 \pm 1.49 |
| Mx3.1 | 23.44 \pm 0.21 | 10.18 \pm 0.09 | 43.89 \pm 1.65 | |

CN: Control negativo; CV: Control del vehículo; GLI1: Formulación de glifosato al 2%; GLI2: Formulación de glifosato al 1%; CPF1: Formulación de clorpirifós al 0.8%; CPF2: Formulación de clorpirifós al 0.4%; CIP1: Formulación de cipermetrina al 0.12%; CIP2: Formulación de cipermetrina al 0.06%; M1: Mezcla GLI1 + CIP1; M2: Mezcla de CPF1 + CIP1; M3: Mezcla CPF1 + GLI1; Mx3.1: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones de campo: CYP1 + CPF1 + GLI1; Mx3.2: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones de medio campo: CIP2 + CPF2 + GLI2; LT: Longitud total; LHC: Longitud hocico–cloaca; cm: Centímetros; g: Gramos.

6.4 Ensayos de exposición *in vivo* de neonatos y juveniles en condiciones semi-naturales.

6.4.1 Análisis de los plaguicidas

Los resultados obtenidos de las determinaciones analíticas de plaguicidas se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Determinación analítica de glifosato, clorpirifós y cipermetrina.

| Identificación de la muestra | | Principio activo - concentración [mg/L] | | | |
|------------------------------|------------|--|------------|-------------|-------------|
| | | GLI | AMPA | CIP | CPF |
| AGUA | CN | ND | ND | ND | ND |
| | GLI | 19 | 2.0 | ND | ND |
| | CIP | na | na | 0.02 | ND |
| | CPF | na | na | ND | 0.35 |
| | | Principio activo - concentración [mg/Kg] | | | |
| SUELO | CN | ND | ND | ND | ND |
| | GLI | 10 | 0.5 | na | na |
| | CIP | na | na | 0.12 | ND |
| | CPF | na | na | ND | 1.8 |

na: significa no analizado; ND: no detectado

6.4.2 Detección del daño al ADN y daño oxidativo al ADN a través del ensayo cometa estándar y modificado con endonucleasas

La figura 33 muestra los resultados de la EC estándar (media \pm EE). Los resultados del E3 y E4 mostraron un mayor daño al ADN en todos los grupos expuestos con respecto al CN (E3: $p < 0.01$, prueba de Mann Whitney; E4: $p=0.0002$, prueba de Tukey, Figura 33 A y B).

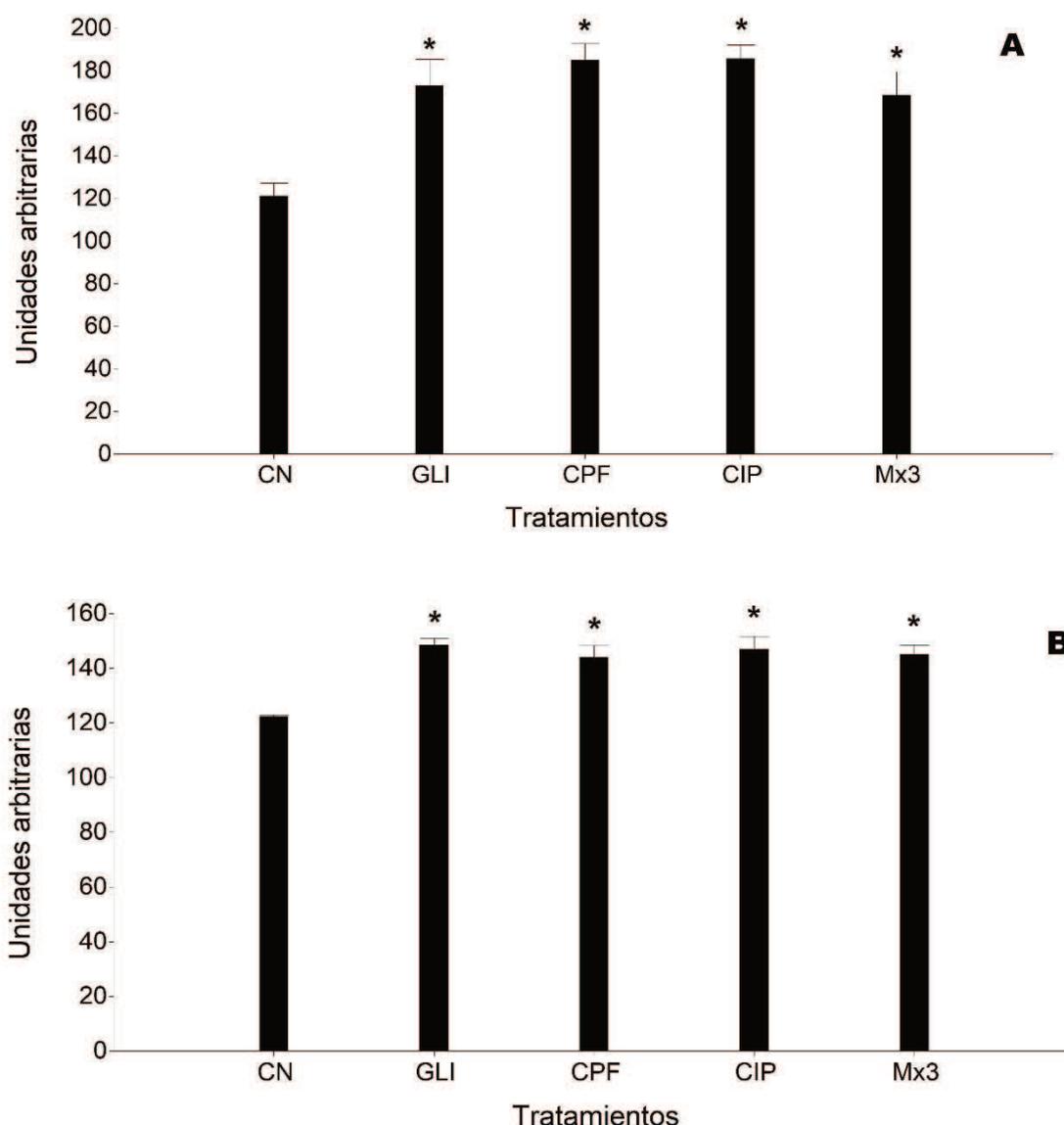


Figura 33. Índice de daño del ADN en neonatos y juveniles de *C. latirostris* con diferentes tratamientos. Experimento 1 (A) y 2 (B). CN: Control negativo; CV: Control del vehículo; GLI: Formulación de glifosato al 2%; CPF1: Formulación de clorpirifós al 0.8%; CIP: Formulación de cipermetrina al 0.12%; Mx3: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones de campo: CIP+ CPF+ GLI. * $p < 0.05$ estadísticamente significativo en comparación con CN.

La Figura 34 muestra los resultados obtenidos en el EC modificado.

En el E3 los sitios fpg y ENDO III fueron significativamente mayores en todos los grupos expuestos con respecto al CN ($p < 0.01$ en ambas determinaciones; prueba de Mann Whitney, Figura 34 A y B).

En el E4, la oxidación de purinas y pirimidinas fue significativamente mayor en GLI y Mx3 en comparación con el CN ($p=0.0004$ y $p=0.0011$, respectivamente; prueba de Tukey, Figura 34B), mientras que CPF y CIP mostraron diferencias solo en la oxidación de pirimidinas ($p=0.0011$, prueba de Tukey, Figura 34B).

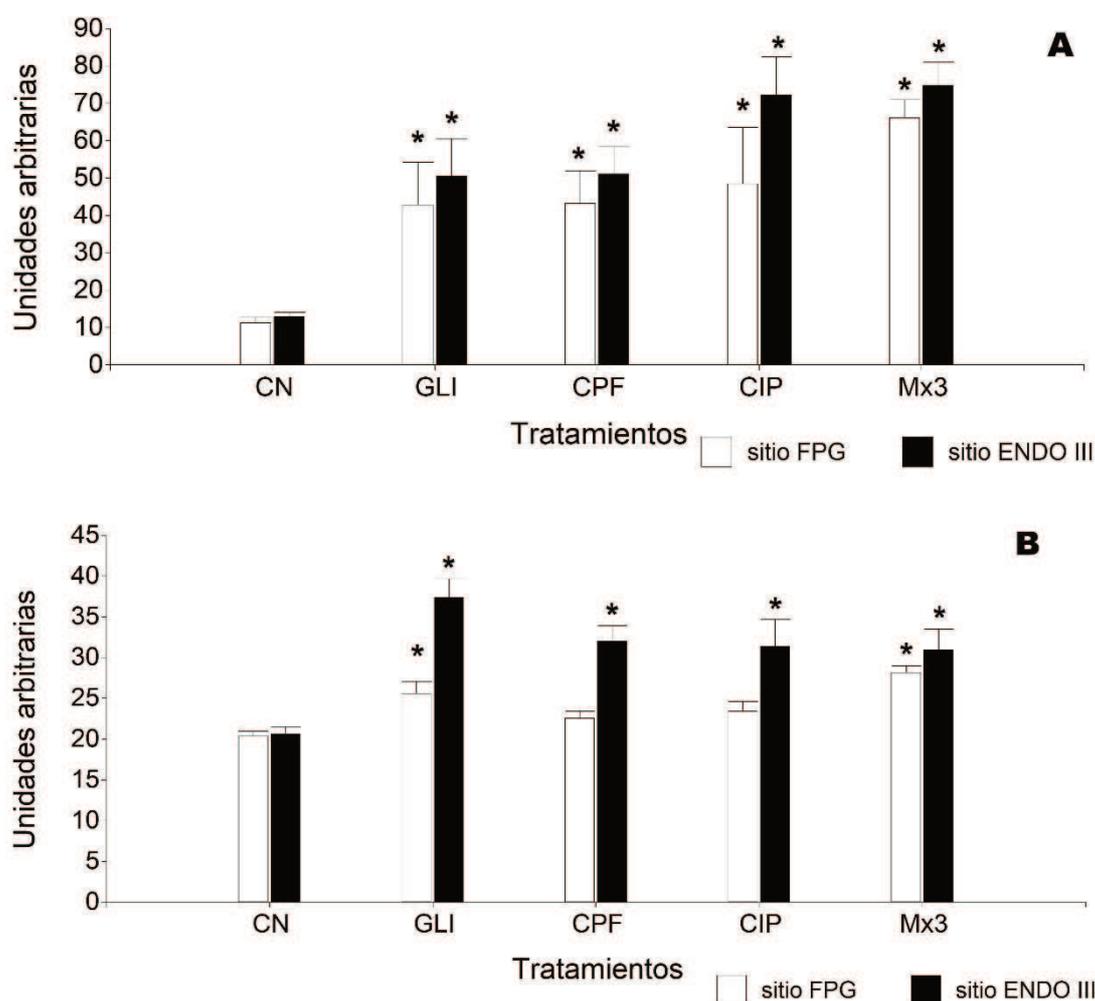


Figura 34. Daño oxidativo del ADN detectado mediante el EC modificado en juveniles y neonatos de *C. latirostris* en diferentes tratamientos. Experimento 3 (A) y 4 (B). CN: Control negativo; CV: Control del vehículo; GLI: Formulación de glifosato al 2%; CPF1: Formulación de clorpirifós al 0.8%; CIP: Formulación de cipermetrina al 0.12%; Mx3: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones de campo: CIP+ CPF+ GLI. * $p < 0.05$ estadísticamente significativo en comparación con CN.

6.4.3 Determinación de los niveles de expresión génica de los genes β -actina, *sod* y *cat* mediante qPCR

En el E4 se cuantificaron los niveles de expresión de los genes *sod*, *cat* y β -actina mediante la técnica de qPCR. La concentración media de ARN en sangre después del tratamiento con ADNasa fue de 86.05 ng/ μ l \pm 3.02 (media \pm EE). La relación de densidad óptica A260/280 nm medida con un espectrofotómetro Nanodrop fue de 1.78 \pm 0.02 (media \pm EE).

La Tabla 12 muestra las eficiencias en las reacciones de qPCR para este trabajo. Los porcentajes de eficiencia de los genes oscilaron entre 96% y 103%, el R² entre 0.996 y 0.989 y la pendiente entre -3.324 y -3.129.

Tabla 12. Eficiencias de las reacciones de qPCR para β -actina, *sod* y *cat* en ejemplares de *C. latirostris* del E4.

| Genes | Curva de eficiencia de amplificación (%) | R ² | Pendiente |
|--|--|----------------|-----------|
| Gen de referencia | | | |
| <i>β-actina</i> | 99.93 | 0.989 | -3.324 |
| Genes involucrados en el sistema antioxidante | | | |
| <i>sod</i> | 108.75 | 0.966 | -3.129 |
| <i>cat</i> | 103.71 | 0.966 | -3.26 |

Los niveles de expresión se determinaron en todos los grupos experimentales. Los resultados mostraron una sobreexpresión significativa del gen *cat* en CIP con respecto al CN ($p=0.0286$, prueba de Mann Whitney, Figura 35) pero no en los demás grupos. Cuando se comparó la Mx3 con los compuestos por separado encontramos diferencias con respecto a CIP en ambos genes, siendo la expresión en la mezcla significativamente menor (*sod*: $p=0.0100$ y *cat*: $p=0.0004$; prueba de Mann Whitney, Figura 35).

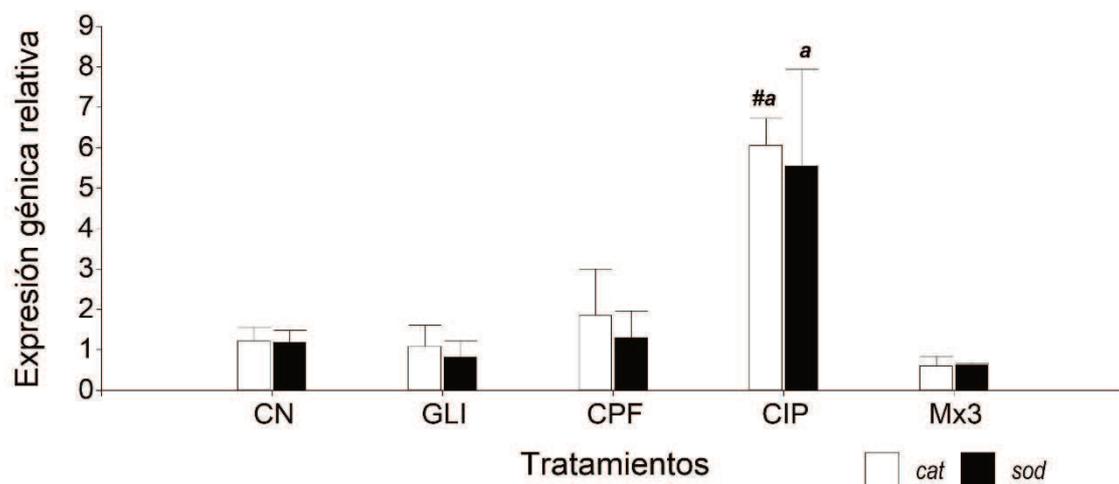


Figura 35. Expresión de los genes *sod* y *cat* en neonatos de *C. latirostris* expuestas a diferentes tratamientos. CN: Control negativo; GLI: Formulación de glifosato al 2%; CPF: Formulación de clorpirifós al 0.8%; CIP: Formulación de cipermetrina al 0.12%; Mx3: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones de campo: CIP + CPF + GLI. # $p < 0.05$ estadísticamente significativo en comparación con CN. La letra a indica diferencia significativa entre los compuestos individuales y la mezcla que constituyen: a estadísticamente significativo en comparación con Mx3.

6.4.4 Determinación del daño oxidativo a lípidos, actividad enzimática de SOD y CAT

Respecto a los parámetros de EO no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de TBARS o actividades de CAT y SOD (Tabla 13) en ninguno de los grupos expuestos (E3 y E4).

Tabla 13. Parámetros de estrés oxidativo de *C. latirostris* evaluados en juveniles (E3) y neonatos (E4). Todos los valores se expresan como media \pm EE por grupo experimental.

| Tratamientos | | TBARS [nmol/mg prot] | CAT [KU/mg prot] | SOD [% inhibición] |
|--------------|-----|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| E3 | CN | 2.27 \pm 0.36 | 215.86 \pm 37.42 | 65.81 \pm 3.50 |
| | GLI | 2.85 \pm 0.32 | 162.50 \pm 31.48 | 82.14 \pm 4.72 |
| | CPF | 2.95 \pm 0.40 | 191.53 \pm 34.61 | 71.52 \pm 6.40 |
| | CIP | 2.58 \pm 0.50 | 224.25 \pm 67.99 | 61.41 \pm 1.49 |
| | Mx3 | 2.47 \pm 0.26 | 166.87 \pm 25.92 | 67.21 \pm 6.32 |
| E4 | CN | 0.85 \pm 0.11 | 66.88 \pm 16.27 | 57.76 \pm 8.82 |
| | GLI | 0.62 \pm 0.08 | 106.21 \pm 10.93 | 61.86 \pm 2.34 |
| | CPF | 0.84 \pm 0.09 | 97.97 \pm 17.53 | 73.42 \pm 4.80 |
| | CIP | 0.86 \pm 0.11 | 94.32 \pm 16.96 | 63.18 \pm 7.49 |
| | Mx3 | 0.78 \pm 0.20 | 103.93 \pm 9.32 | 64.86 \pm 6.93 |

TBARS: Sustancias Reactivas al el Ácido Tiobarbitúrico; CAT: Actividad de la enzima catalasa; SOD: Actividad de la enzima superóxido dismutasa CN: Control negativo; CV: Control del vehículo; GLI: formulación de glifosato al 2%; CPF: Formulación de clorpirifós al 0.8%; CIP: Formulación de cipermetrina al 0.12%; Mx3: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones de campo: CIP + CPF + GLI.

6.4.5 Parámetros de crecimiento

Los parámetros de crecimiento de los animales se vieron afectados por la exposición a algunos de los plaguicidas (Tabla 14).

En el E3, la diferencia fue evidente en los parámetros LHC y LT en la Mx3 en comparación con el CN ($p=0.047$ y $p=0.036$, respectivamente; prueba de Mann Whitney, tabla 13) y en el grupo GLI en comparación con la Mx3 ($p=0.01$ y $p=0.011$, prueba de Mann Whitney, tabla 13). En el peso de los animales, pudimos observar valores significativamente más bajos en los grupos expuestos a GLI y CPF en comparación con la Mx3 ($p=0.040$ y 0.011 , respectivamente; prueba de Mann Whitney, tabla 13).

En el E4, observamos valores significativamente mayores de LT y peso en GLI, CIP y Mx3 en comparación con el CN ($p<0.0314$, y $p<0.0332$, respectivamente, prueba de Mann Whitney, tabla 13).

Tabla 14. Parámetros de crecimiento (media \pm EE) analizados en juveniles y neonatos de *C. latirostris* para los diferentes grupos experimentales expuestos a formulaciones de GLI, CIP, CPF y la mezcla ternaria en condiciones seminaturales.

| | Tratamientos | LT [cm] | LHC [cm] | Peso [g] |
|-----------|--------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| E3 | CN | 1.36 \pm 0.58 | 0.50 \pm 0.13 | 15.60 \pm 5.85 |
| | GLI | 0.94 \pm 0.58 # | 0.41 \pm 0.16 # | 10.94 \pm 6.48 * |
| | CPF | 2.04 \pm 0.78 | 1.19 \pm 0.26 | 14.08 \pm 23.94 * |
| | CIP | 3 \pm 0.70 | 1.58 \pm 0.35 | 52 \pm 27.51 |
| | Mx3 | 3.27 \pm 0.48 * | 1.58 \pm 0.30 * | 98.38 \pm 18 |
| E4 | CN | 0.75 \pm 0.11 | 0.84 \pm 0.13 | 0.00 \pm 1.16 |
| | GLI | 2.09 \pm 0.35 * | 1.64 \pm 0.31 | 12.63 \pm 2.87 * |
| | CPF | 0.50 \pm 0.11 | 0.55 \pm 0.14 | -1.50 \pm 1.04 |
| | CIP | 1.59 \pm 0.29 * | 1.18 \pm 0.21 | 6 \pm 2.49 * |
| | Mx3 | 1.42 \pm 0.20 * | 1.02 \pm 0.17 | 8.22 \pm 2.86 * |

CN: Control negativo; GLI: Formulación de glifosato al 2%; CPF: Formulación de clorpirifós al 0.8%; CIP: Formulación de cipermetrina al 0.12%; Mx3: Mezcla de las tres formulaciones a concentraciones de campo: CIP + CPF + GLI. LT: Longitud total; LHC: Longitud hocico-cloaca; cm: Centímetros; g: Gramos.

* $p < 0.05$ estadísticamente significativo en comparación con CN.

$p < 0.05$ estadísticamente significativo en comparación con Mx3.

7. Discusión

7.1 Identificación de genes de interés por PCR convencional

El rápido progreso producido en estos últimos años en el campo de la genómica ha proporcionado herramientas que pueden ayudar a nuestra comprensión de como los productos químicos pueden tener un impacto en la salud humana y en el ecosistema [304], [305]. Los parámetros críticos para la homeostasis celular están bajo vigilancia continua mediante un conjunto de factores proteicos que actúan como sensores celulares. Las células responden a alteraciones en estos parámetros mediante un reajuste en el metabolismo, normalmente activando o sintetizando *de novo* proteínas específicas para compensar el daño por estrés, a partir de los ARNm que codifican para estas proteínas. Con base en este principio y con el avance de la biología molecular, se desarrolló una nueva familia de biomarcadores, basados en el análisis de la transcripción de genes relacionados al estrés celular, que pueden ser utilizados para detectar exposición a xenobióticos, actuando como sensores de alerta temprana.

La mayoría de los biomarcadores utilizados hasta el momento para identificar el impacto de los plaguicidas en *C. latirostris* incluían marcadores de daño al ADN, daño oxidativo al ADN y lípidos, enzimas antioxidantes como CAT y SOD y alteraciones inmunológicas [254], [273], [275], [306]. Con el fin de identificar respuestas moleculares de expresión génica como biomarcadores potenciales de exposición a plaguicidas, se adaptó un protocolo para la preservación de muestras y extracción de ARN a partir de sangre de caimán [284]. Los avances en las tecnologías de ARN han tenido un impacto muy fuerte en los estudios de ecología molecular, proporcionando nuevas herramientas para comprender la respuesta de los organismos al estrés ambiental [307]. La integridad adecuada del ARN es el principal requisito para la posterior retrotranscripción a ADNc y así la obtención de datos adecuados sobre los niveles de expresión génica [308], [309], [298], [300]. En este sentido, para evaluar cualquier cambio en la modulación de los genes es fundamental un procedimiento óptimo de extracción de ARN, minimizando la actividad de las ARNasas para prevenir su degradación. El ARN es propenso a una degradación muy rápida después de la toma de muestra y, por lo tanto, son obligatorios los procedimientos específicos de conservación de la muestra antes de la extracción del ARN. Además, las técnicas óptimas de muestreo, conservación y extracción de ARN

pueden variar según las aplicaciones posteriores, la disponibilidad de equipos de laboratorio y el tamaño y la naturaleza de los organismos o tejidos analizados [310].

Particularmente la sangre periférica es una muestra importante y menos invasiva en comparación con los tejidos sólidos o semi sólidos, para evaluar la salud de las especies silvestres expuestas a factores ambientales estresantes. Además, este tejido permite asociar las respuestas moleculares con respuestas fisiológicas más amplias [311]. Al mismo tiempo, la posibilidad de extraer ARN de sangre es relevante para las especies amenazadas o en peligro de extinción en las que generalmente se puede obtener una cantidad limitada de material y se debe evitar el sacrificio de los animales [312]. La sangre es una muestra especialmente desafiante, particularmente en vertebrados no mamíferos que poseen glóbulos rojos nucleados y, por lo tanto, un mayor contenido de ADN y nucleasas, lo que hace que la degradación del ARN sea extremadamente rápida [312].

En sangre de *C. latirostris* se han probado varios protocolos de preservación de ARN, siendo el TRIzol® el reactivo más eficaz para obtener una calidad, cantidad e integridad adecuada de ARN. El uso del reactivo TRIzol® para células recién recolectadas es una solución eficaz para mantener la integridad del ARN porque contiene altas concentraciones de tiocianato de guanidina y fenol ácido para inhibir la actividad de las ARNasas. Las ventajas de utilizar TRIzol® se basan en la ausencia de otras sustancias extrañas que podrían interponerse en los procedimientos posteriores [313], [314]. En cuanto a los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral, hemos observado una buena integridad del ARN a través de un gel de agarosa, con una relación de densidad óptica A260/280 aproximada de 1.90, lo que indica un ARN de buena calidad sin contaminación proteica ni fenólica [299]. Los estudios sobre ARN en otras especies de cocodrilos son muy escasos y la mayoría describió protocolos similares de extracción con Trizol® u otros reactivos [315], [316], [311].

En una segunda etapa se procedió a determinar la presencia/ausencia de genes relacionados con vías de defensa antioxidante (*cat* y *sod*), de reparación del daño (*p53*), biotransformación (*p450* y *gst*) y reguladores del ciclo celular (*bcl2* y *bax*) en sangre periférica de *C. latirostris* mediante la técnica de PCR convencional. La cuantificación de la expresión génica puede verse afectada por varios factores, por lo que es sumamente importante contar con buena cantidad y calidad de ARN, una síntesis de ADNc eficiente, un buen funcionamiento de los *primers* y el análisis estadístico adecuado [298]. Varios autores confirman que los *primers* son fundamentales para garantizar una amplificación específica y eficiente de los productos [300], [317]. En cuanto a los resultados, pudimos visualizar los genes β -actina, *cat*, *sod*, *gst*, *p450*, *bcl2*,

bax y *p53* sin inespecificidades en los geles de agarosa. La identificación de estos genes y la posibilidad de aplicarlos como marcadores sensibles de exposición a plaguicidas nos permitirá comprender de manera integral el significado específico de muchas alteraciones fisiológicas producidas por los plaguicidas en estos animales. Esto aportará nuevos conocimientos para contribuir a la protección de las poblaciones silvestres ambientalmente expuestas y permitirá identificar problemas ambientales antes de que los sistemas biológicos se vean seriamente afectados [277].

7.2 Ensayo de exposición embrionaria por pulverización sobre el material del nido.

C. latirostris se considera un organismo centinela para la evaluación del efecto inducido por plaguicidas [271]. En estudios anteriores, se demostró inmunotoxicidad, genotoxicidad, daño oxidativo y alteraciones enzimáticas en *C. latirostris* expuestos a diferentes formulaciones de GLI (PanzerGold® y Roundup® Full II), CIP (Atanor®) y END (Galgofan®) por aplicación tópica a través de la cáscara de huevo [254], [306], [274], [276].

El EC demostró ser un método apropiado y altamente sensible para detectar daños tempranos en el ADN en organismos centinelas, identificar roturas de cadena simple y maximizar la expresión de sitios alcali-lábiles [318], [194], [319]. En el presente estudio, y complementando trabajos anteriores realizados en la especie, encontramos un aumento significativo en el daño al ADN en los grupos expuestos a formulaciones de GLI, CIP y CPF, así como sus mezclas binarias y ternarias en ambos experimentos (E1 y E2). Además, hubo una relación dosis-respuesta en GLI y CIP, siendo el daño al ADN mayor para las concentraciones más altas. Estudios anteriores han informado daños en el ADN en eritrocitos de *C. latirostris* expuesto *in ovo* a la formulación RU (50-1750 µg / huevo) por topicación [254]]. Del mismo modo, Burella et al. [320] evaluaron el potencial efecto estadio-dependiente de RU (750-1750 µg/huevo) en embriones de *C. latirostris* reportando daño en el ADN independientemente del momento en que se produjera la exposición. A su vez, estudios llevados a cabo con otras especies de vertebrados han demostrado un aumento en el daño al ADN a través del EC en eritrocitos expuestas a formulaciones de CPF, GLI y CIP [207], [178], [209]. Los mecanismos por los cuales los plaguicidas inducen daño genético difieren mucho en su naturaleza química. Varios autores han demostrado que los plaguicidas están involucrados en el desequilibrio del estado redox y la genotoxicidad [321], [322], [323],[276]. Los plaguicidas podrían inducir la generación de EROs como el H₂O₂, el O₂⁻ y el •OH e inhibir las enzimas involucradas en la reparación del ADN, lo que puede conducir a roturas de cadena simple y doble, y más tarde a la formación de micronúcleos [324], [325], [326], [327]. Con el fin de dilucidar si la oxidación de las bases contribuye significativamente al daño del ADN causado por las formulaciones de GLI, CIP y CPF y sus mezclas, se empleó el EC modificado con las endonucleasas específicas ENDO III y fpg. Los resultados obtenidos indicaron oxidación de purinas y pirimidinas en todos los grupos expuestos a las formulaciones por separado y en mezclas, en concentraciones equivalentes a las utilizadas en la

agricultura y la mitad de las mismas, siendo los resultados corroborados en ambos experimentos (E1 y E2). Además, se encontró una relación dosis-efecto en ambos experimentos (E1 y E2) para los tres compuestos por separado, donde el daño oxidativo del ADN fue mayor a concentraciones aplicadas de campo que a la mitad de las mismas.

Específicamente en cocodrilianos, existen pocos estudios relacionados con el daño oxidativo y el sistema de defensa antioxidante. Los trabajos reportados se llevaron a cabo en tejidos u órganos (por ejemplo, riñones, músculos, gónadas o hígado) para lo cual los animales tuvieron que ser sacrificados, o se obtuvieron muestras de animales recientemente muertos [328], [329], [330], [331]. Poletta et al. [275] fue el primer reporte que caracterizó el uso de biomarcadores de daño oxidativo y defensa antioxidante en sangre de *C. latirostris* que luego fueron aplicados como biomarcadores para la evaluación del efecto de plaguicidas, siendo también el primer trabajo de este tipo en todas las especies de cocodrilianos [276]. Los autores informaron desequilibrios en el estado oxidativo a través de la peroxidación lipídica y el daño del ADN, así como en las actividades de las enzimas antioxidantes CAT y SOD en embriones de *C. latirostris* después de una exposición tóxica a concentraciones subletales (1–1000 µg/huevo) de las formulaciones GLI, END y CIP. Por el contrario, en el presente trabajo, no observamos alteraciones en la actividad de CAT y SOD, ni aumento de la peroxidación lipídica en ningún grupo expuesto. Estos resultados no se correlacionan con el daño oxidativo al ADN obtenido en el E1 y E2 de este trabajo. Una posibilidad ante la falta de respuesta de las enzimas antioxidantes (CAT y SOD) podría ser que el exceso de las EROs haya generado toxicidad proteica. Como consecuencia, las sustancias reactivas inducidas por plaguicidas afectan al ADN por oxidación de bases, como lo sugirieron previamente otros autores en anfibios [208], [210] y en *C. latirostris* [276]. La oxidación de bases es uno de los tipos más comunes de daño en el ADN causado por EROs [174]. El oxidante primario responsable del daño en el ADN es el •OH, ya que reacciona directamente con la molécula de ADN [202]. Otros autores señalaron explicaciones similares a los resultados obtenidos en nuestro trabajo, sugiriendo que el daño oxidativo no puede predecirse sólo en función de las variaciones antioxidantes, porque esta asociación puede verse comprometida cuando el consumo de antioxidantes de bajo peso molecular se ve contrarrestado por la síntesis *de novo* de las enzimas, y/o cuando las acciones inhibitorias deterioran la actividad de los antioxidantes enzimáticos [332], [333].

Como hemos visto hasta aquí, varios trabajos realizados en sangre de *C. latirostris* utilizando marcadores de estrés oxidativo nos permitieron vincular los desequilibrios en el estado oxidativo con factores que podrían afectar directamente la salud de esta especie de gran interés comercial y ecológico para América del Sur [320], [276]. En este trabajo de tesis se analizaron los patrones de expresión en sangre de *C. latirostris* como un nuevo biomarcador de estrés oxidativo. No existen reportes previos sobre los cambios en los niveles de expresión de los genes del *cat* y *sod* en cocodrilianos en contextos de toxicidad. Sujiwattanarat et al. [281] realizaron el primer estudio sobre la clonación molecular y caracterización del gen de cobre, zinc superóxido dismutasa (Cu, Zn-*sod*) en *Crocodylus siamensis* y analizaron los niveles de expresión del gen Cu, Zn-*sod* en diferentes tejidos (hígado, páncreas, pulmón, riñón, corazón y sangre total) mediante qPCR, pero no estudiaron cambios en estos niveles de expresión ante diferentes situaciones.

En el E2, observamos una disminución significativa de la expresión génica del gen *sod* en M1, M2 y M3 y un patrón similar se observó en el gen *cat* en neonatos expuestos durante el período embrionario a M3. La subexpresión de los genes *sod* y *cat* posiblemente se deba a una inhibición en la regulación de la expresión de los genes que codifican para estas enzimas, causada directamente por la acción tóxica de los xenobióticos [172], [334]. Los mecanismos por los cuales los xenobióticos podría inhibir directamente las defensas antioxidantes aún no están claros y dependen del tipo de compuesto [224]. La posible acumulación de EROs, que depende de la intensidad y duración del agente aplicado, así como de la susceptibilidad de la especie, puede aumentar o disminuir la actividad antioxidante [321]. Además, en el E2 no hubo diferencias significativas en las actividades enzimáticas de CAT y SOD bajo las mismas condiciones de exposición, pero aun así se encontró un daño significativo en el ADN y oxidación de purinas y pirimidinas. En general, la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes se regula cuando la célula es desafiada por EROs, y está bajo el control de numerosos factores transcripcionales activados por EROs [145], [226]. Por el contrario, algunos autores sugieren que los niveles de ARNm son representativos de la actividad celular en un momento particular, mientras que la actividad de la proteína podría regularse a nivel postraduccional, enzimáticamente y no mediante control transcripcional [227], [228], [176].

Por otro lado, SOD requiere un cofactor metálico para su actividad y existen varias formas de esta enzima: Cu, Zn-SOD, Fe-SOD y Mn-SOD [145], [154]. Esto significa que existen diferentes subtipos del gen, probablemente por el *splicing* alternativo, que codifican diferentes isoenzimas de SOD [229]. En este trabajo se utilizó específicamente

el gen *Cu, Zn-sod* [281] y se encontraron diferencias significativas en las tres mezclas binarias respecto al control. En este sentido, *Cu, Zn-sod* demostró ser un biomarcador sensible frente al estrés para el estudio de la expresión génica [335], [336], pudiendo ser afectada también la actividad enzimática. *Cu, Zn-SOD* es predominante en el citosol y en el compartimento extracelular en eucariotas y algunos procariotas [166].

La forma en que los químicos de una mezcla influyen en la toxicidad general depende de muchos factores, incluyendo su concentración, sitio objetivo y mecanismo de acción [337]. Hernández et al. [338] informó que la mezcla de plaguicidas puede tomar una de tres formas al combinar los efectos toxicológicos de uno o más componentes de una mezcla: 1) independiente; 2) adición de dosis o 3) interacción (potenciación, sinergia y antagonismo). En este sentido, creemos que es importante evaluar los efectos que podrían surgir de la combinación de dos o más plaguicidas, que es la forma en que normalmente se aplican en los cultivos. En el presente estudio, encontramos una posible acción independiente en EC en la mezcla de las tres formulaciones (Mx3.1), donde el efecto de la misma mostró ser similar al causado por GLI1 solo en el E1. Sin embargo, para los sitios ENDO III, parece haber un efecto antagonista, ya que la Mx3.1 indujo una menor cantidad de pirimidinas oxidadas que GLI1 y CPF1 por separado en el E1. Un efecto similar se observó en E2, en la mezcla binaria M2 (CPF1 + CIP1) para los sitios ENDO III y en M1 (GLI1 + CIP1) para los sitios fpg. Se asume que los dos plaguicidas interfieren con el efecto del otro. Como resultado, observamos una reducción en el efecto de los compuestos individuales, que no necesitan ser estructuralmente similares [339]. En el caso de la M3, observamos que los sitios fpg son más bajos que en GLI 1 pero más altos que para CPF1 cuando se analizan por separado, los dos plaguicidas que constituyen esta mezcla. Esto puede explicarse por un posible tipo de acción antagonista de CPF sobre GLI, que hizo que la acción del plaguicida observada en forma individual disminuyera en la mezcla. En cuanto a la expresión génica de los genes *sod* y *cat*, encontramos un posible efecto antagonista de CPF sobre en la M3, el mismo efecto observado para los sitios fpg.

Podemos decir que las interacciones observadas en los dos experimentos, en diferentes mezclas de plaguicidas, a menudo inducen respuestas con diferentes grados de sensibilidad. Poletta et al. [255] informó que la mezcla de formulaciones de GLI, END y CIP produjo mayores efectos que los compuestos por separado, sobre la genotoxicidad en neonatos de *C. latirostris*, además de inducir alteraciones bioquímicas-enzimáticas después de la exposición semi-natural de los huevos dentro del nido. Más recientemente, López-González et al. [256] simularon condiciones reales de exposición de neonatos de *C. latirostris* durante sus primeros meses de vida, demostrando que las

mismas formulaciones de plaguicidas probadas en este estudio y en concentraciones ambientalmente relevantes, aumentaron la frecuencia de micronúcleos y otras anormalidades nucleares en los eritrocitos, con una posible acción antagonista entre GLI y CPF en la mezcla binaria, una interacción similar a la observada en el presente estudio entre los dos plaguicidas para sitios de fpg y la expresión de *sod* y *cat*. Sin embargo, Bonifacio y Hued [327] demostraron diferentes respuestas en tratamientos de mezclas que reflejaban una interacción compleja (antagonismo y potenciación).

En relación con los parámetros de crecimiento, no se vieron afectados por las formulaciones y mezclas probadas en este trabajo. De manera similar, López-González et al. [353] informó la falta de efecto sobre el crecimiento de las crías de caimán expuestas durante el desarrollo por aplicación tópica a través de la cáscara de huevo a las formulaciones GLI, CIP y END a una concentración de 1–1000 µg / huevo. De acuerdo con la explicación dada por otros autores, creemos que la concentración de plaguicidas aplicados y/o el tiempo de exposición, probablemente no fueron suficientes para crear un desequilibrio en los procesos bioenergéticos subyacentes que afectan al crecimiento del organismo [256], [340]. Sin embargo, estudios previos en esta especie evidenciaron un tamaño menor al nacer y un retraso en el crecimiento durante los primeros 3 meses de vida en neonatos expuestos *in ovo* a RU y su mezcla con CIP y END luego de pulverización sobre nidos construidos artificialmente [255]. En este trabajo, como en aquel, las concentraciones utilizadas fueron las recomendadas para la aplicación en cultivos de soja: GLI: 3% (3 L/100 L agua/ha; solución preparada: 19,8 g/L), END: 0.85% (0.85 L/100 L agua/ha; solución preparada 3.03 g/L) y CIP: 0.12% (0.12 L/100L agua/ha; solución preparada 0.33 g/L). Las mismas se aplicaron en dos momentos distintos del período de incubación: al inicio y un mes después. En los dos experimentos realizados en esta Tesis Doctoral se realizó una sola aplicación (al inicio del periodo de incubación). A su vez, el experimental de Poletta et al. [255] fue realizado de manera *ex – situ*, pudiendo influir otros factores ambientales (variaciones de temperatura y humedad opr ejemplo) que generon mayor impacto de los plaguicidas sobre los neonatos. Podríamos sospechar que la fisiología asociada al crecimiento de los animales no siempre se ve afectada de la misma manera y tal vez depende mucho de la susceptibilidad de los nidos utilizados en cada ensayo. Cabe destacar que el crecimiento es uno de los factores más afectados por lo que se conoce entre las especies de cocodrilianos y otros reptiles ovíparos como “efecto nido” [290], [291], [271], [254], [255]. La característica de cada nidada en términos de crecimiento y su respuesta a cualquier otra variable ambiental es totalmente diferente, incluso considerando las nidadas de la misma temporada que nacieron en el mismo momento [290].

En conclusión, los resultados indicaron la presencia de daño en el ADN, oxidación de purinas y pirimidinas en el caso de exposición a formulaciones GLI, CIP y CPF, así como en todas las mezclas testeadas. La mezcla indicaría una acción independiente de los componentes en el daño del ADN y la oxidación de bases. Sin embargo, en los resultados de expresión génica se observó una disminución significativa en la expresión de genes *sod* y *cat* en las tres mezclas binarias. Además, se encontró un posible efecto antagonista entre diferentes plaguicidas en M3 sobre la expresión de ambos genes. Este estudio demostró que el uso de formulaciones plaguicidas en concentraciones utilizadas en campo genera efectos genéticos deletéreos en esta especie, por lo que la exposición a los mismos podría amenazar el estado de salud de las poblaciones silvestres. Estos resultados concuerdan con otros reportados previamente por nuestro grupo en lo que respecta al daño al ADN y en el mecanismo de oxidación de bases pirimidínicas y purínicas que es relevante en todos los grupos, advirtiendo sobre los efectos que una exposición constante a plaguicidas, incluso en concentraciones bajas, puede tener durante la vida de los caimanes que viven en áreas expuestas [254], [272] [306], [320]. Específicamente López González et al. (2017) y Burella et al. (2018) informaron sobre genotoxicidad, daño oxidativo y alteración en la actividad de la enzima SOD en eritrocitos de *C. latirostris* expuestos a concentraciones subletales de dos formulaciones de GLI: PanzerGold® y Roundup® Full II (500-1000 µg / huevo); formulación de END Galgofan® y formulación de CIP Atanor® (1-1000 µg / huevo) mediante aplicación tópica a través de la cáscara del huevo al inicio del período de incubación.

7.3 Ensayos de exposición *in vivo* de neonatos y juveniles en condiciones semi-naturales.

Las condiciones ambientales y los contaminantes producidos por las actividades humanas pueden influir directamente en el estado de salud de las especies silvestres. Los estudios a campo pueden proporcionar datos realistas y brindar información relevante sobre la toxicidad evaluada en enfoques ecológicos [119]. En este sentido, se propuso un experimento *ex situ* en condiciones semi-naturales (o semi-controladas) para comprender el efecto de las formulaciones comerciales por separado y en mezcla, en caimanes durante su primer año de vida. Las propiedades químicas de cada formulación, la interacción con otros compuestos y el mecanismo de acción de cada tóxico, pueden producir efectos muy variables. Además, los factores no químicos, como factores ambientales, ecológicos, respuestas fisiológicas a esa interacción y la susceptibilidad individual de cada organismo frente a la exposición, que también pueden actuar como factores de estrés, agregan una mayor complejidad a múltiples situaciones [340], [341] En este tipo de evaluación, podemos considerar las interacciones con algunas variables bióticas, variables físicas (como intensidad de luz y temperatura) y variables químicas (sustancias tóxicas: mezclas complejas) [342].

En cuanto a la determinación de plaguicidas realizada en este experimento se encontraron valores similares en algunos casos teniendo en cuenta los registrados por otros autores que estudiaron la presencia de residuos de plaguicidas en aguas superficiales y suelo en Argentina [114], [119], [120]. Particularmente, Aparicio et al. [114] informaron que los niveles de GLI en las aguas superficiales oscilaron entre 0.5 a 7.6 $\mu\text{g/L}$, mientras que las concentraciones en el sedimento variaron entre 0.035 a 1.5 mg/kg en las cuencas agrícolas de Argentina. A su vez, Primost et al. [117] informaron niveles máximos de concentración de 8105 y 38939 ug/kg de GLI y AMPA respectivamente en muestras de suelo y en muestras de agua registraron un valor máximo de 1.8 ug/L de GLI y 1.9 ug/L de AMPA en los agroecosistemas de la pampa mesopotámica. Por su parte, Etchegoyen et al. [119] informaron que en aguas superficiales del curso principal del río Paraguay-Paraná y sus afluentes principales, los rangos encontrados de CIP y CPF oscilaron entre 0.004–6.62 $\mu\text{g/L}$ y 0.16–221.3 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente. Por otro lado, Marino y Ronco [120] informaron que en muestras de cuerpos de agua en la pampa ondulada se encontraron valores máximos de 3.55 ug/L y de 10.8 ug/L de CIP y CPF respectivamente. En los sedimentos pertenecientes a los afluentes del primer orden registraron una media de 160 ug/kg y 4.8 ug/kg en CIP y CPF, respectivamente. Estos valores refuerzan la validez del diseño experimental utilizado y

de las concentraciones aplicadas, ya que los residuos encontrados son comparables a aquellos encontrados en los ambientes agrícolas por los autores citados anteriormente.

En el E3 y E4 observamos daño al ADN generado por GLI, CIP, CPF y la mezcla con respecto al grupo control, tanto en los neonatos como en los juveniles de *C. latirostris*, con concentraciones equivalentes a las recomendadas en las prácticas agrícolas de la región, principalmente soja. Al respecto, Mudry y Carballo [142] explicaron que el EC es una prueba sensible, ya que puede detectar daños tempranos en el ADN, identificando roturas de una sola hebra y maximizando la expresión de sitios lábiles a los álcalis en la molécula de ADN. Diferentes estudios han informado daños en el ADN en sangre periférica de neonatos de *C. latirostris* expuestos a diferentes concentraciones de formulaciones de GLI (PanzerGold® y Roundup® Full II), END (Galgofan®), CIP (Atanor®) y CPF (Lorsban®) [254], [255], [320]. Estos estudios se aplicaron durante el período embrionario mediante aplicación tópica a través de la cáscara del huevo y mediante pulverización sobre nidos construidos artificialmente con huevos en su interior. Además, en estudios *in vivo* en neonatos se observaron anomalías nucleares en eritrocitos y daño al ADN inducidos por las mismas mezclas complejas aplicadas en el presente trabajo [252]. Ambos estudios se realizaron en condiciones controladas de laboratorio durante 60 días a concentraciones que se fueron reduciendo progresivamente en el tiempo durante el experimento, con el fin de simular la degradación de los compuestos en el agua. El EC se usa ampliamente como biomarcador de exposición en estudios en los que se evalúa el impacto de varios plaguicidas y la medición es una indicación del daño inicial en el I genoma que, de no repararse, puede tener graves consecuencias [343]. Varios estudios también han demostrado daño en el ADN por exposición a CIP, CPF, GLI y mezclas en diferentes especies tales como peces, anfibios, mamíferos y otros reptiles [344], [345], [346], [209], [347], [223].

Los contaminantes ambientales como los plaguicidas pueden causar EO al producir EROs [170]. En condiciones normales, las enzimas antioxidantes proporcionan una protección adecuada contra los radicales libres y EROs [344]. Sin embargo, la desregulación de solo una de estas enzimas podría afectar seriamente los mecanismos de defensa celular [348]. En cocodrilianos, existen pocos estudios relacionados con el daño oxidativo y las defensas antioxidantes. Furtado Filho et al. [330] informó los valores basales de peroxidación lipídica en *Caiman yacare*. Hermes-Lima et al. [331] observó que la transición a partir de embriones a crías de *C. yacare* en verano, se acompaña de un aumento en el Glutation (GSH) y en las enzimas antioxidantes (CAT, GSH-peroxidasa, GSH-reductasa y GSH S-transferasa -GST). A su vez, se observaron

modificaciones en el nivel de TBARS y GST en *Alligator mississippiensis* en ambientes contaminados con metales pesados [328], [329]. En el E3 y E4, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de CAT, SOD y TBARS en ninguno de los tratamientos. Estas diferencias pueden estar asociadas a diversos factores como la susceptibilidad de las especies o el estadio (neonato, juvenil o adulto), al tipo de compuesto y su mecanismo de acción, al tiempo de exposición al contaminante, dosis/concentraciones utilizadas, entre otras.

En el E3 y E4 observamos oxidación de purinas y pirimidinas a través del EC modificado, en todos los grupos experimentales. Varios estudios han relacionado la oxidación de bases con la exposición a plaguicidas en diferentes concentraciones [349], [350], [211]. En los dos experimentos (E3 y E4) observamos que los resultados de LPO y las defensas antioxidantes no están correlacionados con las diferencias significativas observadas en genotoxicidad y el daño oxidativo al ADN. Por esta razón creemos que es necesario continuar investigando los posibles mecanismos de toxicidad subyacentes a las exposiciones a plaguicidas. Sin embargo, nuestros resultados nos permiten suponer que el exceso de EROs produjo toxicidad proteica, afectando a las enzimas antioxidantes y, como consecuencia, generando oxidación de bases en el ADN [202], [276]. Sin embargo, el efecto de las EROs no fue suficiente para producir LPO. Además, no observamos interacción entre los componentes de la mezcla en los parámetros de daño en el ADN y daño oxidativo al ADN. La interacción entre diferentes plaguicidas puede resultar en múltiples respuestas, dependiendo de las diferencias en las propiedades químicas y los modos de acción tóxica de cada compuesto [338].

Con respecto a las modificaciones en los niveles de expresión génica de *cat*, en el E4, observamos un aumento estadísticamente significativo en CIP con respecto al CN, pero no en los otros grupos. Este resultado sugiere que CIP induce el sistema antioxidante mediante la síntesis *de novo* de las dos enzimas principales que actúan en la primera línea de respuesta al EO. Esto podría significar un mayor efecto de toxicidad de la CIP en comparación con los otros plaguicidas. Este resultado significativo no se correlaciona con los resultados obtenidos en la actividad enzimática del E4. Sin embargo, el aumento de la expresión del gen *cat* puede no significar un aumento de la actividad enzimática, ya que la expresión génica puede controlarse mediante regulación postranscripcional [176]. La falta de correlación entre las actividades de las enzimas antioxidantes y los genes codificantes de la transcripción podría atribuirse a un efecto de retraso entre la transcripción y la traducción o modificaciones posteriores a la traducción [351]. Diferentes trabajos en distintas especies (zebrafish, ratones albinos suizos, entre otros)

han reportado una sobreexpresión de los genes *cat* por exposición a CIP [242], [347], [232] [351].

Las interacciones entre mezclas pueden causar cambios complejos que son diferentes de los efectos tóxicos que ejercen los compuestos por separado [352], [353]. Dichos efectos toxicológicos combinados pueden incluir potenciación, sinergia y antagonismo [354]. En los niveles de expresión génica, cuando se comparó la Mx3 con los compuestos por separado encontramos una subexpresión de ambos genes en comparación con CIP. Suponemos un posible efecto antagónico de uno o ambos de los demás compuestos sobre CIP. Sin embargo, Wang et al. [354] reportaron un efecto sinérgico en la mezcla de CIP y el insecticida Tiacloprid. La expresión génica está involucrada en las etapas iniciales de las respuestas al estrés en comparación con los marcadores toxicológicos más tradicionales, y es un complemento útil para evaluar los posibles efectos tóxicos y otros mecanismos [354], [355]. Los perfiles de expresión génica en *C. latirostris* mostraron patrones diferentes para la mezcla de plaguicidas en comparación con los compuestos individuales, lo que sugiere una diferencia en el modo de acción a nivel bioquímico y molecular. A su vez, podrían estar afectando otros factores como los excipientes, que en varios trabajos ya han reportado un efecto cito/genotóxicos diferencial [37], [38].

El crecimiento es una respuesta integrada de numerosos procesos fisiológicos, que influyen en el rendimiento del individuo [357]. Nuestros resultados revelaron diferentes efectos en los parámetros de crecimiento. Por un lado, no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos al inicio de este trabajo en ninguno de los experimentos (E3 y E4), lo que significa que los animales fueron asignados de manera homogénea entre los tratamientos.

En el E3, observamos que el grupo de Mx3 mostró aumentos en todos los parámetros evaluados (LT, LHC y peso), mientras que los animales expuestos a GLI y CPF presentaron menor crecimiento en peso con respecto al Mx3. En el caso del grupo CIP, no observamos ningún efecto en forma separada, pero cuando todos los compuestos están en la mezcla compleja (GLI + CPF + CIP) se mostró un patrón de efecto sinérgico. Además, observamos en la mezcla que los animales aumentaron en longitud (LHC y LT) con respecto a CN pudiendo atribuir este resultado a una posible interacción de sinergia como parte del efecto de mezcla entre todas las sustancias que se combinan. Probablemente será difícil establecer una relación directa de causa y efecto con un elemento específico debido a la complejidad ambiental bajo ciertas condiciones naturales.

En el E4, observamos que el GLI, CIP y la Mx3 indujeron un aumento en el LT y peso significativamente mayor que el control, lo cual podría considerarse un efecto tóxico sobre el metabolismo de los animales. Newbold, [358] considera que el aumento de peso asociado con productos químicos como los plaguicidas tiende a ocurrir a bajos niveles de exposición. Barraco et al. [259] reportaron resultados similares en *Salvator merianae*, encontrando mayor tamaño corporal en animales de áreas perturbadas respecto a no perturbadas. Sin embargo, Hayes et al. [258] reportó un efecto contrario en relación al tamaño corporal en *Xenopus laevis*, siendo el crecimiento menor en los animales expuestos a mezclas de plaguicidas en comparación con los controles. Se desconocen los mecanismos exactos que pueden producir aumento de peso en animales expuestos, pero podrían estar involucrados en el metabolismo alterado de la función tiroidea y/o en la homeostasis de la energía.

El impacto de los plaguicidas en las concentraciones recomendadas para su aplicación en cultivos de soja podría incidir en el estado de salud de esta especie. Los biomarcadores aplicados en el presente trabajo mostraron diferentes grados de sensibilidad a los plaguicidas en función del grupo experimental. Creemos que es necesario continuar investigando los posibles mecanismos de toxicidad subyacentes a las exposiciones a plaguicidas, especialmente en lo que respecta a las mezclas, que pueden afectar las respuestas fisiológicas de las poblaciones de caimanes y estimar el impacto ambiental de situaciones reales. Finalmente, estos conocimientos podrían ayudar a pronosticar y reducir los riesgos ambientales mediante la implementación de una gestión adecuada en el uso sostenible y en la conservación de los recursos naturales.

8. Conclusiones

El presente estudio proporciona nuevos conocimientos sobre los mecanismos de toxicidad de las formulaciones de GLI, CPF, CIP y las posibles interacciones de sus mezclas, un tema poco estudiado en nuestro país y en todo el mundo.

Las condiciones de exposición simularon la situación real que enfrentan las poblaciones naturales de caimanes durante la temporada reproductiva, considerando tanto las concentraciones aplicadas (recomendadas para los cultivos de soja) como el método de aplicación. Esto fue corroborado por las determinaciones de residuos de plaguicidas, que mostraron valores similares en muchos casos a los reportados en matrices ambientales de nuestro país.

Se demostró que los plaguicidas evaluados generaron genotoxicidad con una incidencia relevante de oxidación de bases en el ADN de la especie en estudio y a las concentraciones y mezclas ampliamente utilizadas en actividades agrícolas de nuestra región.

Se estandarizó y optimizó la técnica de extracción de ARN para la preservación y aislamiento de ARN de sangre de *C. latirostris*, y la obtención de altos rendimientos y calidad de ARNm, permitiendo el análisis de expresión de genes específicos. La alta eficiencia de nuestro método fue el resultado de optimizar los procedimientos de recolección, preservación y aislamiento, estableciendo las adaptaciones para el tejido utilizado.

Se puso a punto la técnica de qPCR para los genes involucrados en las principales rutas de defensa antioxidante contra EROs. Este es el primer reporte del análisis de estos genes en sangre para todas las especies de cocodrilos, pensados como posibles biomarcadores del estrés oxidativo. La técnica qPCR desarrollada para estos genes fue reproducible, sensible y específica, y podría aplicarse para estudiar los patrones de expresión en *C. latirostris* en diferentes situaciones de estrés.

Este trabajo de Tesis Doctoral permitió el estudio de las respuestas de los genes *cat* y *sod* en un organismo centinela expuesto a diferentes concentraciones de plaguicidas. Consideramos que es necesario continuar estudiando los mecanismos por los cuales la célula detecta las EROs e induce respuestas específicas.

La aplicación de nuevos biomarcadores altamente sensibles en sangre, como el análisis de la expresión génica, junto con los otros biomarcadores aplicados habitualmente, nos

permitió obtener una información confiable y complementaria, brindando una perspectiva más completa de las posibles consecuencias para las poblaciones silvestres de *C. latirostris* expuestas ambientalmente. A su vez, esta metodología es adecuada para ser utilizada en todas las especies de cocodrilianos, con el fin de analizar la respuesta temprana de individuos bajo estrés, sin provocar ningún daño a los animales.

Los efectos de las mezclas difieren según el parámetro analizado, mostrando una acción independiente o antagónica entre los componentes en el daño del ADN, la oxidación de bases y en los niveles de expresión de *cat* y *sod*. Es necesario profundizar la evaluación de los efectos de las mezclas de plaguicidas, mediante diferentes puntos finales que permitan evaluar las condiciones reales de exposición que esta y muchas otras especies enfrentan a diario en su medio natural.

Este estudio aporta información que contribuye a generar acciones para prevenir las consecuencias de la exposición a corto y largo plazo en *C. latirostris*, y evaluar rápidamente el impacto de los plaguicidas, u otros estresores ambientales en las poblaciones naturales.

9. Bibliografía

- [1] AE Carrasco, NE Sánchez, LE Tamagno (2012) Modelo agrícola e impacto socio ambiental en la Argentina: monocultivo y agronegocios. Serie Monográfica Sociedad y Ambiente: Reflexiones para una nueva América Latina (AUGM-Comité de Medio Ambiente, Jorge L. Frangi, SeDiCI, UNLP). La Plata, Argentina. p.135
- [2] AA Schaaf (2013) Uso de pesticidas y toxicidad: relevamiento en la zona agrícola de San Vicente, Santa Fe, Argentina. *Rev Mex de Ciencias Agrícolas* 4(2):323-331
- [3] M Arregui, R Scotta, D Sánchez (2006) Improved weed control with broad-leaved herbicides in glyphosate-tolerant soybean (*Glycine max*). *Crop Protection* 25(7):653-656
- [4] MC Arregui, D Sánchez, R Althaus, RR Scotta, I Bertolaccini (2010) Assessing the risk of pesticide environmental impact in several Argentinian cropping systems with a fuzzy expert indicator. *Pest Management Science* 66(7):736-40
- [5] C Rubione, SM Ward (2016) A New Approach to Weed Management to Mitigate Herbicide Resistance in Argentina. *Weed Science Special Issue*:641-648
- [6] Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2020) <http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>. Acceso abril 2020
- [7] F Barri, J Wahren (2010) El modelo sojero de desarrollo en la Argentina: tensiones y conflictos en la era del neocolonialismo de los agronegocios y el cientificismo-tecnológico. *Realidad Económica* 255:43-65
- [8] P Delvenne, F Vasen, AM Vara (2013) The “soyization” of Argentina: The dynamics of the “globalized” privatization regime in a peripheral context. *Technology in Society* 35:153-162
- [9] H Bronstein (2015) Argentina in for a Radical Post-Election Grains Output Increase. En: <https://www.reuters.com/article/us-argentina-election-grains-idUSKBN0TC0B Y20151123>. Acceso noviembre 2020
- [10] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2020)a <http://www.fao.org/faostat/es/#data>. Acceso abril 2020
- [11] M Burachik (2010) Experience from Use of GMOs in Argentinian agriculture, economy and environment. *New Biotechnology* 27(5):588-592
- [12] A Leguizamón (2014) Modifying Argentina: GM soy and socio--environmental change. *Geoforum* 53:149-160
- [13] WA Pengue (2005) Transgenic Crops in Argentina: The Ecological and Social Debt. *Bulletin of Science, Technology & Society* 25(4):314-322
- [14] DM Cáceres (2015)a Tecnología Agropecuaria y Agronegocios. La Lógica Subyacentedel Modelo Tecnológico Dominante. *Mundo Agrario* 16(31)
- [15] M Torrado (2016) Food Regime Analysis in a Postliberal Era: Argentina and the Expansion of Transgenic Soybeans. *Journal of Agrarian Change* 16(4):693-701

- [16] Instituto Multidisciplinario de Historia y Ciencias Humanas -CONICET- (2020) En: <http://cyt.rec.uba.ar/piubad/SiteAssets/Documentos%20del%20sitio/Productos%20Primarios/Mapas%20de%20Producci%C3%B3n/Soja%201976-2010%20--%202013.pdf> Acceso abril 2020
- [17] R Binimelis, W Pengue, I Monterroso (2009) 'Transgenic treadmill': responses to the emergence and spread of glyphosate-resistant johnsongrass in Argentina. *Geoforum* 40:623-63
- [18] DM Cáceres (2015)b Accumulation by dispossession and socio-environmental conflicts caused by the expansion of agribusiness in Argentina. *Journal of Agrarian Change* 15(1):116-147
- [19] P Lapegna (2016) Genetically modified soybeans, agrochemical exposure, and everyday forms of peasant collaboration in Argentina. *The Journal of Peasant Studies* 43(2):517-536
- [20] A Leguizamón (2016) Environmental Injustice in Argentina: Struggles Against Genetically Modified Soy. *Journal of Agrarian Change* 16(4):684-692
- [21] MM Vila-Aiub, MC Balbi, PE Gundel, CM Ghersa, SB Powles (2008)a Evolution of glyphosate-resistant johnsongrass (*Sorghum halepense*) in glyphosate-resistant soybean. *Weed Science* 55(6):566-571
- [22] MM Vila-Aiub, RA Vidal, MC Balbi, PE Gundel, F Trucco, CM Ghersa (2008)b Glyphosate-resistant weeds of South American cropping systems: an overview. *Pest Management Science* 64(4):366-371
- [23] AHC Van Bruggen, MM He, K Shin, V Mai, KC Jeong, MR Finckh, JG Morris. (2018) Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment* 616-617:255-268
- [24] Bolsa de Comercio de Rosario (2021). En: <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/en-el-2020> Acceso marzo 2021
- [25] C Gras, V Hernández (2008) Modelo productivo y actores sociales en el agro argentino / Productive Model and Social Actors in the Argentinian Farmland. *Revista Mexicana de Sociología* 70(2):227--259
- [26] D Cáceres, C Gras (2019) A tipping point for agricultural expansion? Technological changes and capital accumulation in Argentina's rural sector. *Journal of Agrarian Change* 20(1):79-97
- [27] NH Zeolla (2013) Costos y rentabilidad del cultivo de soja en la Argentina. Informe económico especial N° 2. Centro de estudios económicos y sociales CESO. En: https://www.ceso.com.ar/sites/www.ceso.com.ar/files/ceso_sector_agropecuario_3.pdf Acceso noviembre 2020
- [28] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2020)b. En: <http://www.fao.org/3/W1604S/w1604s04.htm#:~:text=El%20art%C3%ADculo%202%C2%B0%20del,o%20de%20los%20animales%2C%20las> Acceso noviembre 2020

- [29] I Mahmood, SM Imadi, K Shazadi, A Gul, KR Hakeem (2016) Effects of Pesticides on Environment. En: Plant, Soil and Microbes Volume 1: Implications in Crop Science (Ed. Hakeem et al). 2016, Springer, Cham, Suiza p.253-269
- [30] VI Lushchak, TM Matviishyn, VV Husak, JM Storey, KB Storey (2018) Pesticide toxicity: a mechanistic approach. EXCLI Journal 17:1101-1136
- [31] ILSI Argentina (2012) Clasificación Toxicológica y Etiquetado de Productos Fitosanitarios. Criterios Regulatorios Locales e Internacionales. ILSI Argentina, 2012. En: [https://www.casafe.org/wp-content/uploads/\(2019\)/05/Clasificacion-toxicologica-etiquetado-fitosanitarios.pdf](https://www.casafe.org/wp-content/uploads/(2019)/05/Clasificacion-toxicologica-etiquetado-fitosanitarios.pdf). Acceso abril 2020
- [32] IC Yadav, NL Devi (2017) Chapter 7 - Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. En: Environmental Science & Engineering. Vol 6: Toxicology. 2017, Studium Press, EUA, p.140-158
- [33] PM Donate, D Frederico (2019) Synthesis of New Agrochemicals, En: Sustainable Agrochemistry. (Ed: S Vaz). 2019, Springer Nature, Cham, Suiza. p.223-273
- [34] C Bolognesi, FD Merlo (2011) Pesticides: human health effects. En: Encyclopedia of environmental health, (Ed: Nriagu JO). 2011, Elsevier, Burlington, EUA p.438-53
- [35] OD Pórfido (2013) Los plaguicidas en la República Argentina. 2013, Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires.
- [36] S Soloneski, NV González, MA Reigosa, ML Larramendy (2007) Herbicide 2,4-D dichloro-phenoxyacetic acid (2,4-D)-induced cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro. Cell Biol. Int. 31:1316-22
- [37] S Soloneski, MA Reigosa, G Molinari, NV González, ML Larramendy (2008) Genotoxic and cytotoxic effects of carbofuran and furadan® on Chinese hamster ovary (CHOK1) cells. Mutat. Res. 656:68-73
- [38] ML Larramendy, G Molinari, NV González, JP Pili, J Vera Candiotti, MA Reigosa, S Soloneski (2010) Agroquímicos en Argentina. Genotoxicidad y citotoxicidad inducida por principios activos y sus formulaciones comerciales. Journal of Basic & Applied Genetics 21(2):6
- [39] S Beggel, L Werner, RE Connon, JP Geist (2009) Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). Science of The Total Environment 408:3169-3175.
- [40] I Coalova, S Mencacci, AV Fassiano (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 Toxicológica Argentina 21(1):5-14
- [41] FAO y OMS Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, y Organización Mundial de la Salud (2015) Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas. Artículo 2. <http://www.fao.org/3/a-i3604s.pdf> Acceso noviembre 2020

- [42] 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. 2010, Ginebra, Suiza. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44271/9789241547963_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y Acceso noviembre 2020
- [43] EXTTOXNET. <http://exttoxnet.orst.edu/tibs/glossary.htm>. Acceso abril 2020.
- [44] Comisión Económica para Europa de la ONU (2011) SGA. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) En: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html Acceso noviembre 2020
- [45] PH Thrall, JG Oakeshott, G Fitt, et al (2011) Evolution in agriculture: the application of evolutionary approaches to the management of biotic interactions in agroecosystems. *Evolutionary Applications* 4:200-215
- [46] S Varshney, S Hayat, MN Alyemeni, A Ahmad (2012) Effects of herbicide applications in wheat fields: is phytohormones application a remedy?. *Plant Signaling and Behavior* 7:570-575
- [47] F Torrens, G Castellano (2014) Molecular classification of pesticides including persistent organic pollutants, phenylurea and sulphonylurea herbicides. *Molecules* 19:7388- 7414
- [48] G Wagner, E Nadasy (2006) Effect of pre-emergence herbicides on growth parameters of green pea. *Communications in Agricultural and Applied Biological Science* 71:809-813
- [49] K Grossmann, T Ehrhardt (2007) On the mechanism of action and selectivity of the corn herbicide topramezone: a new inhibitor of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Pest Management Science* 63:429-439
- [50] TR Wright, G Shan, TA Walsh, et al (2010) Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 107 p.20240-20245
- [51] S Vats. (2015). Herbicides: History, Classification and Genetic Manipulation of Plants for Herbicide Resistance. *Sustainable Agriculture Reviews* 15:153-192
- [52] PK Mensah, CG Palmer, ON Odume (2015) Chapter 4 - Ecotoxicology of Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides - Toxicity to Wildlife and Humans. En: *Toxicity and Hazard of Agrochemicals* (Ed: ML Larramendy, S Solonesky), 2015, InTech, Londres, RU. p.93-112
- [53] KZ Guyton, D Loomis, Y Grosse, F El Ghissassi, L Benbrahim-Tallaa, N Guha, C Scoccianti, H Mattock, K Straif (2015) Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology* 16 (5):490-491
- [54] GL Pérez, MS Vera, L Miranda (2011) Chapter 16 - Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems. En: *Herbicides and Environment* (Ed: A Kortekamp). 2011. InTech Publications, Rijeka, Croacia. p.343-368

- [55] A Henderson, JA Gervais, B Luukinen, K Buhl, D Stone (2010) Glyphosate Technical Fact Sheet. National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. En: <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/glyphotech.html>. Acceso noviembre 2020
- [56] MC Arregui, A Lenardon, D Sanchez, MI Maitre, R Scotta, S Enrique (2004) Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean. *Pesticide Management Science* 60:163-166
- [57] GM Dill, RD Sammons, PCC Feng, F Kohn, K Kretzmer, A Mehrsheikh, EA Hauptfear (2010) Glyphosate: Discovery, Development, Applications, and Properties Glyphosate Resistance. En: *Crops and Weeds* (Ed: VK Nadula), 2010, John Wiley & Sons, Stonevile, EUA, p.1-33
- [58] C James. (2014). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: (2014). ISAAA Brief 49
- [59] JL Tadeo, C Sánchez-Brunete, L González (2008) Chapter 1 - Pesticides: Classification and Properties. En: *Analysis of pesticides in food and environmental samples*. (Ed: JL Tadeo). 2008, CRC Press, Boca Ratón, EUA. p.1-34
- [60] M Mertens, S Höss, G Neumann, J Afzal, W Reichenbecher (2018) Glyphosate, a chelating agent—relevant for ecological risk assessment?. *Environmental Science and Pollution Research* 25:5298-5317
- [61] AL Williams, RE Watson, JM Desesso (2012) Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: a critical analysis. *Journal of Toxicol Environ Health B Crit Rev* 15:39-96
- [62] M Kwiatkowska, B Huras, B Bukowska (2014) The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (in vitro). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 109:34-43
- [63] ZH Kudzin, DK Gralak, J Drabowicz, J Łuczak (2002) Novel approach for the simultaneous analysis of glyphosate and its metabolites, *Journal of Chromatography A* 947(1):129-141
- [64] SH Gosciny, J Unterluggauer, V Aldrian, S Hanot, S Masselter (2012) Determination of glyphosate and its metabolite AMPA (aminomethylphosphonic acid) in cereals after derivatization by isotope dilution and UPLC-MS/MS, *Food Anal. Methods* 5 :1177-1185
- [65] MT Meyer, KA Loftin, EA Lee, GH Hinshaw, JE Dietze, EA Scribner (2009) Determination of Glyphosate, its Degradation Product Aminomethylphosphonic Acid, and Glufosinate, in Water by Isotope Dilution and Online Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. En: *U.S. Geological Survey Techniques and Methods-book 5*, 2009, U.S. Geological Survey, Resto, EUA p.1-32
- [66] W Battaglin, D Kolpin, E Scribner, K Kuivila, M Sandstrom (2005) Glyphosate, other herbicides, and transformation products in Midwestern streams. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 41:323–332

- [67] D Landry, S Dousset, J Fournier, F Andreux (2005) Leaching of glyphosate and AMPA under two soil management practices in Burgundy vineyards. *Environ. Pollut.* 138:191–200
- [68] DW Sparling, C Matson, J Bickham, P Doelling-Brown (2006) Toxicity of glyphosate as glypro and LI700 to red-ear ed slider (*Trachemys scripta elegans*) embryos and early hatchlings. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25:2768-2774
- [69] CN Martini, M Gabrielli, GC Vila (2012) A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. *Toxicology In Vitro* 26:1007-1013
- [70] R Mesnage, B Bernay, GE Seralini (2012) Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology* 313(2-3):122-128
- [71] AC Achudume (2011) Chapter 1 - Insecticide. En: *Insecticides - Pest Engineering*. (Ed: F Perveen). 2012, IntechOpen, Rijeka, Croacia. p.3-22
- [72] J Stanley, G Preetha (2016) Chapter 1 - Pesticide Toxicity to Non-target Organisms Exposure, Toxicity and Risk Assessment Methodologies. En: *Pesticide Toxicity to Non-target Organisms* (Ed: J Stanley, G Preetha), 2016, Springer Nature, Dordrecht, Payses Bajos, p.1-98
- [73] H Li, F Cheng, Y Wei, M Lydy, J You (2017) Global occurrence of pyrethroid insecticides in sediment and the associated toxicological effects on benthic invertebrates: An overview. *Journal of Hazardous Materials* 324:258-271
- [74] J Scheleier, R Peterson (2012) The Joint Toxicity of Type I, II, and Nonester Pyrethroid Insecticides. *Ecotoxicology* 105:1
- [75] A Kaviraj, A Gupt. (2014) Biomarkers of Type II Synthetic Pyrethroid Pesticides in Freshwater Fish. *Bio Med Research International* 2014:1-2
- [76] TJ Shafer, KM Meyer (2005) Crofton, Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ Health Perspect* 113:123-136
- [77] Z Cao, TJ Shafer, TF Murray (2010) Mechanisms of Pyrethroid Insecticide-Induced Stimulation of Calcium Influx in Neocortical Neurons. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 336(1):197-205
- [78] P Carriquiriborde, J Díaz, H Mugni, C Bonetto, AE Ronco (2007) Impact of cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean production. *Chemosphere* 68:613-621
- [79] T Vani, N Saharan, SD Roy, R Ranjan, KA Pal, GM Siddaiah, R Kumar (2012) Alteration in haematological and biochemical parameters of *Catla catla* exposed to sub-lethal concentration of cypermethrin. *Fish Physiol Biochem* 38:1577-1584
- [80] F Spurlock, M Lee (2008) Chapter 1 - Synthetic pyrethroid use patterns, properties, and environmental effects. En: *Synthetic Pyrethroids* (Ed: J. Gan, F. Spurlock, P. Hendley, D.P. Weston). 2008, American Chemical Society, Washington DC, EUA. p.3-25

- [81] X Shi, A Gu, G Ji, Y Li, J Di, J Jin, F Hu, Y Long, Y Xia, C Lu, L Song, S Wang, X Wang (2011) Developmental toxicity of cypermethrin in embryo-larval stages of zebrafish. *Chemosphere* 85:1010-1016
- [82] LM Biga (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 at Oregon State University. An abstract of the dissertation. November 5, 125 pp.
- [83] KM Kuivila, ML Hladik, CG Ingersoll, NE Kemble, PW Moran, DL Calhoun, et al., (2012) Occurrence and potential sources of pyrethroid insecticides in stream sediments from seven U.S. metropolitan areas. *Environ. Sci. Technol.* 46:4297–4303
- [84] J You, S Pehkonen, DP Werson, MJ Lydy (2008) Chemical availability and sediment toxicity of pyrethroid insecticides to *Hyalella Azteca*: application to field sediment with unexpectedly low toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 27:2124–2130
- [85] AR Kumar, PS Rajini (2012) Organophosphorus Insecticides and Glucose Homeostasis. En: *Insecticides - Pest Engineering Insecticides - Pest Engineering*. (Ed: F Perveen) 2012, IntechOpen, Rijeka, Croacia, p.63-84
- [86] T Kwong (2002) Organophosphate Pesticides: Biochemistry and Clinical Toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring* 24:144-149
- [87] L Yang, YH Zhao, BX Zhang, CH Yang, X Zhang (2005) Isolation and characterization of a chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading bacterium. *FEMS Microbiol Letters* 251(1):67-73
- [88] X Zhang, K Starner, F Spurlock (2012) Analysis of chlorpyrifos agricultural use in regions of frequent surface water detections in California, USA. *Bull Environ Contam Toxicol* 89:978-84
- [89] H Xing, Z Zhang, H Yao, T Liu, L Wang, S Xu, S Li (2014) Effects of atrazine and chlorpyrifos on cytochrome P450 in common carp liver. *Chemosphere* 104:244-250
- [90] Y Jin, Z Liu, T Peng, Z Fu (2015) The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: A survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. *Fish & Shellfish Immunology* 43:405-414
- [91] LG Wang, X Jiang, DY Yan (2004) Comparison of two procedures for extraction and cleanup of organophosphorus and pyrethroid pesticides in sediment. *Pedosphere* 14:229-234
- [92] CV Lakshmi, M Kumar, S Khanna (2008) Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil. *Int Biodeterior Biodegrad* 62:204-209
- [93] I Mangas, Z Radic, P Taylos, M Ghassemian, H Candela, E Vilanova, J Estévez (2016) Butyrylcholinesterase identification in a phenylvalerate esterase-enriched fraction sensitive to low mipafox concentrations in chicken brain. *Archives of Toxicology* 91:909-919
- [94] MK Harishankar, C Sasikala, M Ramya (2013) Efficiency of the intestinal bacteria in the degradation of the toxic pesticide, chlorpyrifos. *Biotech* 3:137-142

- [95] G Kulshrestha, A Kumari (2011) Fungal degradation of chlorpyrifos by *Acremonium* sp. strain (GFRC-1) isolated from a laboratory-enriched red agricultural soil. *Biol Fertil Soils* 47:219-225
- [96] M. Sogorb, E Vilanova, V Carrera (2004) Future applications of phosphotriesterases in the prophylaxis and treatment of organophosphorus insecticide and nerve agent poisonings. *Toxicology Letters* 151:219-233
- [97] M Sogorb, E Fuster, E Del Río, J Estévez, E Vilanova (2016) Effects of mipafox, paraoxon, chlorpyrifos and its metabolite chlorpyrifos-oxon on the expression of biomarker genes of differentiation in D3 mouse embryonic stem cells. *Chemico-Biological Interactions* 259(B):368-373
- [98] A Hildebrandt, M Guillamon, S Lacorte, R Tauler, D Barcelo (2008) Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Research* 42(13):3315-3326
- [99] EN Papadakis, Z Vryzas, A Kotopoulou, K Kintzikoglou, KC Makris, E Papadopoulou-Mourkidou (2015) A pesticide monitoring survey in rivers and lakes of northern Greece and its human and ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicology Environmental Safety* 116:1-9
- [100] MK Uddin (2018) Agrochemicals and Environmental Risks. *Environmental Policy and Law* 48(2):91-96
- [101] MF Silva-Barnia, M Gonzalez, F Waniab, YD Leib, KSB Miglioranza (2017) Spatial and temporal distribution of pesticides and PCBs in the atmosphere using XAD-resin based passive samplers: A case study in the Quequén Grande River watershed, Argentina. *Atmospheric Pollution Research*. 9(2):238-245
- [102] M Aizen, LA Garibaldi, M Dondo (2009) Expansión de la soja y diversidad de la agricultura argentina. *Ecología Austral* 19:45-54
- [103] Grand View Research Inc (2014) Biosurfactants Market by Product (Market Research Report Code: GVR20). En: [http:// www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biosurfactants-industry](http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biosurfactants-industry). Acceso noviembre 2020
- [104] L. Gaona, F Bedmar, V Gianelli, AV Faberi, H Angelini (2019) Estimating the risk of groundwater contamination and environmental impact of pesticides in an agricultural basin in Argentina. *International Journal of Environmental Science and Technology* 16:6657-6670
- [105] ET Rodrigues, I Lopes, MÂ Pardal (2013) Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: a review. *Environment International* 53:18-28
- [106] S Stehle, R Schulz (2015) Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:5750-5755
- [107] CA Morrissey, P Mineau, JH Devries, F Sanchez-Bayo, M Liess, MC Cavallaro, K Liber (2015) Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environment International* 74:291-303
- [108] D Connell (2005) Chapter 8 – Pesticides. En: *Basic Concepts of Environmental Chemistry*. Second edition. (Ed: D Connell) 2005, CRC Press, Boca Raton, EUA, p.167

- [109] B Bonicelli, E Cotteux, JP Douzals (2015) Pesticides applications assessment in banana crop conditions: a methodological approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22:17255–17259
- [110] JA Noldin, DS Eberhardt, R Knoblauch (2012) Produção de arroz irrigado com baixo impacto ambiental. En: *Recomendações para a produção de arroz em Santa Catarina (Sistema pre-germinado)* (Ed: DS Eberhardt, MA Schiocchet), 2012, Epagri, Florianópolis, BR. p.71–74
- [111] R Loewy (2011) Capítulo 4 Dinámica ambiental de plaguicidas. En: *Clasificación y toxicología de plaguicidas* (Ed: OL Anguiano, CM Montagna). 2011, EDUCO, Neuquén, Argentina p.237-265
- [112] M Miyamoto, H Tanaka, T Katagi, (2008) Ecotoxicological Risk Assessment of Pesticides in Aquatic Ecosystems. *Sumitomo Kagaku* 2008-I:27-44.
- [113] MC Sasal, AE Andriulo, MG Wilson, SI Portela (2010) Glyphosate losses by drainage and runoff from Mollisols under no-till agriculture. *Información Tecnológica* 21(5):135-142
- [114] VC Aparicio, E De Geronimo, D Marino, J Primost, P Carriquiriborde, JL Costa (2013) Environmental fate of glyphosate and amino- methylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93:1866-1873
- [115] R Van der Oost, J Beyer, NP Vermeulen (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2003(13):57-149
- [116] KR Solomon, JA Carr, LH Du Preez, JP Giesy, RJ Kendall, EE Smith, et al. (2008) Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. *Critical Reviews in Toxicology* 38(9):721-772.
- [117] JE Primost, D Marino, V Aparicio, JL Acosta, P Carriquiriborde (2017) Glyphosate and AMPA, “pseudo-persistent” pollutants under realworld agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas. *Environmental Pollution* 229:771-779
- [118] L Hunt, C Bonetto, V Resh, DVF Buss, S Fanelli, N Marrochi, M Lydy (2016) Insecticide concentrations in stream sediments of soy production regions of South America. *Science of the Total Environment* 547:114-124
- [119] MA Etchegoyen, AE Ronco, P Almada, M Abelando, DJ Marino (2017) Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. *Environ Monit Assess* 189(2):1-12
- [120] D Marino, A Ronco (2005) Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bull Environ Contam Toxicol* 75:820-826
- [121] Z Vryzas, C Alexoudis, G Vassiliou, K Galanis, E Papadopoulou-Mourkidou (2011) Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74:174-181
- [122] A Beeb (2001) What do sentinels stand for? *Environ Pollut* 112:285-298

- [123] GA Fox (2001) Wildlife as sentinels of human health effects in the Great Lakes-St. Lawrence basin. *Environ Health Perspect* 109(6):853-861
- [124] N Basu, A Scheuhammer, S Bursian, J Elliott, K Rouvinen-Watt, H Chan (2007) Mink as a sentinel species in environmental health. *Environmental Research* 103:130-144
- [125] VK Mishra, G Singh, R Shukla (2019) Chapter 6 - Impact of Xenobiotics Under a Changing Climate Scenario, En: *Climate Change and Agricultural Ecosystems*, (Ed: KK Choudhary, AK Singh), 2019, Woodhead Publishing, Cambridge, UK. p. 133-151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816483-9.00006-2>
- [126] B Berthet (2013) Chapter 7 - Sentinel Species. En: *Ecological Biomarkers Indicators of Ecotoxicological Effects* (Ed: C Amiard-Triquet, JC Amiard, PS Rainbow). 2013, CRC Press, Boca Ratón, EUA. p.155-186
- [127] S Islam, M Tanaka (2004) Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin* 48:624-649
- [128] Khan, M., Law, F (2005) Adverse effects of pesticides and related chemicals on enzyme and hormone systems of fish, amphibians and reptiles: a review. *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences* 42(4):315-323
- [129] T Cavas, S Könen (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(4):263-268
- [130] L Kier (2015) Review of genotoxicity biomonitoring studies of glyphosate-based formulations. *Toxicology* 45(3):209-218
- [131] GM Rand (1985) Behavior. En: *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications* (Ed: GM Rand, SR Petrocelli). 1985, Hemisphere Publishing, Washington DC, EUA. p.221-263
- [132] NRC, Committee on Animals as Monitors of Environmental Hazards (1991) *Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards*. National Research Council, National Academy Press, Washington DC, EUA
- [133] GJ White (2004) Selection of ecological indicators for monitoring terrestrial systems. En: *Environmental Monitoring*, (Ed: GB Wiersma). 2004, CRC Press, Boca Raton, EUA, p.263-282
- [134] I Cunha, L Guilhermino (2006) Environmental Monitoring Protocol for Selection of Sentinel Species and Collection of Specimens. EROCIPS, p.1-3. En: https://www.ciimar.up.pt/hns/documents/postspill/EROCIPS_-_2006_-_Selection_and_Collection_of_Sentinel_Species_Guideline.pdf Acceso abril 2020
- [135] MH Depledge (1994) Genotype toxicity: Implications for individuals and populations. *Environ Health Perspect* 102:101-104
- [136] M Roméo, L Giambérini (2013) History of Biomarkers. En: *Ecological Biomarkers Indicators of Ecotoxicological Effects* (Ed: C Amiard-Triquet, JC Amiard, PS Rainbow). 2013, CRC Press, Boca Ratón, EUA. p.15-44

- [137] SE Hook, EP Gallagher, GE Batley (2014) The Role of Biomarkers in the Assessment of Aquatic Ecosystem Health. *Integr Environ Assess Manage.* 10:327–41
- [138] SM Adams (2004) Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems. *Mar Pollut Bull.* 51: 649–57
- [139] R Van der Oost, J Beyer, NPE Vermeulen (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol.* 13:57–149
- [140] D Schlenk (1999) Necessity of Defining Biomarkers for Use in Ecological Risk Assessments. *Mar Pollut Bull.* 39:48–53
- [141] RD Handy, TS Galloway, MH Depledge (2003) A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology*12:331–43
- [142] A Carballo, MD Mudry (2006) Indicadores y marcadores biológicos. En: *Genética Toxicológica* (Ed: MD Mudry, MA Carballo). 2006, De los Cuatro Vientos Editorial, Buenos Aires. p.83-108
- [143] J Amiard, C Amiard-Triquet (2013) Molecular and Histocytological Biomarkers. En: *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects* (Ed: C Amiard-Triquet, JC Amiard, PS Rainbow). 2013, CRC Press, Boca Ratón, EUA. p.75-106
- [144] R Kendall, TA Anderson, RJ Baker, CM Bens, et al. (2005) Capítulo 29 - Ecotoxicología. En: *Fundamentos de toxicología de Cassaret y Doull.* (Ed: C Klaasen, J Watkins). 2005, McGraw-Hill/Interamericana, Madrid, España. p.428-437
- [145] JG Scandalios (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38:995-1014
- [146] MD Temple, GG Perrone, IW Dawe (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* 15:319-326
- [147] V Lushchak (2011) Environmental induced oxidative stress in aquatic animal. *Aquatic Toxicology* 101:13-30
- [148] JF Turrens (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 552(2):335-344
- [149] S Cortés-Iza, A Rodríguez (2018) Oxidative stress and pesticide disease: a challenge for toxicology/Estrés oxidativo y enfermedad por pesticidas: un reto en toxicología. *Rev Fac Med* 2:261-267
- [150] B Halliwell (2006) Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141:312-322
- [151] Halliwell, B y Gutteridge, JMC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine* Fourth. 2007, Oxford University Press, Nueva York, EUA. p.30-151
- [152] YM Go, DP Jones (2008) Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochimica et biophysica acta* 1780(11):1273-1290

- [153] E Birben, UM Sahiner, C Sackesen, S Erzurum, O Kalayci (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defens. WAO Journal 5:9-19
- [154] OM Ighodaroa, OA Akinloyeb (2018) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine 54:287-293
- [155] K Rahman (2007) Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clin Intervent Aging 2:219
- [156] V Lobo, A Patil, A Phatak, N Chandra (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. Pharmacogn Rev 4:118
- [157] A Hedayati, SM Hoseini, M Ghelichpoura (2014) Acute toxicity of waterborne manganese to *Rutilus caspicus* (Yakovlev, 1870) -gill histopathology, immune indices, oxidative condition, and saltwater resistance. Toxicol Environ Chem 96:1535-1545
- [158] L Díaz (2001) Radicales Libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Revista Cubana de Medicina Militar 30:36-44
- [159] S Mena, A Ortega, J Estrela (2009) Oxidative stress in environmental - induced carcinogénesis. Mutation Research 674:36-44
- [160] K Dasuri, L Zhang, JN Keller (2013) Oxidative stress, neuro degeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. Free Radic Biol Med 62:170-185
- [161] L Adams, MC Franco, AG Estevez (2015) Reactive nitrogen species in cellular signaling. Exp Biol Med 240:711-717
- [162] JF Muniz, L McCauley, J Schere, M Lasarev, M Koshy, YW Know, V Nazar-Stewart, GE Kisby (2008) Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: A pilot study. Toxicology and Applied Pharmacology. 227:97-107
- [163] S Gupta, et al. (2008) The impact of oxidative stress on female reproduction and ART: evidence-based review. En: Infertility and assisted reproduction (Ed: A Makrigiannakis, B Rizk, JG Velasco, H Sallam). Cambridge UP, Nueva York, EUA. p.178-186
- [164] M Schieber, NS Chandel (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. Current biology 24:453-462
- [165] LJ Marnett (2002) Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. Toxicology 2002(181-182):219- 222
- [166] AJ Hulbert, R Pamplona, R Buffenstein, WA Buttemer (2007) Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals Physio. Rev 87:1175-1213
- [167] L Díaz (2001) Radicales Libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Revista Cubana de Medicina Militar 30:36-44
- [168] RT Di Giulio, JN Meyer (2008) Reactive oxygen species and oxidative stress. En: The Toxicology of Fishes (Ed. Di Giulio RT, Hinton DE). CRC Press, Boca Raton, EUA. p.273-326

- [169] JN Pearson, M Patel (2016) The role of oxidative stress in organophosphate and nerve agent toxicity. *Annals of New York Academy of Sciences* 1378(1):17-24
- [170] JK Bhardwaj, M Mittal, P Saraf, P Kumari (2018) Pesticides induced oxidative stress and female infertility: a review. *Toxin Reviews* 39(1):1-13
- [171] R Franco, R Sanchez-Olea, EM Reyes-Reyes, MI Panayiotidis (2009) Environmental toxicity oxidative stress and apoptosis: Me´nage a`Trois. *Mutation Research* 674(1-2):3-22
- [172] A Slaninova, et al. (2009) A review: oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuro endocrinology letters* 30:2-12
- [173] X Wang, A Martı´nez, M Dai, D Chen, I Ares, A Romero, A Castellano, M Martinez, J Rodriguez, M Martı´nez-Larrañaga, A Anadón, Z Yuan (2016) Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review. *Environmental Research* 149:86-104
- [174] K Hilscherova, AL Blankenship, M Nie, KK Coady, BL Upham, JE Trosko, JP Giesy (2003) Oxidative stress in liver and brain of the hatchling chicken (*Gallus domesticus*) following in ovo injection with TCDD. *Comparative biochemistry and physiology part-c toxicology and pharmacology* 136:29-45
- [175] L Gluszczak, DS Miron, BS Moraes, RR Simões, R.R., MRC Schetinger, VM Morsch, VL Loro (2007) Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative biochemistry and physiology part-c toxicology and pharmacology* 146:519-524
- [176] Y Jin, X Zhang, L Shu, L Chen, L Sun, H Qian, W Liu, Z Fu (2010) Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 78:846-852
- [177] KA Modesto, CBR Martinez (2010) Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78:294-299
- [178] MF Simoniello, F Gigiena, GL Poletta, A Loteste, E Kleinsorge, M Campana, J Scagnetti, JM Parma (2009) Alkaline Comet Assay for Genotoxic Effect Detection in Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology* 83:155-158
- [179] MF Simoniello, EC Kleinsorge, J Scagnetti, C Mastandrea, RA Grigolato, AM Paonessa, MA Carballo (2010) Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population. *Biomarkers* 15(1):52-60
- [180] MC Hardstone, JG Scott (2010) A review of the interactions between multiple insecticide resistance. *Pestic Biochem Physiol* 97:123-128
- [181] PM Rui, TS Neuparth, S Caeiroa, J Lobo, M Martins, AM Ferreira, M Caetano, C Vale, TA DelValls, MH Costa (2011) Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: Laboratory versus in situ studies. *Environmental Research* 111:25-36

- [182] XY Mu, S Pang, XZ Sun, JJ Gao, JY Chen, XF Chen, XF Li, CJ Wang (2013) Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. *Environmental Pollution* 175:147-157
- [183] S Ullah, MJ Zorrieh-Zahra (2015) Ecotoxicology: A Review of Pesticides Induced Toxicity in Fish. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 3(1):40-57
- [184] M Kaur, R Jindal (2017) Oxidative Stress Response in Liver, Kidney and Gills of *Ctenopharyngodon Idellus* (Cuvier & Valenciennes) Exposed to Chlorpyrifos. *MOJ Biol Med* 1(4):103-112
- [185] M Rainio, A Margus, P Lehmann, M Helander, M.L Lindström (2019) Effects of a glyphosate-based herbicide on survival and oxidative status of a non-target herbivore, the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part-C* 215:47-55
- [186] N Özok (2020) Effects of cypermethrin on antioxidant enzymes and lipid peroxidation of Lake Van fish (*Alburnus tarichi*). *Drug and Chemical Toxicology* 43(1):51-56
- [187] S Mostafalou, M Abdollahi (2013) Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. Invited Review Article. *Toxicol App Pharm* 268:157-177
- [188] R Araldi, B Rechiutti, T Mendes, E Ito, E Souza (2014) Mutagenic potential of *Cordia ecalyculata* alone and in association with *Spirulina maxima* for their evaluation as candidate anti-obesity drugs. *Genet Mol Res* 13:5207-5220
- [189] K Wada, T Yoshida, N Takahashi, K Matsumoto (2014) Effects of seven chemicals on DNA damage in the rat urinary bladder: a comet assay study. *Mutat ReSToxicol Environ Mutagen* 769:1-6
- [190] A Collins, A Azqueta. (2012). DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. *Mutation Research* 736:122-129
- [191] T Çavaş (2017) The use of fish as model aquatic organisms in genotoxicity studies. *Nontraditional aquatic models*, En: *Ecotoxicology and Genotoxicology*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. p. 243-277
- [192] NP Singh (1996) Microgel electrophoresis of DNA from individual cells: principles and methodology, En: *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*.(Ed: GP Pfeifer) Plenum Press, New York, EUA. p.3-24
- [193] A Azqueta, L Arbillaga, A López de Cerain, A Collins (2013) Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. *Mutagenesis* 28:271-277
- [194] A Azqueta, AR Collins (2013) The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol* 87:949-968
- [195] A Azqueta, J Slyskova, SAS Langie, O Gaivão, A Collins (2014) Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Front Genet* 5:1-8

- [196] A Collins, M Dusinska, M Franklin, M Somorovska, H Petrovska, S Duthie, et al. (1997) Comet Assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen* 30:139-46
- [197] DR Dixon, AM Pruski, LRJ Dixon, AN Jha (2002) Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis* 17:495-507
- [198] RF Lee, S Steinert (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/ Comet Assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research* 544(1):43-64
- [199] R Araldi, T Correia de Melo, T Mendes, P Sa´ Junior, B Nozima, E Ito, E Franco de Carvalho, E Barreiros de Souza, R Cassia Stocco (2015) Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 72:74-82
- [200] N Ojha, N Srivastava (2014) In vitro studies on organophosphate pesticides induced oxidative DNA damage in rat lymphocytes. *Mutation Research* 761:10-17
- [201] A Jabłońska-Trypuć (2017) Pesticides as Inducers of Oxidative Stress. *Reactive oxygen species* 3(8):96-110
- [202] MS Cooke, MD Evans, M Dizdaroglu, J Lunec (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* 17:1195-1214
- [203] S Jiranusornkul, CA Laughton (2008) Destabilization of DNA duplexes by oxidative damage at guanine: implications for lesion recognition and repair. *Journal of The Royal Society Interface* 5:191-198
- [204] T Kryston, A Goergiev, P Polycarpou, G Georgakilas (2011) Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research* 711:193-201
- [205] AR Collins (2009) Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research* 681:24-32
- [206] AR Collins (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26:249-261
- [207] XH Yin, GN Zhu, XB Li, SY Liu (2009) Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by Comet assay and Micronucleus test. *Mutation Research* 680:2-6
- [208] R Lajmanovich, AM Attademo, FM Simoniello, GL Poletta, CM Junges, PM Peltzer, P Grénon, MC Cabagna-Zenklusen (2015) Harmful Effects of the 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
- [209] LG Schaumburg, PA Siroski, GL Poletta, MD Mudry (2016) Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pest Biochem Phys* 130:71-78
- [210] JM Pérez-Iglesias, C Ruiz de Arcaute, GS Natale, S Solonesky, ML Larramendy (2017) Evaluation of imazethapyr-induced DNA oxidative damage by alkaline Endo III-

and Fpg-modified single-cell gel electrophoresis assay in *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol Environ Saf* 142:503-508

[211] C Ruíz de Arcaute, N Ossana, JM Perez-Iglesia, S Soloneski, ML Larramendy (2019) Auxinic herbicides induce oxidative stress on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). *Environmental Science and Pollution Research* 26:20485-20498

[212] M Fenech (2008) The Micronucleus Assay Determination of Chromosomal Level DNA Damage. En: *Environmental Genomics. Methods in Molecular Biology*, vol 410. (Ed: CC Martin). 2008, Humana Press, Ottawa, CA. p 185-216

[213] A Rapp, C Bock, H Dittmar, KO Greulich (2000) UV-A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by COMET-FISH depends on gene density and not on the chromosome size, *J Photochem Photobiol Biol* 56(2-3):109-117

[214] M Mladinic, D Zeljezic. (2014) Modification of comet-FISH technique by using temperature instead of chemical denaturation. *MethodsX* 1:162-167

[215] VJ McKelvey-Martin, DJ McKenna (2009) Chapter 6 - Development and Applications of the Comet-FISH Assay for the Study of DNA Damage and Repair. En: *The Comet Assay in Toxicology* (Ed: A Dhawan, D Anderson). 2009, RSC Publishing, Cambridge, RU. p.129-150

[216] DJ McKenna, BA Doherty, CS Downes, SR McKeown, VJ McKelvey-Martin (2012) Use of the comet-FISH assay to compare DNA damage and repair in p53 and hTERT genes following ionizing radiation, *PLoS ONE* 7(11):1-10

[217] G Hovhannisyan (2010) Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Molecular Cytogenetics* 3(17):2-11

[218] D Voelker, C Vess, M Tillmann, R Nagel, GW Otto, R Geisler, K Schirmer, S Scholz (2007) Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebra fish embryos and larvae. *Aquat Toxicol* 81:355-364

[219] MJ Aardema, JT MacGregor (2003) Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies. *Mutation Research* 499:13-25

[220] MD Waters, JM Fostel (2004) Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nat Rev Genet* 5:936

[221] M Zhao, Y Zhang, C Wang, Z Fu, W Liu, J Gan (2009) Induction of macrophage apoptosis by an organochlorine insecticide acetofenate. *Chem Res Toxicol* 22:504-510

[222] Z Zhang, Q Liu, J Cai, J Yang, Q Shen, S Xu (2017) Chlorpyrifos exposure in common carp (*Cyprinus carpio* L.) leads to oxidative stress and immune responses. *Fish Shellfish Immunol* 67:604-611

[223] EV Paravani, MF Simoniello, GL Poletta, VH Casco (2019) Cypermethrin induction of DNA damage and oxidative stress in zebrafish gill cells. *Ecotoxicol Environ Saf* 173:1-7

- [224] M Ghelichpoura, AT Mirghaeda, SH Hoseinifar, M Khalilic, M Youseifd, A Perez-Jimenez (2019) Expression of immune, antioxidant and stress related genes indifferent organs of common carp exposed to indoxacarb. *AquatToxicol* 208:208-216
- [225] R Martínez-Alvarez, AE Morales, A Sanz (2005) Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15:75-88
- [226] T Liu, L Li, Z Zhang, Y Wang (2015) Transcriptional inhibition of the Catalase gene in phosphine-induced oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 124:1-7
- [227] PA Olsvik, T Kristensen, R Waagbø, BO Rosseland, KE Tollefsen, G Baeverfjord, MH Berntssen (2005) mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. *Comp Biochem Phys C* 141:314-323
- [228] PM Craig, CM Wood, GB McClelland (2007) Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Am J Physiol-Regul I* 293:1882-1892
- [229] S Sun, X Ge, J Zhu, F Xuan, X Jiang (2014) Identification and mRNA expression of antioxidant enzyme genes associated with the oxidative stress response in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) in response to acute nitrite exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 159:69-77
- [230] M Karaca, L Varihs, K Korkmaz, O Özyaydın, F Percind, H Orhan (2014) Organochlorine pesticides and antioxidant enzymes are inversely correlated with liver enzyme gene expression in *Cyprinus carpio*. *Toxicology Letters* 230:198-207
- [231] T Uno, M Ishizukab, T Itakura (2018) Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental toxicology and pharmacology* 34:1-13
- [232] FA Yamamoto, GF Diamante, MS Santana, DR Santos, DR Bombardeli, CC Martins, CA Oliveira Ribeiro, D Schlenk (2018) Alterations of cytochrome P450 and the occurrence of persistent organic pollutants in tilapia caged in the reservoirs of the Iguaçú River. *Environmental Pollution* 240:670-682
- [233] C Delescluse, N Ledirac, R Li, M Piechoky, R Hines, R Rahmani (2001) Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells. *Biochemical Pharmacology* 61:399-407
- [234] RO Kim, BM Kim, DS Hwang, DW Au, JH Jung, WJ Shim, et al. (2013) Evaluation of biomarker potential of cytochrome P450 1A (CYP1A) gene in the marine medaka, *Oryzias melastigma* exposed to water-accommodated fractions (WAFs) of Iranian crude oil. *Comp Biochem Physiol C* 157:172-182
- [235] Z Siroká, J Drastichová (2004) Biochemical Markers of Aquatic Environment Contamination Cytochrome P450 in Fish. AReview. *Acta Vet* 73:123-132
- [236] HY Yang, TH Lee (2015) Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review. *Biochemistry & Molecular Biology Reports* 48:200-208

- [237] C Wang, et al. (2009) Sublethal effects of pesticide mixtures on selected biomarkers of *Carassius auratus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28:414-419
- [238] S Gaaied, et al. (2019) Gene expression patterns and related enzymatic activities of detoxification and oxidative stress systems in zebrafish larvae exposed to the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide. *Chemosphere* 224:289-297
- [239] M Pallardy, A Biola, H Lebec, J Bréard (1999) Assessment of apoptosis in xenobiotic-induced immunotoxicity. *Methods* 19:36-47
- [240] Y Jin, S Zheng, Z Fu (2011)a Embryonic exposure to cypermethrin induces apoptosis and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology* 30:1049-1054
- [241] WN Xu, WB Liu, ZP Liu (2009) Trichlorfon-induced apoptosis in hepatocyte primary cultures of *Carassius auratus gibelio*. *Chemosphere* 77:895-901
- [242] Y Jin, S Zheng, Y Pu, L Shu, L Sun, W Liu (2011)b Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 82:398-404
- [243] X Shi, A Gu, G Ji, Y Li, J Di, J Jing, F Hu, F Long, F Xia, C Lu, L Song, S Wang, X Wang (2011) Developmental toxicity of cypermethrin in embryo-larval stages of zebrafish. *Chemosphere* 85:1010-1016
- [244] DS Hwang, JS Lee, JS Rhee, J Han, YM Lee, et al. (2010) Modulation of p53 gene expression in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* exposed to alkylphenols. *Marine Environmental Research* 69:77-80
- [245] AW Abu-Qare, MB Abou-Donia (2001) Biomarkers of apoptosis: release of cytochrome c, activation of caspase-3, induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, increased 3-nitrotyrosine, and alteration of p53 gene. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B* 4:313-332
- [246] YM Lee, JS Rhee, DS Hwang, IC Kim, S Raisuddin, JS Lee (2008) Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 147:150-157
- [247] ME Robu, JD Larson, A Nasevicius, S Beiraghi, C Brenner, SA Farber, SC Ekker (2007) P53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet* 3:78
- [248] J Deng, L Yu, C Liu, K Yu, X Shi, LW Yeung, PK Lam, RS Wu, B Zhou (2009) Hexabromocyclododecane-induced developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos. *Aquat Toxicol* 93:29-36
- [249] DL Sheader, TD Williams, BP Lyons, JK Chipman (2006) Oxidative stress response of European flounder (*Platichthys flesus*) to cadmium determined by a custom cDNA microarray. *Marine Environmental Research* 62:33-44
- [250] RP Amin, HK Hamadeh, PR Bushel, L Bennett, CA Afshari, RS Paules (2002) Genomic interrogation of mechanism (s) underlying cellular responses to toxicants. *Toxicology* 181:555-563

- [251] KJ Eder, MA Clifford, RP Hedrick, HR Köhler, I Werner (2008) Expression of immunoregulatory genes in juvenile Chinook salmon following exposure to pesticides and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Shellfish Immunol* 25:508-516
- [252] GL Poletta, EC López González, PM Burella, ML Romito, PA Siroski, MD Mudry (2017) Chapter 20 - Biomarkers of environmental contamination in reptile species: the effect of pesticide formulations on broad-snouted caiman *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). En: *Issues in Toxicology* No. 33, "Ecotoxicological and Genotoxicological, Volume 1: Non-traditional Aquatic Models" (Ed: ML Larramendy). 2017, RSC Press, Cambridge, RU. p.467-517
- [253] WL Rose, MN Roger, PG Green, S Norris, T Fan, EH Smith, GN Cherr, SL Anderson (2006) Using an integrated approach to link biomarker responses and physiological stress to growth impairment of cadmium-exposed larval topmelt. *Aquatic Toxicology* 80:298-308
- [254] GL Poletta, A Larriera, E Kleinsorge, MD Mudry (2009) Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutation Research* 672:95-102
- [255] GL Poletta, E Kleinsorge, A Paonessa, MD Mudry, A Larriera, PA Siroski (2011) Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed in ovo to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74:852-859
- [256] EC López González, PA Siroski, GL Poletta (2019) Genotoxicity induced by widely used pesticide binary mixtures on *Caiman latirostris* (Broad- snouted caiman). *Chemosphere* 232:337-334
- [257] AP Mestre, PS Amavet, AI Vanzetti, MS Moleon, MV Parachu Marco, GL Poletta, PA Siroski (2019) Effects of cypermethrin (pyrethroid), glyphosate and chlorpyrifos (organophosphorus) on the endocrine and immune system of *Salvator merianae* (Argentine tegu). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 169:61-67
- [258] TB Hayes, P Case, S Chui, D Chung, C Haeffele, K Haston, M Lee, VP Mai, Y Marjuoa, J Parker, M Tsui (2006) Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environ Health Perspect* 114:40-50
- [259] LA Barraco (2015) Risk assessment of the Nonnative Argentine Black and white. *Ecosystems* 7(8):437-444
- [260] JS Lytle, TF Lytle (2001) Use of plants for toxicity assessment of estuarine ecosystems. *Environ Toxicol Chem* 20:68-83
- [261] AR Paganelli, V Gnazzo, H Acosta, SL Lopez, AE Carrasco (2010) Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical Research In Toxicology* 23:1586-1595
- [262] K Uggini Gowri, P Patel, S Balakrishnan (2012) Embryotoxic and teratogenic effects of pesticides in chick embryos: A comparative study using two commercial formulations. *Environ Toxicol* 27(3):166-174

- [263] J Alföldi, et al. (2011) The genome of the green anole lizard and a comparative análisis with birds and mammals. *Nature* 477:587-591
- [264] A John St., et al. (2012) Sequencing three crocodilian genomes to illuminate the evolution of archosaurs and amniotes. *Genome Biol* 13:415
- [265] J Read (1998) Are geckos useful bioindicators of air pollution? *Oecologia* 114:180-187
- [266] CJ Raxworthy, RG Pearson, BM Zimkus, S Reddy, AJ Deo, RA Nussbaum, CM Ingram (2008) Continental speciation in the tropics: contrasting biogeographic patterns of divergence in the uroplatus leaf-tailed gecko radiation of Madagascar. *Journal of Zoology* 275:423-440
- [267] A Larriera, A Imhof, AP Siroski (2008) Estado actual de los programas de conservación y manejo de género Caiman en Argentina. En: *Contribución al conocimiento del Genero Caiman de Suramerica* (Ed: JA Castroviejo, J Arzaguena, A Velasco). 2008, Public. Asoc. Amigos de Doña Ana 18, Sevilla, España. p.139-179
- [268] P Siroski, L.A.B Bassetti, C Piña, A Larriera (2020) Caiman latirostris. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T46585A3009813. En: https://www.iucnredlist.org/api/v4/assessments/3009813/distribution_map/jpg. Acceso diciembre 2020
- [269] A Larriera, A Imhof (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* (Ed: ML Bolkovic, D Ramadori). 2006, Dirección de Fauna Silvestre. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires. p.51-64
- [270] CASAFE: Cám. de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes Argentina., (2020). En: <http://www.casafe.org/>. Acceso noviembre 2020
- [271] GL Poletta, A Larriera, E Kleinsorge, MD Mudry (2008) Caiman latirostris (broadsnouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutation Research* 650:202-220
- [272] EC López González, MA Latorre, A Larriera, PA Siroski, GL Poletta (2013) Induction of micronuclei in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) hatchlings exposed in vivo to Roundup® (glyphosate) concentrations used in agriculture. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105:131-134
- [273] GL Poletta (2011) Monitoreo de daño inducido por plaguicidas en Caiman latirostris (Yacaré overo) como organismo centinela de los humedales de Argentina. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- [274] EC López González, A Larriera, PA Siroski, GL Poletta (2017) Micronuclei and other nuclear abnormalities on Caiman latirostris (Broad-snouted caiman) hatchling after embryonic exposure to different pesticide formulations. *Ecotoxicological Environmental Safety* 136:84-91

- [275] GL Poletta, MF Simoniello, MD Mudry (2016) Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defense capacity in *Caiman latirostris* blood. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 179:29-36
- [276] PM Burella, LM Odetti, MF Simoniello, GL Poletta (2018) Oxidative damage and antioxidant defense in *Caiman latirostris* (Broad snouted caiman) exposed in ovo to pesticide formulations. *Ecotoxicological Environmental Safety* 161:437-443
- [277] MN Moore, MN Depledge, JW Readman, DRP Leonard (2004) An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research* 552:247-268
- [278] S Wood, S Yum, D Kim, H Park (2009) Transcripts level responses in a marine medaka (*Oryzias javanicus*) exposed to organophosphorus pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 149:427-432
- [279] S Özdemira, S Altunb, H Arslanc (2018) Imidacloprid exposure cause the histopathological changes, activation of TNF- α , iNOS, 8-OHdG biomarkers, and alteration of caspase 3, iNOS, CYP1A, MT1 gene expression levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Toxicology Reports* 5:125-133
- [280] M Velki, C Lackmann, C Barranco, A Ereño, S Rainieri, H Hollert, S Thomas Benjamin (2019) Pesticides diazinon and diuron increase glutathione levels and affect multixenobiotic resistance activity and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Environmental Sciences Europe* 31(28):1-18
- [281] P Sujiwattanasarat, P Pongsanarakul, Y Tamsiripong, T Tamsiripong, C Thawornkuno, Y Uno, S Unajak, Y Matsuda, K Choowongkamon, K Srikulnath (2016) Molecular cloning and characterization of Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) copper, zinc superoxide dismutase (CSI-Sod) gene. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 191:187-195
- [282] F Iturburu, L Bertrand, J Mendieta, M Amé, M Menone (2018) An integrated biomarker response study explains more than the sum of the parts: Oxidative stress in the fish *Australoheros facetus* exposed to imidacloprid. *Ecological Indicators* 93:351-357
- [283] JG Myburgh, RM Kirberger, JCA Steyl, JT Soley, DG Booyse, FW Huchzermeyer, RH Lowers, LJ Guillet (2014) The postoccipital spinal venous sinus of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*): its anatomy and use for blood sample collection and intravenous infusions. *J S Afr Vet Assoc* 85:1-10
- [284] EC López González, LM Odetti, GL Poletta, N Densolw, K Kroll, PA Siroski, MV Parapachu Marcó (2021) Optimizing protocols for high-quality RNA extraction from blood and liver tissues of the Broad-snouted caiman. *Russian journal of herpetology*.
- [285] IDT Integrated DNA Technologies. En: <https://www.idtdna.com/pages> Acceso noviembre 2020
- [286] EV Paravani, LM Odetti, MF Simoniello, GL Poletta (2020) Molecular analysis and bioinformatic characterization of copper, zinc-superoxide dismutase (Cu/Zn-sod) gene of *Caiman latirostris*. *Molecular Biology Reports* 47(11):8849-8857

- [287] Kang Jin-He, Z Wen-Qing, S Wei, S Dong-Yan, L Shan-Shan, T Ling, S Yan, L Ge, X You-Xiong, C Qing-Xi (2012) Apoptosis Mechanism of Human Cholangiocarcinoma Cells Induced by Bile Extract from Crocodile. *Appl Biochem Biotechnol* 166:942-951
- [288] A Martínez-Juárez, M Lopez-Luna, T Porrás-Gomez, N Moreno-Mendoza (2018) Expression of the Sox9, Foxl2, Vasa, and TRPV4 genes in the ovaries and testes of the Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 330:148-164
- [289] P Donayo, C Pina, A Larrier (2002) Periodo de incubación, banda de calcificación, peso de los huevos y desarrollo embrionario de *Caiman latirostris* a tres temperaturas diferentes. En: *The conservation and management of caimans and crocodiles of Latin America V2*. (Ed: L Verdade, A Larriera) 2002, CN Editora, Piracicaba, Sao Paulo, Brasil. p.79-90
- [290] GJW Webb, SC Manolis, B Ottley, A Heyward (1992) Crocodile research and management in the Northern Territory: 1990-1992. *Proceedings of the 11th Working Meeting of the IUCN_SSC Crocodile Specialist Group, Zimbabwe:233-275*
- [291] LM Verdade (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, EUA, p.174
- [292] A Larriera (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
- [293] L Demonte, N Michlig, M Gaggiotti, C Adam, H Beldoménico, M Repetti, (2018) Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method. *Sci Total Environ* 645:34–43
- [294] L Regaldo, MF Gutierrez, U Reno, V Fernández, S Gervasio, MR Repetti, AM Gagneten (2017) Water and sediment quality assessment in the Colastiné-Corralito stream system (Santa Fe, Argentina): impact of industry and agriculture on aquatic ecosystems. *Environ Sci Pollut R* 25(7):6951–6968
- [295] European Commission (EC), Directorate-general for Health and Food Safety, Safety of the Food CRuihain Pesticides and Biocides (2017) SANTE/11813/ Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. En: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf Acceso noviembre de 2020.
- [296] GL Poletta, MF Simoniello, M Porcel de Peralta, E Kleinsorge, P Siroski, MD Mudry. (2012). Chapter 1 - Evaluation of pesticide-induced DNA damage and oxidative stress on human and wildlife populations in Santa Fe province (Argentina). En: *Pesticides: Characteristics, uses and health implications* (Ed: AJ Abrego Gomez, EM Lugo de Ortega). 2012, Nova Sci. Pub., Nueva York, EUA. p.1-23
- [297] SA Bustin, et al. (2005) Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34:597-601

- [298] A Maroufi, EV Bockstaele, L Loose (2010) Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. *BMC Mol Biol* 11(1):15
- [299] S Taylor, M Wakem, G Dijkman, M Alsarraj, M Nguye (2010) A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50:1-5.
- [300] SA Bustin, J Hugget (2017) qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification* 14:19-28
- [301] H Aebi, (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121–126
- [302] JA Buege, SD Aust (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 30(52):302–310
- [303] SPSS for Windows (2019) Version 22.0, SPSS Inc., Chicago, USA.
- [304] SA Bustin, V Benes, JA Garson, J Hellemans, J Huggett, M Kubista, M Reinhold, T Nolan, MV Pfaffl, GL Shipley, J Vandesompele, CT Wittwer (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment. *Clinical Chemistry* 55:611-622
- [305] JR Snape, SJ Maund, DB Pickford, TH Hutchinson (2004) Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 67: 143-154
- [306] P Siroski, G Poletta, MA Latorre, ME Merchant, HH Ortega, MD Mudry (2016) Immunotoxicity of commercial-mixed glyphosate in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Chemico-Biol Interac* 244, 64-70
- [307] R Ekblom, J Galindo (2011) Applications of next-generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity* 107(1). p1-15
- [308] A Schroeder, O Mueller, S Stocker, R Salowsky, M Leiber, M Gassmann (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 7(3)
- [309] I Vomelová, Z Vanicková, A Šedo (2009) Methods of RNA Purification. All Ways (Should) Lead to Rome. *Folia Biologica* 55:243-251
- [310] P Gayral, L Weinert, Y Chiari, G Tsagkogeorga, M Ballenghien, N Galtier (2011) Next-generation sequencing of transcriptomes: a guide to RNA isolation in nonmodel animals. *Molecular Ecology Resources* 11:650-661
- [311] S Kohno, J Zhu, LJ Guillette (2019) Stress responses in the chemistry and mRNA abundance of the peripheral blood in the American alligator. *Journal of Experimental Zoology Part A* 333(3):151-163
- [312] Y Chiari, N Galtier (2011) RNA extraction from sauropsids blood: evaluation and improvement of methods. *Amphibia-Reptilia* 32:136-139
- [313] S Krebs, M Fischaleck, H Blum (2009) A simple and loss-free method to remove TRIzol contaminations from minute RNA samples. *Analytical Biochemistry* 387:136-138

- [314] LS Toni, AM Garcia, DA Jeffrey, X Jiang, BL Stauffer, SD Miyamoto, CC. Sucharov (2018) Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX* 5:599-608
- [315] R Yatsu, S Miyagawa, S Kohno, BB Parrott, K Yamaguchi, Y Ogino,, T Iguchi, (2016) RNA-seq analysis of the gonadal transcriptome during Alligator mississippiensis temperature-dependent sex determination and differentiation. *BMC Genomics* 17:77
- [316] H Sun H, X Zuo, L Sun, P Yan, F Zhang, H. Xue,, X Wu (2018) Insights into the seasonal adaptative mechanisms of Chinese alligator (*Alligator sinensis*) from transcriptomic analyses. *Australian Journal of Zoology* 66(2):93-102
- [317] AP Scott (2016) Data analysis and reporting. En: *Real-time PCR*, (Ed: M Tevfik) 2016, Taylor & Francis Group, Londres, RU, p.39
- [318] M Mudry, A Carballo (2006) *Genética Toxicológica*. Seminarios 1:5 Olson G, Hessler J, Faith R (1977) Techniques for the blood collection and intravascular infusion of reptiles. *Lab Anim Sci* 25:783-786
- [319] E Demir, F Turna, S Aksakal, Y Emre, N Emre, A Yağcı, B Kaya (2015) The comet assay using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for the detection of nutrient pollution generated from overfed fish farms in the Esen Stream. *Fresenius Environmental Bulletin* 24:3665-3671
- [320] PM Burella, M Simoniello, GL Poletta (2017) Evaluation of Stage-Dependent Genotoxic Effect of Roundup (Glyphosate) on *Caiman latirostris*. Embryos. *Arch Environ Contam Toxicol* 72:50-57
- [321] EÖ Oruc y D Usta (2007) Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23:48-55
- [322] F Zhao, B Wang, X Zhang, H Tian, W Wang W, S Ru (2015) Induction of DNA base damage and strand breaks in peripheral erythrocytes and the underlying mechanism in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to monocrotophos. *Fish Physiol Biochem* 41:613-624
- [323] F Arrighetti, E Ambrosio, M Astiz, C Rodriguez, S Lavarías (2018) Differential response between histological and biochemical biomarkers in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gasteropoda: Amullariidae) exposed to cypermethrin. *Aquatic Toxicology* 194:140-151
- [324] B Saleha Banu, K Danadevi, MF Rahman, YR Ahuja, J Kaiser (2001) Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay. *Food Chem. Toxicol* 39, 361-366
- [325] B Zegura, TT Lah, M Filipic (2004) The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology* 200,59-68
- [326] D Li, Q Huang, M Lu, L Zhang, Z Yang, M Zong, T Tao (2015) The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis. *Chemosphere* 135:387-393

- [327] AF Bonifacio y AC Hued (2019) Single and joint effects of chronic exposure to chlorpyrifos and glyphosate-based pesticides on structural biomarkers in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere* 236:124-311
- [328] MP Gunderson, E Oberdfrster, LJ Guillette (2004) Phase I and II liver enzyme activities in juvenile alligators (*Alligator mississippiensis*) collected from three sites in the Kissimmee-Everglades drainage, Florida (USA). *Comp Biochem Physiol C* 139:39-46
- [329] VA Lance, TR Horn, RM Elsey, A de Peyster (2006) Chronic incidental lead ingestion in a group of captive-reared alligators (*Alligator mississippiensis*): possible contribution to reproductive failure. *Comp Biochem Physiol C* 142:30-35
- [330] OV Furtado-Filho, C Polcheira, DP Machado, G Mourão, M Hermes-Lima (2007) Selected oxidative stress markers in a South American crocodilian species. *Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol* 146:241-254
- [331] M Hermes-Lima, C Carreiro, DC Moreira, C Polcheira, DP Machado, EG Campos (2012) Glutathione status and antioxidant enzymes in a crocodilian species from the swamps of the Brazilian Pantanal. *Comp. Biochem. Physiol. A* 163:189-198
- [332] I Ahmad, VL Maria, M Oliveira, M Pacheco, MA Santos (2006) Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to beta-naphthoflavone. *Mutation Research* 608:16-28
- [333] S Guilherme, I Gaivão, MA Santos, M Pacheco (2012) DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide -Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutation Research* 743:1-9
- [334] X Ma, D Deng, W Che (2017) Chapter 9 - Inhibitors and activators of SOD, GSH-Px, and CAT En: *Enzyme Inhibitors and Activators* (Ed: M Şentürk) 2017, IntechOpen, Rijeka, Croacia, p.207-224
- [335] KF Zhang, GD Wang, ZH Zou, XW Jia, SH Wang, P Lin, Y Chen, Z Zhang, Y Wang (2009) Cloning, characterization and TBT exposure response of Cu/Zn superoxide dismutase from *Halotis diversicolor supertexta*. *Mol Biol Rep* 36:583-594
- [336] J Li, P Chen, P Liu, B Gao, Q Wang, J Li, J (2011) Molecular characterization and expression analysis of extracellular copper-zinc superoxide dismutase gene from swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Mol Biol Rep* 38:2107-2115
- [337] M Lydy, J Belden, C Wheelock, B Hammock, D Denton (2004) Challenges in regulating pesticide mixtures. *Ecol Soc* 9:1-15
- [338] AF Hernandez, T Parron, AM Tsatsakis, M Requena, R Alarcon, O Lopez-Guarnido (2013) Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. *Toxicology* 307:136-145
- [339] HI Zeliger (2011) Chapter 2 - Health Effects of Exposures to Chemical Mixtures En: *Human toxicology of chemical mixtures: Toxic Consequences Beyond the Impact of One-component Product and Environmental Exposures* (Ed: H Ziegler) 2011, Elsevier, Oxford, RU, p.7-14
- [340] MJ Amaral, RC Bicho, MA Carretero, JC Sanchez-Hernandez, AMR Faustino, A.M.R., AMVM Soares, RM Mann (2012)a 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

[341] J Beyer, K Petersen, Y Song, A Ruus, M Grung, T Bakke, KE Tollefsen (2014) Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: a discussion paper. *Mar Environ Res* 96:81-91

[342] PM Costa, TS Neuparth, S Caeiroa, J Lobo, M Martins, AM Ferreira, M Caetano, C Vale, TA DelValls, MH Costa (2011) Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: Laboratory versus in situ studies. *Environmental Research* 111:25-36

[343] S Feng, Z Kong, X Wang, P Peng, EY Zeng (2004) Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicol Environ Saf* 61:239-246.

[344] F Mañas, L Peralta J Ravioloa, H Ovandoa, A Weyersa, L Ugniaa, M Gonzalez Cidb, I Larripab, N Gorla (2009) Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28:37-41

[345] M Ismail, QM Khan, R Ali, T Ali, A Mobeen (2014) Evaluation of the Genotoxicity of Chlorpyrifos in Common Indus Valley Toad, *Bufo stomaticus* Using Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay. *Agricultural Sciences* 5:376-382

[346] CDE Vieira, P Gomes Costa, B Lunardelli, L Fernandes de Oliveira, L da Costa Cabrera, WE Risso, EG Primel, PC Meletti, G Fillmann, B Bueno dos Reis Martinez (2016) Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of the Total Environment* 542:44-56

[347] EV Paravani, MF Simoniello, GL Poletta, FR Zolessi, VH Casco (2018) Cypermethrin: Oxidative stress and genotoxicity in retinal cells of the adult zebrafish. *Mutat Res Gen Tox* 826:25-32

[348] A Gehin, C Guyon, L Nicod L (2005) Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCat: the protective effect of vitamins C and E. *Environ Toxicol Pharmacol* 22:27-34

[349] A Sharma, M Mishra, AK Shukla, R Kumar, MZ Abdin, Kar Chowdhuri (2012) Organochlorine pesticide, endosulfan induced cellular and organismal response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Hazardous Materials* 221-222:275-287

[350] S Soloneski, C Ruiz de Arcaute, N Nikoloff, ML Larramendy (2017) Genotoxicity of the herbicide imazethapyr in mammalian cells by oxidative DNA damage evaluation using the Endo III and FPG alkaline comet assays. *Environ Sci Pollut Res* 24:10292-10300

[351] P Singh, P Lata, S Patel, AK Pandey, SK Jain, R Shanker, A Dhawan (2011) Expression profiling of toxicity pathway genes by real-time PCR array in cypermethrin-exposed mouse brain. *Toxicology Mechanisms and Methods* 21(3):193-199

[352] GV Svartz, CM Aronzon, CS Perez Coll (2016) Combined endosulfan and cypermethrin-induced toxicity to embryo-larval development of *Rhinella arenarum*. *Journal of Toxicol Environ Health* 79:197-209

- [353] ME Varona-Urbe, CH Torres-Rey, S Diaz-Criollo, RM Palma-Parra, DM Narvaez, SP Carmona, L Briceño, AJ Idrovo (2016) Exposure to pesticide mixtures and DNA damage among rice field workers. *Arch Environ Occup Health* 71:3-9
- [354] JC Brodeur, MB Poliserpi, MF D'Andrea, M Sanchez (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
- [355] Y Wang, X Li, G Yang, H Weng, X Wang, Q Wang (2019) Changes of enzyme activity and gene expression in embryonic zebrafish co-exposed to beta-cypermethrin and thiacloprid. *Environmental Pollution* 256.
- [356] L Liu, C Jiang, Z Wu, YX Gong, GX Wang (2013) Toxic effects of three strobilurins (trifloxystrobin, azoxystrobin and kresoxim-methyl) on mRNA expression and antioxidant enzymes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) juveniles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98:297-302
- [357] MJ Amaral, JC Sanchez Hernandez, RC Bicho, MA Carretero, R Valente, AMR Faustino, AMVM Soares, RM Mann RM (2012) Biomarkers of exposure and effect in a lacertid lizard (*Podarcis bocagei* Seoane) exposed to chlorpyrifos. *Environ Toxicol Chem* 31:2345-2353
- [358] RR Newbold (2010) Impact of environmental endocrine-disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones (Athens)* 9:206-17