



## UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

# **“Impacto para las aves granívoras del uso del insecticida imidacloprid como curasemillas: el tordo músico (*Agelaioides badius*) como modelo experimental.”**

Tesis presentada para optar al Título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Lic. María Belén Poliserpi**

Directora de tesis: Dra. Céline Marie Julie Brodeur

Consejera de Estudios: Dra. Fabiana Lo Nostro

Lugar de trabajo: Instituto de Recursos Biológicos-CNIA-INTA

Buenos Aires, 2021



# **Impacto para las aves granívoras del uso del insecticida imidacloprid como curasemillas: el tordo músico (*Agelaioides badius*) como modelo experimental.**

## **RESUMEN**

Los neonicotinoides son un grupo de insecticidas ampliamente utilizados como curasemillas en la región pampeana y otras partes del mundo. Sin embargo, como es frecuente que una proporción de las semillas tratadas queden disponibles para ser consumidas por las aves luego de la siembra, existe la posibilidad de que esta práctica sea dañina para las aves granívoras. En este contexto, el objetivo general de la presente tesis consistió en evaluar el riesgo, y las posibles consecuencias para las aves del uso del insecticida neonicotinoide imidacloprid (IMI) como curasemillas en los cultivos extensivos de la región pampeana. Para este fin se desarrollaron protocolos de mantenimiento en cautiverio de manera de poder utilizar al tordo músico (*Agelaioides badius*), una especie de ave passeriforme autóctona de la Argentina, como modelo experimental.

En el Capítulo 1 se evaluó el riesgo de que las semillas tratadas con IMI generen efectos tóxicos agudos. Se calcularon la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de un formulado comercial de IMI, y el consumo diario de semillas. A partir de los resultados se estimó que la ingesta del 7-10% del consumo diario como semillas tratadas de sorgo, maíz, girasol y alfalfa sería suficiente para que las aves alcancen la mortalidad, y que estas semillas se encontrarían en un área menor a 60 m<sup>2</sup>. También se demostró que en un solo evento de alimentación (picoteo), un tordo músico podría ingerir las semillas necesarias para alcanzar la mortalidad. Finalmente, en un estudio piloto, todos los tordos músico alimentados con semillas tratadas con 3 g IMI/kg de semillas (una concentración promedio utilizada en el tratamiento de semillas), murieron entre los tres y cinco días de exposición. Todas las líneas de evidencia examinadas fueron consistentes y concluyeron que los tordos músico, y probablemente otras especies de aves pequeñas, se encuentran expuestos a un riesgo de intoxicación aguda y de mortalidad.

Con el objetivo de caracterizar los efectos biológicos inducidos por el IMI, en el Capítulo 2 se relacionó la presencia del IMI en los distintos tejidos del tordo músico

luego de una ingesta subaguda, con la respuesta temporal de parámetros bioquímicos, hematológicos y genotóxicos. Se observó que el IMI es rápidamente absorbido (i.e. antes de las 4 horas), y eliminado (i.e. a las 48 horas), y las mayores concentraciones se detectaron en el plasma. Los tordos presentaron alteraciones comportamentales a partir de los 30 minutos desde la administración del IMI, y se observaron alteraciones en los parámetros hematológicos y bioquímicos, que perduraron luego de la eliminación del IMI del organismo.

Para simular un escenario como el que podría ocurrir en el ambiente, en el Capítulo 3 se alimentó a los tordos músico durante siete días con semillas tratadas con IMI con concentraciones que representan respectivamente al 2,5 y 15% de una concentración promedio (3 g IMI/kg semillas). La exposición a semillas tratadas desencadenó efectos subletales en las aves como: disminución en la ingesta de alimento, pérdida de peso corporal, alteraciones enzimáticas, y alteraciones comportamentales relacionadas al uso de la jaula. Finalmente, en el Capítulo 4 se realizó un experimento de exposición crónica de 32 días, a semillas tratadas utilizando el 1,8 y 15% de la concentración promedio (3 g IMI/kg semillas). En ambos tratamientos hubo mortalidad, y para el tratamiento más alto se determinó una sobrevivencia del 40%. A lo largo del experimento se observó una disminución en el consumo de semillas y del peso corporal de las aves tratadas. Se observaron alteraciones comportamentales relacionadas a la movilidad, que en las aves expuestas a las dosis más bajas, aparecieron a partir de la cuarta semana de exposición. De manera complementaria, durante el periodo de exposición se realizaron pruebas de respuesta de las aves ante un potencial predador y de escape, que se encontró disminuida en las aves tratadas con la dosis más alta. Finalmente, se observaron alteraciones enzimáticas en las aves expuestas a semillas tratadas.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral indican que el uso del IMI como curasemillas representa un riesgo de toxicidad tanto aguda como crónica para las aves granívoras que habitan los agroecosistemas de la región Pampeana Argentina. En vista de esta conclusión, se recomienda reconsiderar los usos permitidos del insecticida neonicotinoide IMI en el país.

**Palabras clave:** aves, neonicotinoídes, curasemillas, imidacloprid, contaminación, agricultura.

# **Imidacloprid seed coating poses a risk of toxicity to small farmland birds: the grayish baywing (*Agelaioides badius*) as avian model for environmental toxicity testing.**

## **ABSTRACT**

Neonicotinoids are insecticides largely used in seed treatment in many countries, included the Argentinean Pampa Region. Frequently, treated seeds are available after sowing for birds to consume, representing a potential hazard for granivorous birds. In this context, the main objective of this thesis was to assess the risk for birds of using the neonicotinoid imidacloprid (IMI) as seed treatment in extensive crops of the Pampean Region of Argentina. With that purpose, maintenance, and experimental protocols were developed for the use of grayish baywing (*Agelaioides badius*), as a passeriform experimental model native from Argentina.

In Chapter 1, the risk that imidacloprid seed coating poses acute toxicity for birds was evaluated. Median lethal dose (LD<sub>50</sub>) and food intake rate (FIR) were estimated for grayish baywing. It was obtained that the consumption of 7-10% FIR as treated seeds would be enough to achieve the LD<sub>50</sub> for sorghum, corn, sunflower and alfalfa, and that a baywing would have to forage an area of field corresponding to less than 60 m<sup>2</sup> to obtain the number of seeds required to reach the LD<sub>50</sub>. It was also shown that this number of seeds is coherent with the amount of seeds ingested in a bout. In a pilot study, all grayish baywings fed with millet seeds treated with 3 g IMI/kg died within three to five days of exposure. All lines of evidence examined are consistent with the view that grayish baywing, and probably other small farmland birds, are exposed to a risk of acute toxicity and mortality.

In Chapter 2, to characterize the biological effects induced by a subacute exposure of IMI, the IMI distribution in tissues was related to temporal responses of biochemical, hematological, and genotoxic parameters. It was observed that IMI was rapidly absorbed (i.e. 4 hours) and eliminated (i.e. 48 hours), and the highest concentrations were detected in plasma. Baywings showed intoxication signs and behavioral alterations after 30 minutes post-dosing. Hematological and biochemical parameters were also altered, and the effect lasted after IMI elimination.

To simulate a real scenario, in Chapter 3, grayish baywings were fed for seven days with IMI treated seeds with 2,5 and 15 % of an extensively used concentration (3 gIMI/ kg seed). Birds fed with treated seeds presented lower FIR than control birds, weight loss, enzymatic and behavioral alterations. Finally, in Chapter 4, chronic exposure to treated seeds was conducted. Birds were fed with IMI treated seeds with 1,8 and 15 % of an extensively used concentration (3 gIMI/ kg seed). In both treatments, delayed mortality was observed, and the mean survival time for the high dose was 12,5 days. Through exposure, birds presented lower FIR and body weight than control birds. Birds treated with the high dose had lower escape reaction and lower response to predator presence. Treated birds also presented altered the enzymatic parameters.

In conclusion, results obtained in this thesis indicate that IMI used as seed treatment represents both acute and chronic toxicity for granivorous birds that inhabits the Pampean Region agroecosystems. The possible impacts on bird species call for a reconsideration of IMI seed coating practices currently approved in the Pampean Region of Argentina.

**Key words:** birds, neonicotinoids, seed treatment, imidacloprid, contamination, agriculture.

## **AGRADECIMIENTOS**

Todo mi agradecimiento a mi directora de tesis **Julie Brodeur**. Gracias por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y embarcarte en la “ecotox” de aves. Gracias por tu dedicación y tu paciencia. Gracias enseñarme a ser mejor científica.

A mi consejera de estudios **Fabiana Lo Nostro**, a y mi comité seguimiento: **María del Carmen Rios** y **David Bilenca**, que siguieron con detalles mis avances, y me guiaron enriqueciendo este trabajo de Tesis.

A **la Universidad de Buenos Aires**, que por ser pública me permitió estudiar la Licenciatura y luego completar mis estudios de Postgrado de forma gratuita.

Al **Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)** por darme la oportunidad de formarme como investigadora de la institución, brindándome el apoyo financiero para realizar esta tesis.

A **Juan Manuel Pérez Iglesias**, por enseñarme a hacer el ensayo cometa y por tomarse todo el tiempo del mundo para que entendiera lo que estaba viendo al microscopio.

A **Diego y Dante** del Instituto de Alimentos del INTA por su ayuda con los análisis de plaguicidas.

A **Riqui “el arreglatodo”**. Por tu ayuda multirrubro que implico desde armar la trampa para tordos, a pintar las paredes del nuevo laboratorio, y venir corriendo los fines de semana que se cortaba la luz.

Al gran grupo de Biodiversidad y Ecología Ambiental del INTA Castelar: **Gregorio Gavier, Laura Solari, Brenda Riera, Laura Medero, Juan de Souza, Julieta Decarre, Andrea Goijman, Daniela Fonseca, Florencia D’Andrea, Jimena Damonte, Romina Suarez, Nicole Michard y Daniela Gonzalez**, y por supuesto **Julie Brodeur**. Gracias por los mates de todos los días y el gran compañerismo.

A **Bren y Daniela Colombia**, por ayudarme con mis hijos plumíferos, siempre con buena onda, incluso los fines de semana.

A **Jime**, gran amiga y compañera de tesis, gracias por tus consejos, y por estar siempre que lo necesite.

A **Daniela Atenea**, otra gran amiga que me regaló esta tesis, gracias por tu siempre sincera opinión y por ayudarme a lidiar con la estadística.

A mi familia: **Julio, Pilar, Juli, Marian, y Sofi**, que siempre interesados por mi trabajo preguntaban por mis pajaritos. Gracias por ser incondicionales y apoyarme siempre.

A **Diego e Isabella**, por su amor constante las 24 horas del día, todos los días.

A mi compañero de vida **Andrés**, por estar siempre al pie del cañón dándome energía y cuidándome, no hubiera podido terminar sin tu apoyo. Gracias por hacerme mejor persona todos los días. Te amo.



*A las aves, por ellas y para ellas.*

## INDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT .....	5
AGRADECIMIENTOS .....	7
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>14</b>
1.1. El proceso de agriculturización y su impacto sobre las aves.....	14
1.2. El efecto de los plaguicidas sobre las aves.....	15
1.3. Los insecticidas neonicotinoides.....	18
1.4. La intensificación agrícola en Argentina.....	22
1.5. Contaminación por plaguicidas en la región pampeana.....	23
1.6. Uso de aves en el proceso regulatorio de plaguicidas en Argentina.....	25
1.7. El tordo músico ( <i>Agelaioides badius</i> ) como modelo experimental .....	26
1.8. HIPOTESIS .....	28
1.9. OBJETIVO GENERAL .....	29
<i>Objetivos específicos</i> .....	29
<b>2. CAPÍTULO 1. Toxicidad aguda del insecticida imidacloprid para las aves de los agroecosistemas: evaluación de riesgo utilizando datos del tordo músico (<i>Agelaioides badius</i>).....</b>	<b>30</b>
2.1. INTRODUCCIÓN.....	30
2.2. METODOLOGÍA .....	34
2.2.1. Especie estudiada.....	34
2.2.2. Captura y aclimatación de las aves.....	34
2.2.3. Sustancias utilizadas .....	36
2.2.4. Determinación de la dosis letal media de un formulado de IMI (DL <sub>50</sub> ) .....	36
2.2.5. Consumo diario (CD) de semillas sin tratar .....	39
2.2.6. Número de semillas equivalentes a la DL <sub>50</sub> y área equivalente .....	39
2.2.7. Mortalidad de tordos alimentados con semillas tratadas .....	40
2.2.8. Evaluación de riesgo.....	41
2.2.9. Verificación analítica de las concentraciones nominales .....	42
2.2.10. Análisis estadístico.....	43
2.3. RESULTADOS.....	44
2.3.1. Toxicidad aguda y determinación de la DL <sub>50</sub> .....	44
2.3.2. Consumo diario de semillas .....	47
2.3.3. Número de semillas .....	47
2.3.4. Mortalidad de tordos alimentados con semillas tratadas .....	50
2.3.5. Evaluación de riesgo.....	51
2.4. DISCUSIÓN.....	53

2.5.	EVALUACIÓN DE RIESGO BASADA EN EL PESO DE LA EVIDENCIA .....	56
3.	<b>CAPÍTULO 2. Exposición subletal aguda de tordos músicos (<i>Agelaioides badius</i>) al imidacloprid: distribución en el organismo y evolución en el tiempo de los efectos biológicos.....</b>	61
3.1.	INTRODUCCION.....	61
3.2.	METODOLOGÍA .....	63
3.2.1.	Sustancia testada y preparación de la solución.....	63
3.2.2.	Diseño experimental.....	63
3.2.3.	Determinación analítica de IMI en la solución madre y los tejidos .....	65
3.2.4.	Parámetros hematológicos.....	66
3.2.5.	Genotoxicidad: micronúcleos y ensayo cometa .....	68
3.2.6.	Actividad enzimática.....	69
3.2.7.	Análisis estadístico.....	69
3.3.	RESULTADOS.....	70
3.3.1.	Efectos subletales del IMI.....	70
3.3.2.	Distribución del IMI en plasma y órganos .....	71
3.3.3.	Parámetros hematológicos.....	72
3.3.4.	Genotoxicidad: MN y ensayo cometa .....	74
3.3.5.	Actividad enzimática.....	76
3.4.	DISCUSION.....	79
4.	<b>CAPÍTULO 3. Caracterización de la respuesta fisiológica y comportamental al consumo de semillas tratadas con el insecticida imidacloprid en el tordo músico (<i>Agelaioides badius</i>).....</b>	85
4.1.	INTRODUCCIÓN.....	85
4.2.	METODOLOGÍA .....	88
4.2.1.	Tratamientos experimentales y preparación de las semillas .....	88
4.2.2.	Diseño experimental.....	89
4.2.3.	Consumo diario y estimación de la dosis ingerida.....	90
4.2.4.	Comportamiento.....	91
4.2.5.	Toma de muestras .....	92
4.2.6.	Parámetros hematológicos.....	93
4.2.7.	Genotoxicidad .....	93
4.2.8.	Actividad enzimática y daño oxidativo.....	93
4.2.9.	Determinación analítica de IMI en las semillas .....	93
4.2.10.	Análisis estadístico.....	94
4.3.	RESULTADOS.....	95
4.3.1.	Contenido de IMI en las semillas .....	95

4.3.2.	Consumo diario de semillas y dosis ingeridas .....	96
4.3.3.	Peso corporal .....	98
4.3.4.	Comportamiento.....	99
4.3.5.	Parámetros hematológicos.....	103
4.3.6.	Genotoxicidad .....	105
4.3.7.	Actividad enzimática y daño oxidativo.....	105
4.3.8.	NOAEL y LOAEL de los efectos observados .....	110
4.4.	DISCUSION.....	111
5.	<b>CAPÍTULO 4. Exposición crónica de tordos músicos (<i>Agelaioides badius</i>) a semillas tratadas con imidacloprid y caracterización de la respuesta fisiológica y comportamental</b>	
	117	
5.1.	INTRODUCCION.....	117
5.2.	METODOLOGÍA .....	119
5.2.1.	Tratamientos experimentales y preparación de las semillas .....	119
5.2.2.	Determinación analítica de IMI en el formulado y semillas.....	120
5.2.3.	Diseño experimental .....	120
5.2.4.	Consumo diario y estimación de la dosis ingerida.....	122
5.2.5.	Comportamiento.....	122
5.2.6.	Respuesta al predador y de escape .....	123
5.2.7.	Toma de muestras .....	124
5.2.8.	Parámetros hematológicos.....	125
5.2.9.	Genotoxicidad .....	125
5.2.10.	Actividad enzimática.....	125
5.2.11.	Análisis estadístico.....	125
5.3.	RESULTADOS.....	126
5.3.1.	Concentración de IMI en las semillas.....	126
5.3.2.	Sobrevivencia de los tordos alimentados con semillas tratadas .....	127
5.3.3.	Consumo diario de semillas y dosis ingeridas.....	128
5.3.4.	Dosis Diaria ingerida.....	131
5.3.5.	Variación del peso corporal.....	132
5.3.6.	Comportamiento.....	133
5.3.7.	Prueba de respuesta al predador y escape .....	142
5.3.8.	Parámetros hematológicos.....	143
5.3.9.	Genotoxicidad.....	146
5.3.10.	Actividad enzimática.....	147
5.3.11.	NOAEL y LOAEL de los efectos observados .....	150

<b>5.4. DISCUSION.....</b>	<b>152</b>
<b>6. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>160</b>
<b>CONSIDERACIONES FINALES .....</b>	<b>164</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA GENERAL .....</b>	<b>167</b>

# 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1.1. El proceso de agriculturización y su impacto sobre las aves.

Las actividades humanas han disparado el sexto evento de extinción masiva de la historia, generando grandes cambios en la distribución global de los organismos (Barnosky et al., 2011; Ceballos et al., 2017, 2015). En las últimas décadas, se ha reportado que todos los grupos de aves se encuentran en declive, siendo la actividad agrícola uno de los principales factores responsables (Burns et al., 2016; Donald et al., 2006; Inger et al., 2015; Rosenberg et al., 2019; WWF, 2018). El proceso de intensificación agrícola implica la conversión de ambientes naturales por agricultura, la pérdida de áreas seminaturales como márgenes de cultivo, el aumento en la frecuencia de cosechas, el drenaje y la irrigación, las altas densidades de ganado, y el uso de fertilizantes y plaguicidas (Benton et al., 2003; Dudley and Alexander, 2017; Foley et al., 2011, 2005). En consecuencia los ambientes disminuyen su capacidad de soportar especies de aves, alterando la composición de las comunidades, contrayendo o expandiendo su área de distribución, y afectando su rol en los ecosistemas (Benton et al., 2003; Boatman et al., 2007; Calamari et al., 2018; Gaston et al., 2018; Geiger et al., 2010; Krebs et al., 1999; Macchi et al., 2020; Newton, 2004a; Powers and Jetz, 2019; Şekercioglu et al., 2019; Sica et al., 2020; Stanton et al., 2018; Van Turnhout et al., 2010; Vickery et al., 2001).

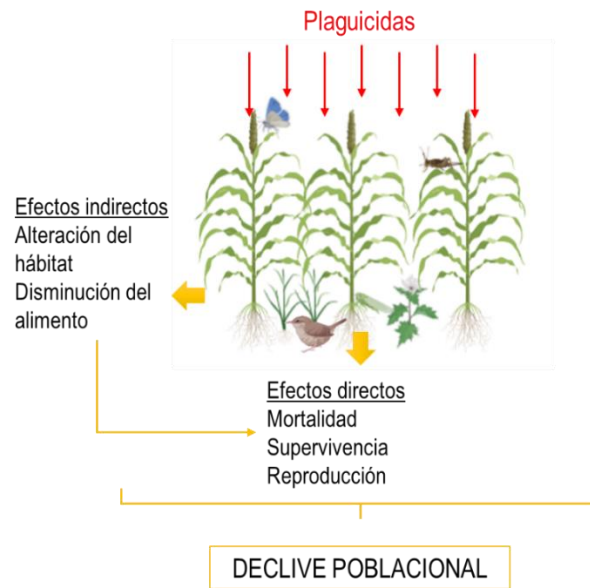
Las aves poseen valor intrínseco y son la fuente de gran valor cultural, y debido a su rol en los ecosistemas proveen numerosos servicios ecosistémicos (Cumming and Maciejewski, 2017; Zoeller et al., 2020; Wenny et al., 2011; Whelan et al., 2015). Servicios como la como la polinización, y el control de plagas pueden mejorar el rendimiento de los cultivos (Mahendiran y Azeez, 2018), como sucede por ejemplo, en las plantaciones de café que se cultivan en las áreas de mayor biodiversidad (Chain-Guadarrama et al., 2019; Milligan et al., 2016). Otro aporte de las aves al funcionamiento de los ecosistemas es el saneamiento ambiental. Un estudio reportó recientemente que la población de jotes cabeza colorada (*Cathartes aura*), un ave carroñera que migra a lo largo de América, remueve al año un promedio 1000 toneladas de materia orgánica, lo que en términos monetarios equivale a un servicio de más de 500.000 USD (Grilli et al., 2019). Por otro lado, las aves dispersan semillas y favorecen su germinación, contribuyendo al mantenimiento de las poblaciones de plantas de importancia cultural y económica, como se demostró para las poblaciones de ajíes (*Capsicum frutescens*) en las

Islas Marianas (Egerer et al., 2018). En la dispersión de semillas, además se debe resaltar la importancia de las aves migratorias en las dispersiones de larga distancia (Viana et al., 2016).

El uso de plaguicidas es uno de los factores que más afecta negativamente a las poblaciones de aves que habitan los agroecosistemas en el mundo (Chiron et al., 2014; Mineau y Whiteside, 2013). En Europa, por ejemplo, se demostró que de los componentes analizados, el uso de plaguicidas era el factor que más afectaba a las aves, insectos y plantas (Geiger *et al.*, 2010; Hallmann *et al.*, 2014). En América del Norte se reportó una tendencia similar, donde el uso de plaguicidas fue el factor más reportado como causa del declive de las poblaciones de aves, seguido de la pérdida y alteraciones del hábitat (Stanton *et al.*, 2018).

### **1.2. El efecto de los plaguicidas sobre las aves**

La publicación del libro “Primavera Silenciosa” de Rachel Carson (1962), puso el foco en el efecto de los plaguicidas sobre las aves, y fue el punto de partida de numerosos estudios que le siguieron. Los plaguicidas, al igual que cualquier otro contaminante ambiental, pueden tener efectos directos e indirectos sobre las aves. Los efectos indirectos consisten en las restricciones que sufre un ave, relacionadas al impacto que genera el contaminante sobre su entorno, como una reducción en la disponibilidad del alimento o del hábitat. En contraposición, los efectos directos se refieren a aquellos que son ejercidos por el plaguicida sobre los procesos fisiológicos o bioquímicos debido a su toxicidad (Figura 1.1) (Boatman et al., 2004; Newton, 2004a).



**Figura 1.1.** Efecto de los plaguicidas sobre las aves que habitan los agroecosistemas.

### *Efectos indirectos*

Se ha demostrado que para las aves granívoras, la pérdida de los rastrojos que son quemados durante el otoño e invierno por herbicidas, ha contribuido a aumentar la mortalidad invernal de estas aves y por tanto a reducir el tamaño de sus poblaciones (Bright et al., 2008).

Los herbicidas también, actúan reduciendo la abundancia o eliminando especies de plantas silvestres que sirven de alimento para especies herbívoras o granívoras (Moreby y Southway, 1999). Gibbons et al., (2006) en su trabajo, demostró que, en cultivos genéticamente resistentes a herbicidas, el uso de herbicidas disminuyó la disponibilidad de semillas de malezas que son dieta de más de 25 especies de aves que se encuentran en declive poblacional. Además, los herbicidas tienen efectos negativos indirectos sobre la abundancia de insectos al eliminar las plantas que les sirven de hábitat y alimento (Moreby y Southway, 1999; Taylor et al., 2006).

El uso de insecticidas y fungicidas, en cambio, impacta de manera directa reduciendo la abundancia y diversidad de invertebrados que sirven de alimento para las aves insectívoras y para muchas aves granívoras durante la época de cría, ya que las primeras semanas los pichones solo se alimentan de invertebrados (Geiger et al., 2010; Stoate et al., 2001; Pennington et al., 2018; Sotherton et al., 1987; Hart et al., 2006). Por ejemplo,



se demostró para el escribano cerillo (*Emberizia citrinella*) que la aplicación de insecticidas no solo resultó en la disminución del recurso alimenticio (artrópodos), sino que se reflejó en un aumento de la frecuencia de los eventos de alimentación de las aves; y al mismo tiempo, se observó que la condición corporal de los pichones presentaba una correlación negativa con el uso de insecticidas (Morris et al., 2005).

### *Efectos directos*

Los plaguicidas pueden afectar directamente la salud de las aves debido a su toxicidad. Los efectos pueden ser letales o subletales afectando la supervivencia y la reproducción de los individuos. El primer caso bien documentado es el de los insecticidas clorados como el DDT, que se bioacumulan a lo largo de la cadena trófica, y causa numerosos efectos subletales como el adelgazamiento de las cascara de los huevos, con la consecuente disminución de las poblaciones de aves rapaces (Newton y Wyllie, 1992). Existen reportes de mortandad de aves causadas por el DDT, al igual que por los ciclodienos, otro grupo de insecticidas clorados más tóxicos que el DDT (Newton et al., 1992; Porter y Wiemeyer, 1969; Wurster et al., 1965).

Con el tiempo insecticidas como el DDT y los ciclodienos, fueron reemplazados por otros menos persistentes como los organofosforados y carbamatos. Sin embargo, ambos presentaban elevada toxicidad para los vertebrados, en especial para las aves y mamíferos, causando alteraciones sobre el sistema nervioso y mortalidad (Goldstein et al., 1999a; Kwon et al., 2004; Walker, 1983). Un caso emblemático sobre el efecto de los organofosforados fue el del aguilucho langostero (*Buteo swansoni*). El aguilucho langostero es un ave rapaz que migra desde América del Norte hacia Argentina durante su periodo no reproductivo. La dieta de las aves durante su estancia en el sur se comprende principalmente de artrópodos, como langostas, libélulas y otros invertebrados (Hopper 1999). En los años 1994 al '96 se registraron más de 4000 casos de mortandad atribuidos al insecticida monocrotofos utilizado para combatir las langostas (Goldstein et al., 1999a, 1999b)

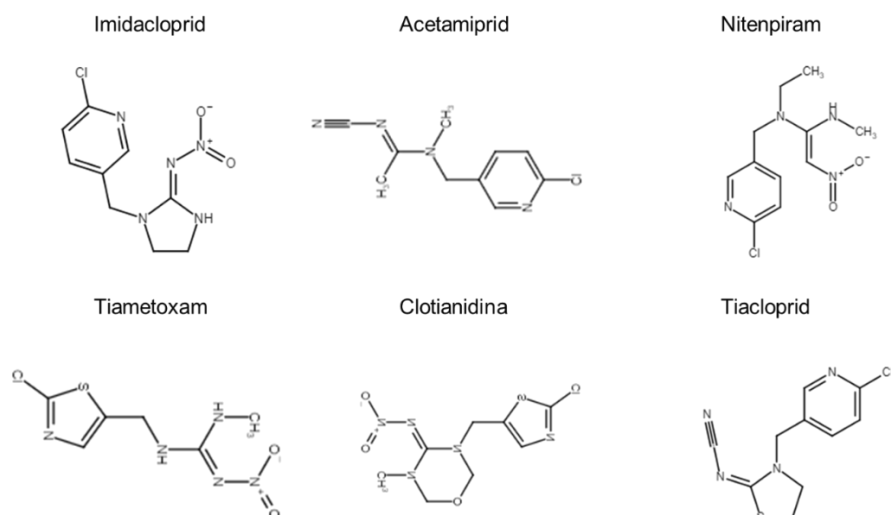
Los piretroides, por otro lado, suelen tener menor toxicidad para las aves que para otros vertebrados (i.e. anfibios y peces). Sin embargo, existen reportes sobre efectos subletales en las aves como toxicidad hepática, genotoxicidad, y se han detectado en huevos de aves silvestres, lo que indica su acumulación en los tejidos y transferencia parental (Corcellas

et al., 2017; Khan et al., 2012; Sharaf et al., 2010). La resistencia de las especies plagas a ciertos plaguicidas, así como la preocupación sobre los riesgos que poseían las viejas generaciones de plaguicidas llevaron al desarrollo de nuevos insecticidas como los neonicotinoides (Tassin De Montaigu y Goulson, 2020). El uso de los insecticidas neonicotinoides ha sido cuestionado en los últimos años debido a su efecto sobre los insectos polinizadores y las aves (Gibbons et al., 2015; Goulson, 2014).

Además de los insecticidas, los fungicidas también pueden tener efectos directos sobre las aves. Se ha reportado que el tiram y el difenoconazole pueden provocar la muerte y generar alteraciones bioquímicas (Fernández-Vizcaíno et al., 2020; Lopez-Antia et al., 2013; Ortiz-Santaliestra et al., 2020). Finalmente, existe evidencia sobre la acumulación de las triazinas en las aves (Reindl et al., 2015), y aunque los efectos en las aves no son concluyentes, en estudios de laboratorio, la exposición a altas concentraciones genera alteraciones bioquímicas y genotóxicas (Hussain et al., 2011). Incluso recientemente se ha reportado que la exposición de aves adultas al glifosato, uno de los herbicidas más utilizados, puede generar efectos en su descendencia, principalmente sobre el desarrollo de los pichones y su capacidad antioxidante (Ruuskanen et al., 2020). De la misma forma, el uso de rodenticidas mediante cebos tóxicos o granos tratados, ha tenido efectos perjudiciales provocando eventos de intoxicación en aves y mamíferos (Olea et al., 2009).

### **1.3. Los insecticidas neonicotinoides**

En 1960, la nicotina, extraída de la hoja de tabaco, se reportó como el primer insecticida derivado de un extracto vegetal. Los neonicotinoides, son insecticidas sintéticos que surgen de modificaciones a la molécula de nicotina para optimizar su actividad insecticida (Tomizawa and Casida, 2005). En 1991 salió al mercado el primer neonicotinoide imidacloprid (IMI) producido por la empresa Nihom Bayer Agrochem (ahora Bayer Crop Science), y más tarde surgieron otras moléculas similares. Actualmente el grupo de los neonicotinoides se compone por el imidacloprid, la clotianidina, el acetamirpid, el tiametoxam, el nitepiram y el tiacloprid (Figura 1.2) (Jeschke y Nauen, 2008).



**Figura 1.2.** Insecticidas neonicotinoides

### *Propiedades fisicoquímicas*

Las propiedades físicas de los neonicotinoides se presentan en la Tabla 1.1. Una característica que distingue a los neonicotinoides de la mayoría de los insecticidas es su naturaleza sistémica. Los neonicotinoides son moléculas relativamente pequeñas con pesos moleculares varían entre 200 y 292, y la mayoría es altamente soluble en agua (Bonmatin et al., 2015; Tomizawa and Casida, 2005). Estas características permiten que los neonicotinoides sean absorbidos por las plantas y transportados a los tejidos, proveyéndolos de protección contra insectos plaga durante un periodo de tiempo. Ninguno de los neonicotinoides posee alta presión de vapor, y en general los valores varían  $2,8 \times 10^{-8}$  y 0,002 mPa a 25°C. El bajo potencial de volatilización de los neonicotinoides indica que cuando estos insecticidas son pulverizados, solo se encontrarían presentes en su forma gaseosa durante un periodo corto de tiempo (Bonmatin et al., 2015).

La persistencia de los neonicotinoides en el suelo varía según la molécula (Tabla 1.1). Los compuestos con una vida media menor a 30 días se consideran no persistentes, como es el caso del acetamiprid, nitenpiram y tiacloprid. Mientras que el dinotefuran y tiametoxam son moderadamente persistentes (vida media entre 30 y 100 días); y la clotianidina e imidacloprid son considerados persistentes. La degradación por fotólisis acuosa es rápida (menor a un día), para todos los compuestos excepto para el tiametoxam

que se considera que se degrada moderadamente rápido. El acetamiprid se considera una molécula estable y por lo tanto, su degradación es lenta.

**Tabla 1.1.** Propiedades físicas de los neonicotinoides.

Compuesto	Peso Molecular	Solubilidad en agua (g/L) <sup>a</sup>	Coefficiente de partición octanol/agua (log P <sub>ow</sub> )	Vida media en suelo (días en el campo)	Fotólisis acuosa <sup>a</sup>
<i>Acetamiprid</i>	222,7	2,95 (alta)	0,80	3	34
<i>Clotianidina</i>	249,7	0,34 (moderada)	0,95	121,2	0,1
<i>Dinotefuran</i>	202,2	39,83 (alta)	-0,55	75	0,2
<i>Imidacloprid</i>	255,7	0,61 (alta)	0,57	174	0,2
<i>Nitnempiram</i>	270,7	>590 (alta)	-0,66	- (no persistente)	-
<i>Tiacloprid</i>	252,7	0,185 (moderada)	1,26	8,1	Estable
<i>Tiametoxam</i>	291,7	4,1 (alta)	-0,13	39	2,7

<sup>a</sup> Solubilidad a 20° C y pH 7

#### *Usos de los neonicotinoides*

Desde su aparición en el mercado, los neonicotinoides se han transformado en una de las clases más utilizadas de insecticidas a escala mundial, junto a los organofosforados, carbamatos, fenilpirazoles y piretroides (Jeschke et al., 2011). Debido a sus propiedades sistémicas, los neonicotinoides pueden ser utilizados en múltiples cultivos y de diversas formas. El uso de los neonicotinoides cubre cuatro dominios principales: protección de cultivos y plantas ornamentales, control de plagas urbanas (cucarachas, hormigas, moscas, etc.), aplicaciones veterinarias (protección contra ectoparásitos); y en la acuicultura. El mayor uso de neonicotinoides se da en la protección de cultivos, plantas ornamentales y forestales (Simon-Delso et al., 2015).

Los neonicotinoides, además, pueden ser aplicados de diversas maneras. En agricultura, horticultura y forestaciones, las principales formas de aplicación son: aplicación foliar,

tratamiento de semillas (recubrimiento), peletizado de semillas, tratamiento de suelo, aplicaciones granulares, inmersión de plántulas, quimigación (aplicación en agua de riego), aplicación sobre el suelo desnudo y surcos, inyecciones en troncos de árboles, entre otras. El tratamiento de semillas y las aplicaciones en el suelo representan aproximadamente el 60% del uso de los neonicotinoides a escala mundial (Jeschke et al., 2011).

#### *Modo de acción de los neonicotinoides*

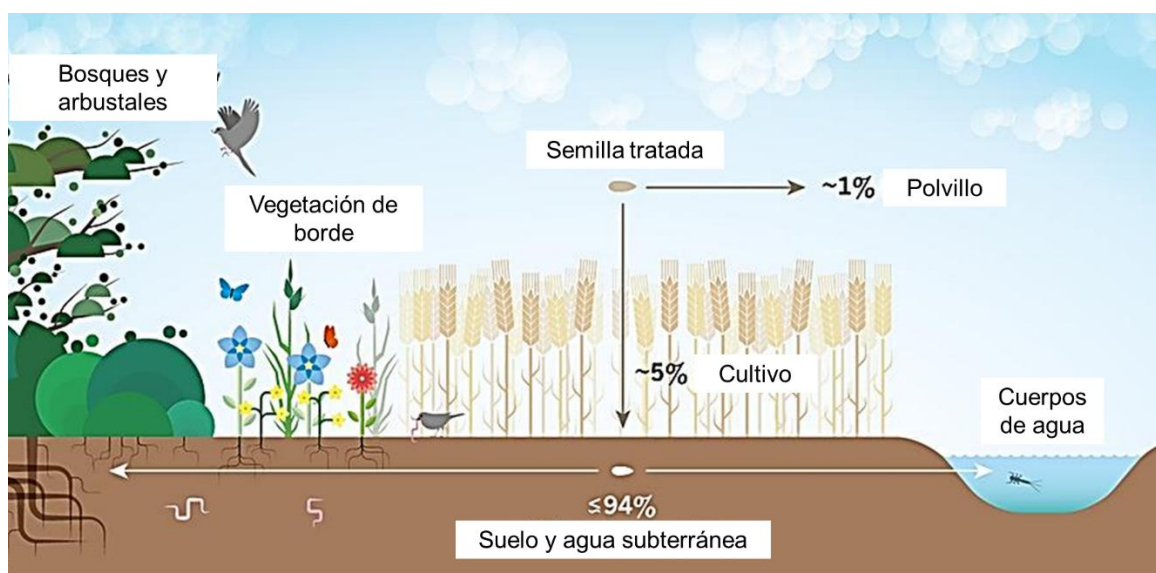
Todos los neonicotinoides actúan selectivamente sobre el sistema nervioso central de los insectos, como agonistas de los receptores nicotínicos post sinápticos de acetilcolina (nAChRs). Los neonicotinoides son ligandos muy efectivos que actúan como falsos neurotransmisores y sobre-activan los nAChRs, que provocan la parálisis y muerte de los insectos plaga (Tomizawa *et al.*, 1999; Jeschke y Nauen, 2008).

Los neonicotinoides, junto a los piretroides, presentan un alto factor de selectividad por los insectos versus los vertebrados, respecto a los anteriores organoclorados, organofosforados y carbamatos (Tomizawa y Casida, 2005). Esta selectividad es atribuible a una mayor sensibilidad de los neonicotinoides por los nAChRs de los insectos respecto a los de los vertebrados. Sin embargo, algunos productos del metabolismo de los neonicotinoides pueden resultar más tóxicos para los vertebrados. Por ejemplo, el desnitro-imidacloprid, un metabolito del imidacloprid, es más activo sobre los nAChRs de los mamíferos que sobre los receptores de los insectos (Matsuda et al., 2020).

#### *Persistencia de los neonicotinoides en el ambiente*

El uso de los neonicotinoides ha sido ampliamente debatido debido, al riesgo ambiental que poseen (Botías et al., 2015; Chagnon et al., 2015; Gibbons et al., 2015; Goulson, 2013; Wood y Goulson, 2017) y a su implicancia en el declive global de los polinizadores (Pisa et al., 2014). En consecuencia, la Unión Europea suspendió en 2013 el uso de los tres neonicotinoides más utilizados: imidacloprid, clotianidina y tiametoxam, y a partir del 2018 se prohibió su uso. Sin embargo, el uso de los neonicotinoides sigue vigente en numerosas partes del mundo (Sgolastra et al., 2020).

Cuando los neonicotinoides son utilizados como curasemillas, solo un 5% del ingrediente activo permanece en la semilla, mientras el resto pasa al ambiente circundante (Figura 1.3) (Sur y Stork, 2003). Luego de tres décadas desde su aparición, existen reportes sobre la presencia de neonicotinoides en el suelo (Bonmatin *et al.*, 2015, 2005; Schaafsma *et al.*, 2015; Limay-Rios *et al.*, 2016;), cuerpos de agua ( Hladik *et al.*, 2014; Anderson *et al.*, 2015; Morrissey *et al.*, 2015; Humann-Guillemint *et al.*, 2019); e incluso en la vegetación silvestre que es capaz de acumular neonicotinoides a través de las raíces y trasladarlos al polen y néctar de las flores (Greatti *et al.*, 2006; Krupke *et al.*, 2012; Botías *et al.*, 2015).



**Figura 1.3.** Distribución de los neonicotinoides en el ambiente (Adaptado de Goulson, 2014).

#### 1.4. La intensificación agrícola en Argentina

La República Argentina es uno de los principales países productores de granos del mundo, y ello se ve reflejado en el constante aumento de la superficie sembrada. En los últimos 30 años la superficie sembrada pasó de 20 a casi 34 millones de hectáreas, y la producción de soja, maíz, trigo y girasol aumentó de 34 a 143 millones de toneladas (Boasso *et al.*, 2019; MAGyP, 2020). Sin embargo, el aumento de la superficie sembrada no fue parejo para todos los cultivos, sino que se concentró en la soja tolerante al herbicida glifosato,

el primer cultivo genéticamente modificado (GM) aprobado en la Argentina (ArgenBio, 2020).

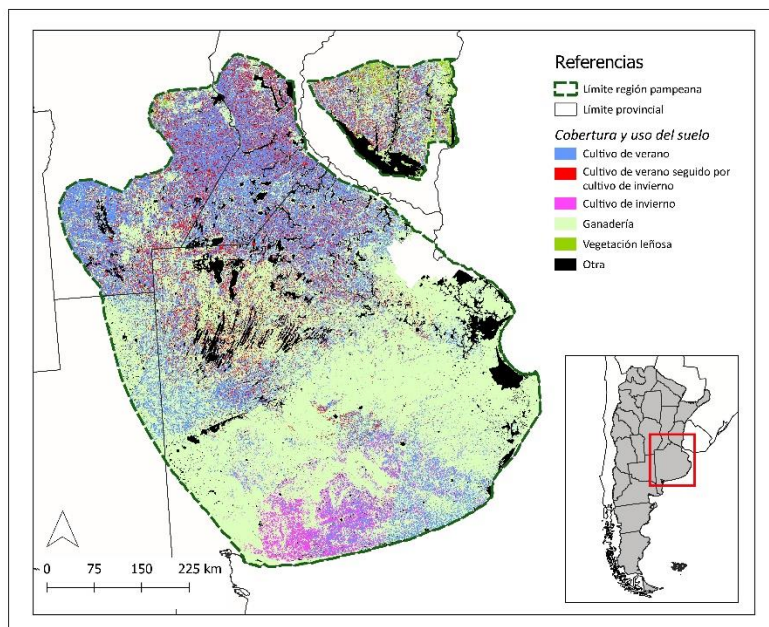
El cultivo de soja GM se sembró por primera vez en 1996, y desde ese momento el área sembrada con cultivos GM (como maíz, algodón y girasol) ha ido en aumento. La adopción de los cultivos GM se complementó con el sistema de labranza de siembra directa, que venía ocurriendo aceleradamente desde la década del 80 (Oesterheld, 2008). La siembra directa disminuye la erosión de los suelos, facilita el doble cultivo en el mismo año (i.e. trigo y soja de segunda), disminuye la pérdida de agua por evapotranspiración, lo que favorece la eficacia de los fertilizantes. Sin embargo, el reemplazo de la labranza tradicional por la siembra directa dependió exclusivamente del barbecho químico post-aplicación de plaguicidas, que junto las variedades GM resistentes contribuyeron a incrementar el rendimiento de los cultivos (INTA, 2011; Satorre, 2005). Actualmente, más del 90% de la superficie cultivable del territorio nacional se realiza bajo siembra directa (Rainaud, 2019) y más del 90% de los principales cultivos sembrados son GM, lo que convierte a la Argentina en el tercer productor mundial de cultivos GM después de Estados Unidos y Brasil (ArgenBio, 2020).

El uso de cultivos GM y su paquete tecnológico asociado, también se vio reflejado en el mercado de Productos Fitosanitarios, siendo los herbicidas el principal segmento del mercado. En el año 2014, el glifosato fue el principal herbicida comercializado representando el 62% del total, aunque existe un incremento cada vez mayor del uso de otros herbicidas distintos para aplicaciones vinculadas a la resistencia de malezas al glifosato. El segundo segmento en importancia fue el de los insecticidas, y para el mismo año se comercializaron 17,6 millones de litros, seguidos en tercer lugar por los fungicidas (CASAFE, 2014 estudio de mercado).

### **1.5. Contaminación por plaguicidas en la región pampeana**

Las Pampas constituyen el ecosistema de praderas más importante de la Argentina y con sus 540.000 km<sup>2</sup> de superficie, es una de las regiones más alteradas por la intensificación agrícola (Brown et al., 2006). Al igual que en el resto de la Argentina, la agricultura se adecuó a un paquete tecnológico simplificado y de alta productividad integrado por cultivos transgénicos, siembra directa, mayor uso de fertilizantes y plaguicidas, y en menor medida, agricultura de precisión (Viglizzo y Jobbaghy, 2012). Durante la campaña

2018/19 la superficie de área sembrada en la región pampeana correspondió a 23,3 millones de hectáreas para los cultivos de verano, mientras que los cultivos de invierno representaron una superficie de 4 millones de ha. (Figura 1.4) (Boasso et al., 2019).



**Figura 1.4.** Principales cultivos de la región pampeana durante la campaña 2018/19.

Entre el 2012 y 2013, se realizó un estudio en la provincia de Buenos Aires (que ocupa aproximadamente el 57% de la región pampeana), con el fin de visualizar el impacto de los agroquímicos utilizados normalmente en la región. Para ello, se elaboró un índice de agresividad potencial por cultivo que combinaba la clasificación de los plaguicidas según su toxicidad aguda (SENASA, 2012), y la cantidad aplicada. Los principales cultivos extensivos de verano (maíz, girasol, soja), y de invierno (trigo, cebada, etc.) son los que representaron mayor riesgo de toxicidad por uso de plaguicidas. Considerando el modelo tecnológico predominante, los cultivos de verano resultaron más peligrosos que los de invierno, ya que utilizaron mayores cantidades y/o productos con mayor toxicidad que los cultivos de invierno (Defensor del Pueblo de la Provincia de Buenos Aires y Universidad Nacional de La Plata, 2015).

Debido a la vasta superficie cultivada de la región pampeana, el uso de plaguicidas genera preocupación por su persistencia y su impacto sobre la biodiversidad. Existen numerosos estudios realizados en la región pampeana, donde se detectó la presencia de residuos de plaguicidas en aguas superficiales y subterráneas al igual que en sedimentos, suelos, en



agua de lluvia, e incluso en la biota (Alonso et al., 2018; Bonansea et al., 2013; Brodeur et al., 2017; Castro Berman et al., 2018; Darder et al., 2016; De Gerónimo et al., 2014; Etchegoyen et al., 2017; Lupi et al., 2015; Pérez et al., 2021; Peruzzo et al., 2008; Primost et al., 2017; Ronco et al., 2016).

### **1.6. Uso de aves en el proceso regulatorio de plaguicidas en Argentina**

Los plaguicidas son químicos tóxicos diseñados específicamente para ser liberados en el ambiente. Debido a los riesgos asociados al uso de plaguicidas, todos los países cuentan con leyes y regulaciones para controlar su producción, comercialización y uso. En Argentina, el registro de plaguicidas está regulado por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), y para su aprobación exige el testeo toxicológico en aves (SENASA, 1999). Sin embargo, aunque los plaguicidas son muy utilizados en la Argentina, no existen protocolos o guías nacionales para el testeo en aves. En su lugar, se recomienda el uso de protocolos internacionales como los utilizados en Europa o Estados Unidos. Estos estudios incluyen dos ensayos agudos de letalidad: una evaluación de la toxicidad aguda donde una sola dosis es administrada oralmente (OECD, 2016; USEPA, 2012a), y una evaluación subaguda donde el plaguicida es administrado en distintas concentraciones a través de la dieta durante 5 días (USEPA, 2012b). La evaluación de la toxicidad aguda indica la sensibilidad de las especies de aves al plaguicida, mientras la evaluación subaguda provee una medida de la capacidad de las aves para hacer frente a una dieta contaminada durante un período específico. La falta de testeos en aves nativas es una debilidad del proceso regulatorio, así como la ausencia de testeos obligatorios en aves paseriformes, que normalmente son más sensibles que otros grupos de aves, y representan aproximadamente el 60% de las especies de aves del mundo.

El uso de especies nativas para la evaluación del riesgo de los plaguicidas es recomendada debido a que provee mayor realismo ambiental (Furley et al., 2018). Idealmente, las especies testeadas deben representar un amplio rango de sensibilidades, hábitats y grupos tróficos, y deben ser económica, biológica y/o recreacionalmente importantes (USEPA, 1975). También es conveniente que las especies testeadas sean abundantes y ampliamente distribuidas, dado que la probabilidad de que se encuentren expuestas a los plaguicidas es mayor (USEPA, 1982). Otros factores a tener en cuenta en la selección de la especie de estudio, es la facilidad de su mantenimiento en el laboratorio, y la cantidad de información disponible sobre esta especie. Sobre todo, la especie de estudio no debe

encontrarse en estado amenazado o peligro de extinción (USEPA, 2012c). Aunque los expertos generalmente recomiendan el uso de aves criadas en cautiverio, el uso de aves silvestres se considera aceptable en el caso de las especies paseriformes, debido a la falta de cría de ciertas especies, y a la escasa información disponible al respecto (Mineau et al., 1996a; USEPA, 2014).

### **1.7. El tordo músico (*Agelaioides badius*) como modelo experimental**

El uso de ictéridos como modelo de ave paseriforme en estudios de laboratorio es frecuente y existe información detallada sobre su mantenimiento (Avery et al., 1994, 1993; Fair et al., 2010; Wolfe and Kendall, 1998). En Argentina algunos de los ictéridos más comunes: el tordo renegrado (*Molothrus bonaerensis*,) tordo pico corto (*Molothrus rufoaxillaris*) y el tordo músico (*Agelaioides badius*) han sido ampliamente estudiados por su condición de parásito de cría: los tordos renegrado y pico corto; o de hospedador: el tordo músico (De Mársico et al., 2010; Fiorini et al., 2009; Ursino et al., 2017, 2011). Además existe información sobre su uso en estudios de laboratorio (Addy-Orduna et al., 2011; Diaz et al., 2011), y recientemente se han propuesto como modelos experimentales en evaluaciones ecotoxicológicas (Brodeur y Poliserpi, 2017).

*Agelaioides badius* (Vieillot 1819), es una especie paseriforme que pertenece a la familia Icteridae. Un tordo adulto tiene un largo aproximado de 18 cm y pesa entre 40 y 50 g. Los tordos son monomórficos: machos y hembras tienen el mismo plumaje y no pueden ser distinguidos (Lowther, 2010). Su coloración es marrón grisáceo con alas rufas, y las zonas loreal y alrededor de los ojos son oscuras o negras creando una “máscara” (Figura 1.5A) (Narosky e Yzurieta, 2010).



**Figura 1.5.** A) Tordo músico (*Agelaioides badius*), B) distribución del tordo músico (Adaptado de Birdlife International, 2021).

Los tordos músico son nativos de la zona centro-sur de Sudamérica y se encuentran en la mitad norte de Argentina, así como en Bolivia, Uruguay, Paraguay y en el centro-sur de Brasil (Figura 1.5B) (BirdLife International, 2021). Se encuentran en ambientes semiabiertos como arbustales y bosques abiertos, así como en ambientes modificados por la actividad humana siendo muy frecuentes en los campos de cultivo (Frutos et al., 2016; Goijman et al., 2015). Debido a su amplia distribución y abundancia, el tordo músico está clasificado como de “menor preocupación” por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (BirdLife International, 2021).

El tordo músico es una especie gregaria sedentaria que no presenta grandes movimientos estacionales. Suele verse en parejas, o en grupos de hasta 30 individuos. (Lowther, 2010). Durante la época no reproductiva ocurren los mayores desplazamientos, y es cuando los tordos músicos forman bandadas y pueden alejarse de su territorio para alimentarse (Fraga, 1991). Narosky e Yzurieta (2010), reportan que los tordos músicos también forman bandadas mixtas con otros ictéridos, *Zonotrichia capensis*, *Paroaria coronata*, y *Sicalis flaveola*, entre otros (Del Barco and Beltzer, 2005). Durante la época reproductiva, el desplazamiento es bajo, y los adultos rara vez se alejan más de 1000 metros del nido (Jaramillo y Burke, 1999).

La época reproductiva del tordo músico comienza en diciembre y se puede extender hasta marzo, cuando los volantones dejan el nido (De Mársico et al., 2010). Los tordos tienen un sistema de cría social compuesto por varias parejas monógamas, y ayudantes. Los ayudantes suelen ser pichones nacidos el año anterior, que colaboran con la alimentación

de los nuevos pichones, su acicalamiento, y con la detección y defensa contra predadores o parásitos de cría (Fraga, 1991). Los nidos del tordo músico son parasitados principalmente por el tordo de pico corto (*Molothrus rufoaxillaris*), que es un parásito de cría especialista, y por el tordo renegrado (*Molothrus bonaerensis*) (Brodeur y Poliserpi, 2017; De Mársico et al., 2010)

Los primeros registros sobre la alimentación de los tordos músicos corresponden a descripciones generales, donde se menciona que consume granos e insectos. A pesar de ser una especie común, existen pocos registros sobre la dieta del tordo músico. En un estudio del contenido estomacal de 59 tordos se determinó, de acuerdo al número, volumen y frecuencia de los ítems alimentarios, que la principal categoría alimenticia fueron las semillas, seguida de insectos, y en menor medida, otros organismos (Beltzer, 2005). En base al espectro de los ítems alimentarios, y a su importancia relativa, en el mismo estudio se determinó que la dieta básica del tordo músico es granívora-insectívora. Además, se determinó que en base a la composición de la dieta, los tordos músico se alimentan preferentemente en el suelo (Del Barco and Beltzer, 2005).

## **1.8. HIPOTESIS**

El imidacloprid utilizado en el tratamiento de semillas de los cultivos extensivos de la región pampeana representa un riesgo para las poblaciones las aves que se alimentan de las semillas tratadas, mediante alteraciones en el comportamiento y en los procesos fisiológicos y bioquímicos.

## 1.9. OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo consiste caracterizar los efectos toxicológicos del insecticida imidacloprid en las aves para desarrollar indicadores de exposición y efecto, y evaluar el riesgo que representa para las aves silvestres el uso del imidacloprid como curasemillas en los cultivos extensivos de granos.

### *Objetivos específicos*

- 1- Desarrollar protocolos para uso del tordo músico (*Agelaioides badius*) como modelo experimental en evaluaciones ecotoxicológicas.
- 2- Generar datos de exposición y efecto al imidacloprid con el el tordo músico (*Agelaioides badius*) y realizar una evaluación de riesgo para estimar el riesgo que posee el tratamiento de semillas con imidacloprid para las aves passeriformes nativas de la Región Pampeana.
- 3- Caracterizar los efectos del imidacloprid en el tiempo luego de una ingesta subaguda, mediante la evaluación de la distribución en distintos tejidos del tordo músico (*Agelaioides badius*); y caracterizar los efectos biológicos inducidos mediante la determinación de parámetros hematológicos, genéticos, y bioquímicos a distintos tiempos desde la administración del imidacloprid
- 4- Caracterizar el efecto subcrónico del imidacloprid ingerido a través de las semillas en el tordo músico, mediante la evaluación del consumo diario, comportamiento, y parámetros hematológicos, genéticos, y bioquímicos.
- 5- Caracterizar el efecto de una exposición crónica a las semillas tratadas con imidacloprid mediante la evaluación del consumo diario, pruebas comportamentales, y parámetros hematológicos, genéticos, y bioquímicos del tordo músico.
- 6- Identificar potenciales biomarcadores para el reconocimiento de la exposición subletal de las aves al imidacloprid en condiciones de campo.

## 2. CAPÍTULO 1. Toxicidad aguda del insecticida imidacloprid para las aves de los agroecosistemas: evaluación de riesgo utilizando datos del tordo músico (*Agelaioides badius*)<sup>1</sup>

### 2.1. INTRODUCCIÓN

Los neonicotinoides son la clase de insecticidas más utilizada en el mundo debido a su alta especificidad para los insectos, persistencia y variabilidad de usos (Jeschke y Nauen, 2008). Los neonicotinoides se aplican en los principales cultivos extensivos como soja, trigo, arroz, maíz, sorgo, algodón; así como en otros cultivos como hortalizas, frutales y forestales. El principal uso de los neonicotinoides es como curasemilla, aunque también son utilizados en aplicaciones foliares, en inyecciones en el suelo o troncos, y hasta como antiparasitarios (Jeschke *et al.*, 2011; Wood y Goulson, 2017). El uso como curasemilla permite que los neonicotinoides solubles en agua, pasen de la semilla a los tejidos de la planta durante la germinación, brindándole protección en contra de los insectos chupadores (Elbert *et al.*, 2008; Simon-Delso *et al.*, 2015). Debido su amplio uso y persistencia, el uso a gran escala de los neonicotinoides ha resultado en la contaminación del ambiente. Los neonicotinoides llegan al suelo a través de las aplicaciones directas, o mediante la siembra de semillas tratadas donde solo el 5% de la sustancia activa pasa a la planta (Sur and Stork, 2003). Una vez en el suelo, la vida media de algunos neonicotinoides puede exceder los 1000 días, y la concentración se acumula si existen repetidas aplicaciones (Bonmatin *et al.*, 2015, 2005; Schaafsma *et al.*, 2015; Limay-Rios *et al.*, 2016;). Los eventos de lluvia lavan los neonicotinoides del suelo, que escurren y alcanzan los cuerpos de agua cercanos a los campos de cultivo, llegando a lagos, ríos y al agua subterránea ( Hladik *et al.*, 2014; Anderson *et al.*, 2015; Morrissey *et al.*, 2015; Humann-Guillemot *et al.*, 2019). Incluso la vegetación silvestre presente en los campos de cultivo es capaz de acumular neonicotinoides a través de las raíces y

---

<sup>1</sup> Capítulo publicado.

Poliserpi, M. B., Cristos, D. S., & Brodeur, J. C. (2020). Imidacloprid seed coating poses a risk of acute toxicity to small farmland birds: A weight-of-evidence analysis using data from the grayish baywing *Agelaioides badius*. *Science of The Total Environment*, 142957. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142957>

traslocarlos al polen y néctar de las flores (Greatti *et al.*, 2006; Krupke *et al.*, 2012; Botías *et al.*, 2015).

Los neonicotinoides actúan uniéndose a los receptores nicotínicos post-sinápticos del sistema nervioso central, lo que causa la parálisis y la muerte de los insectos blanco. Los neonicotinoides son altamente selectivos, y pueden ser hasta 450 veces más tóxicos para los insectos que para los mamíferos (Jeschke and Nauen, 2008b; Tomizawa and Casida, 2005). La diferencia de toxicidad entre insectos y mamíferos se debe a los tipos de subunidades que componen los receptores post-sinápticos de cada grupo y a su ubicación en el sistema nervioso (Tomizawa *et al.*, 1999; Tomizawa and Casida, 2005). El imidacloprid (IMI) es el neonicotinoide más usado y con mayor tiempo en el mercado (Bass *et al.*, 2015; Gibbons *et al.*, 2015). A pesar de su selectividad por los insectos, la toxicidad del IMI está clasificada como moderada a alta para las aves, moderada para los mamíferos (ratas y ratones), y prácticamente no tóxica para peces (con excepción de la trucha arcoíris) y anfibios (Gibbons *et al.*, 2015).

Las aves se encuentran expuestas a los neonicotinoides directamente a través del consumo de semillas tratadas que quedan disponibles en los lotes de cultivo, ya sea porque las semillas no quedan bien enterradas, o debido a derrames que ocurren al momento de la siembra (de Snoo and Luttik, 2004; Balfour *et al.*, 2016; Lopez-Antia *et al.*, 2016; Millot *et al.*, 2017; Roy *et al.*, 2019). De hecho, se han reportado casos de mortandad de aves silvestres por intoxicación con neonicotinoides luego del consumo de semillas tratadas (Berny *et al.*, 1999; Millot *et al.*, 2017; Botha *et al.*, 2018).

La toxicidad aguda los plaguicidas se mide y compara a través de estudios en los cuales las aves son forzadas a ingerir diversas concentraciones del plaguicida. En estos estudios, la concentración que causa la mortalidad de la mitad de la población experimental es registrada como la dosis letal media ( $DL_{50}$ ), y expresada como una proporción del peso corporal (pc) (Mineau y Palmer, 2013). Para calcular la  $DL_{50}$ , existen protocolos estandarizados como los de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) y el Organismo para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) (USEPA, 2012a; OECD, 2016). La Tabla 2.1 presenta los valores previamente estimados de la  $DL_{50}$  del IMI en distintas especies de aves. Las concentraciones necesarias para alcanzar la letalidad varían según la especie testeada con valores entre 13,9 y 238 mg IMI/kg pc para la perdiz gris y el ánade real, respectivamente. Los datos

de toxicidad aguda son esenciales para la realización de evaluaciones de riesgo ambiental sobre las cuales se basa el proceso regulatorio de registro de los plaguicidas. Por ejemplo, la USEPA requiere los datos de la LD50 de una especie de ave passeriforme, y de una especie de ave acuática o de un ave de caza, mientras que la OECD solo requiere datos provenientes de una sola especie (USEPA, 2012b; OECD, 2016). Sin embargo, para lograr un análisis preciso sobre el riesgo que puede implicar el IMI para las aves, es necesario poder contar con un amplio número de datos, ya que si pocas especies son testeadas, se corre el riesgo de subestimar el peligro (Mineau y Palmer, 2013).

En América Latina, la falta de testeo en especies nativas es una debilidad general del proceso regulatorio (Furley *et al.*, 2018). Lo mismo sucede con la ausencia de tests obligatorios en aves passeriformes que son más sensibles que otros grupos de aves, y representan aproximadamente el 60% de las especies de aves (Mineau *et al.*, 1996; Nagy, 2005; Brodeur and Poliserpi, 2017). En Argentina, el uso de IMI está aprobado para la mayoría de los cultivos extensivos de la Región Pampeana, y es ampliamente utilizado como curasemillas (SENASA, 2020). Sin embargo, hasta el momento existe un solo trabajo que estudió la toxicidad de una especie de ave nativa no passeriforme, la paloma torcaza (*Zenaida auriculata*), y demostró que el consumo de solo unos pocos granos de sorgo tratados con IMI son suficientes para causar la mortalidad (Addy-Orduna *et al.*, 2019). En este contexto, y debido a que no existen datos de toxicidad disponibles para ninguna especie de ave passeriforme de América Latina, el objetivo del presente estudio fue estimar el riesgo que posee el tratamiento de semillas con IMI para las aves passeriformes nativas de la Región Pampeana de Argentina. Como Argentina no posee un esquema específico de evaluación de riesgo, se empleó el esquema escalonado de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (EFSA, 2009) utilizando datos de exposición y efecto del IMI generados con el tordo músico (*Agelaioides badius*), una especie de ave passeriforme de América del Sur.



**Tabla 2.1.** Toxicidad aguda (DL<sub>50</sub>) del imidacloprid en distintas especies de aves. i.a.: ingrediente activo.

Nombre común	Nombre científico	Familia	IMI testado	DL <sub>50</sub> (mg/kg)	95% CV	Referencia
<b><u>IMI de grado técnico</u></b>						
Canario	<i>Serinus canarius</i>	<i>Fringilidae</i>	Grado 94,8% i.a.	25-50		Grau, 1994 MRID 43310403 en Durkin, 2015a
Gallina	<i>Gallus gallus</i>	<i>Phasianidae</i>	Grado	50		Siddiqui, 2004
Codorniz japonesa	<i>Coturnix coturnix</i>	<i>Phasianidae</i>	Grado 95,3% i.a.	31	22 - 50	Grau, 1988 MRID 43310401 en SERA, 2015
Codorniz japonesa	<i>Coturnix coturnix</i>	<i>Phasianidae</i>	Grado 98% i.a.	17,02		Rawi <i>et al.</i> , 2019
Codorniz japonesa	<i>Coturnix coturnix</i>	<i>Phasianidae</i>	Grado 98% i.a., +PEG-600	15,98		Rawi <i>et al.</i> , 2019
Ánade real	<i>Anas platyrhynchos</i>	<i>Anatidae</i>	Grado 96,6% i.a.	283		Hancock, 1996 en FAO, 2018
Codorniz cotuí	<i>Colinus virginianus</i>	<i>Odontophoridae</i>	Grado 97,4% i.a.	152	103 - 227	Toll, 1990 MRID 42055308 en Durkin, 2015a
Paloma	<i>Columba livia</i>	<i>Columbidae</i>	Grado 98,4% i.a.	25 - 50		Grau 1994 MRID 43310404 en Durkin, 2015a
<b><u>IMI en productos formulados</u></b>						
Gallina	<i>Gallus gallus</i>	<i>Phasianidae</i>	Formulado 17,8%	104,1		Kammon <i>et al.</i> , 2010
Torcaza	<i>Zenaida auriculata</i>	<i>Columbidae</i>	Formulado Imida Nova 60%	59	39 - 82	Addy-Orduna <i>et al.</i> , 2019
Tordo músico	<i>Agelaioides badius</i>	<i>Icteridae</i>	Formulado Confidor 35%	57,11	40,94 – 86,38	Este estudio
Gorrión	<i>Passer domesticus</i>	<i>Passeridae</i>	Formulado granular 2,5% i.a.	41	24 - 260	Stafford 1991 MRID 42055309 en Durkin, 2015a
Codorniz japonesa	<i>Coturnix coturnix</i>	<i>Phasianidae</i>	Formulado Confidor	28,7		Ivanova <i>et al.</i> , 2013
<b><u>Desconocido</u></b>						
Perdiz gris	<i>Perdix perdix</i>	<i>Phasianidae</i>		13,9		Grolleau 1991 en Gibbons <i>et al.</i> , 2015

## **2.2. METODOLOGÍA**

### **2.2.1. Especie estudiada**

El tordo músico (*Agelaioides badius*) es una especie paseriforme que pertenece a la familia Icteridae. Al ser una especie monomórfica, machos y hembras no se distinguen entre sí, aunque los machos tienden a ser ligeramente más grandes. Un adulto de tordo músico tiene un largo aproximado de 18 cm y un peso entre 40 y 50 g. Su coloración es marrón grisáceo con alas rufas, y la zona loreal y alrededor de los ojos es oscura o negra creando una “máscara”. La punta de las plumas primarias, la zona interna de las secundarias, la cola, y las patas y garras son negras (Narosky and Yzurieta, 2010). La dieta del tordo músico se compone principalmente de semillas y frutos (80%), aunque también consumen insectos en menor medida (Beltzer, 1988; Del Barco and Beltzer, 2005). Los tordos músico son nativos de la zona centro-sur de Sudamérica y se encuentran en la mitad norte de Argentina, Bolivia, Uruguay, Paraguay y centro-sur de Brasil. Es una especie sedentaria que no presenta movimientos estacionales, aunque en invierno los movimientos locales resultan en un aumento del número de individuos por bandada. Durante la época reproductiva (noviembre a marzo) los estudios de anillamiento indican que los adultos rara vez se alejan más de 1000 m del nido (Jaramillo and Burke, 1999). Los tordos músico se encuentran en ambientes semiabiertos incluyendo arbustales y bosques abiertos, así como en ambientes modificados por la actividad humana siendo muy frecuentes en los campos de cultivo (Frutos *et al.*, 2016; Goijman *et al.*, 2015; Lowther, 2010). Debido a su amplia distribución y abundancia, los tordos músico están clasificados como de “menor preocupación” por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (BirdLife International, 2020).

### **2.2.2. Captura y aclimatación de las aves.**

Adultos de tordo músico (*Agelaioides badius*) fueron capturados dentro de las 650 hectáreas pertenecientes al Centro Nacional de Investigación Agropecuaria en la localidad de Hurlingham, provincia de Buenos Aires, Argentina. La colecta de las aves se realizó en el periodo de otoño- invierno del hemisferio Sur (entre abril y junio) para evitar la época reproductiva. El método de captura consistió en la colocación de trampas con cebo de tipo “walk in” donde las aves ingresan caminando a la trampa en busca de alimento y quedan atrapadas (Ralph *et al.*, 1993).

Se utilizó una trampa de forma circular recubierta de malla de alambre con un diámetro de un metro y una altura de 15 cm. Las aves ingresan a la trampa por cuatro túneles de 15 cm de altura exterior y de 10 cm de altura interior. Las dimensiones de los túneles permiten que los tordos ingresen erguidos, pero que deban bajar la cabeza para salir, lo cual dificulta la salida de la trampa (Figura 2.1). Tres días antes de colocar las trampas, los sitios de captura fueron cebados diariamente para asegurar un alto número de visitas de los tordos músico al sitio de captura. Como cebo se utilizaron pedazos de pan ya que, a diferencia de las semillas, es más conspicuo y las aves lo detectan más rápido. Las trampas se colocaron diariamente hasta obtener la cantidad de tordos deseada. Mientras la trampa estuvo activa, se la monitoreó cada 15-20 minutos de manera de poder retirar rápidamente a los individuos atrapados y así disminuir el estrés asociado al confinamiento (Brodeur y Poliserpi, 2017).

Una vez capturadas, las aves fueron inmediatamente transportadas al laboratorio para su aclimatación. Dado que los tordos músicos son aves sociales, se los colocó de a dos o tres individuos en jaulas de 60x40x40 cm. Las aves estuvieron aclimatadas al cautiverio bajo condiciones ambientales estables y durante un período no menor a 30 días antes de empezar los experimentos (USEPA, 2012a; OECD, 2016). Durante la aclimatación, los tordos fueron mantenidos a una temperatura de  $23 \pm 2$  °C y con un fotoperiodo de 10:14 horas luz: oscuridad, correspondiente al período invernal. Las aves en aclimatación fueron alimentadas *ad libitum* con agua potable y una mezcla comercial de semillas vitaminadas para canarios (Ibis, Nor S.A., Argentina). Todas las capturas de aves fueron realizadas con el permiso de la Dirección de Flora y Fauna de la provincia de Buenos Aires (permiso #22500-38407/17).



**Figura 2.1.** Trampa tipo *walk in* utilizada para capturar individuos de tordo músico (*Agelaioides badius*).

### 2.2.3. Sustancias utilizadas

Para la determinación de la  $DL_{50}$  se utilizó el formulado comercial Confidor 35 sc® y para el tratamiento de semillas se utilizó Confidor OD®, ambos de la empresa Bayer®. Se utilizaron distintos formulados comerciales por la falta de disponibilidad en el mercado. Ambos productos Confidor® son suspensiones concentradas que contienen IMI (N-[1-[(6-Chloro-3-pyridyl)methyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl]nitramida, CAS. Nro. 13826-41-3), al 35% Confidor 35 sc® y al 20% el Confidor OD® 20%; en una mezcla patentada de surfactantes, emulsionantes y otros aditivos de composición reservada.

### 2.2.4. Determinación de la dosis letal media de un formulado de IMI ( $DL_{50}$ )

Dos días antes de la administración del imidacloprid, los tordos fueron identificados individualmente y ubicados cada uno en un sector de 30x40x40 cm de su jaula que fue creado posicionando un cartón opaco en el plano medio de la jaula. Se retiró el alimento y el agua cinco horas antes del inicio del experimento. Antes de dosificar a las aves se preparó una solución madre de IMI al 25% diluyendo Confidor® en el volumen adecuado de agua. Seis alícuotas de esta solución madre fueron disueltas en metanol al 50% y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la verificación analítica de la concentración de IMI durante las semanas siguientes.

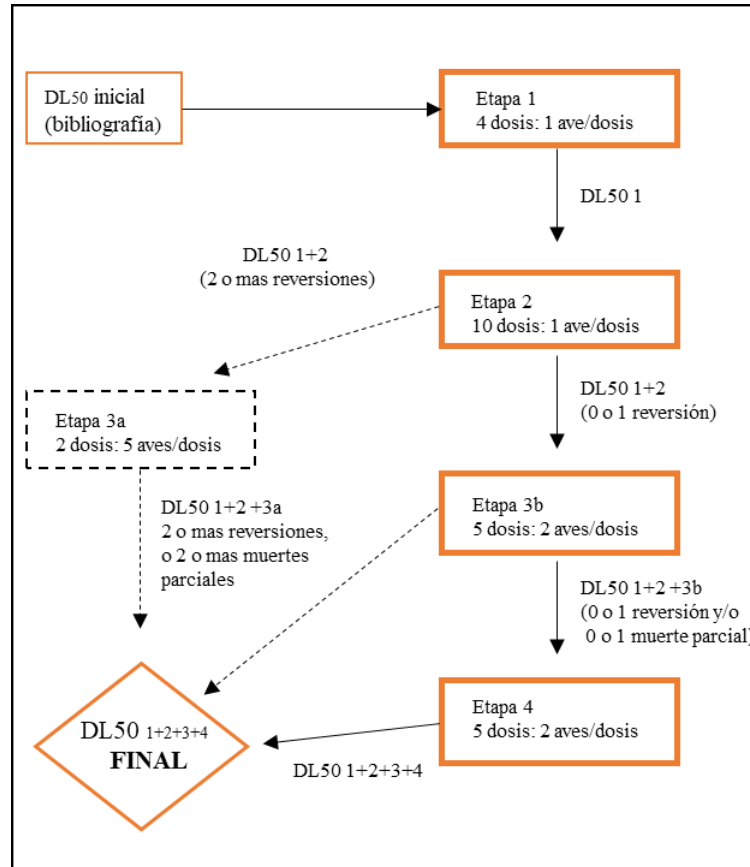
Cada tordo fue colocado en una bolsa de algodón y pesado con una exactitud de  $\pm 1\text{g}$  por medio de una balanza de resorte marca Pesola®. El volumen de solución madre

necesario para alcanzar la dosis de IMI requerida fue calculado en base al peso exacto de cada ave, y diluido en agua hasta un volumen final de 500  $\mu$ L de manera que todos los individuos recibieran el mismo volumen de líquido. A las soluciones preparadas se les agregó colorante alimentario color rojo, con el fin de controlar casos de regurgitación que serían conspicuos en el papel blanco colocado en la base de las jaulas.

Las soluciones de IMI (o de agua en el caso de las aves control) fueron administradas mediante una sonda gástrica de 2 mm embebida en vaselina líquida y unida a una jeringa de 1 mL. La administración de IMI nunca llevó más de 10 minutos. Una vez tratadas, las aves fueron devueltas rápidamente a su jaula de manera de minimizar el estrés generado por la manipulación (Brodeur y Poliserpi, 2017). Los tordos fueron nuevamente provistos con agua y comida *ad libitum* tres horas después de la administración de IMI. Se examinó a las aves con una frecuencia de 30 minutos durante 3 horas después de la dosificación y luego dos veces al día durante 3 días. En cada oportunidad se registraron la mortalidad y distintos aspectos generales del comportamiento como el aspecto general del plumaje, la postura, temblores, y el equilibrio al caminar o percharse, entre otros. Al finalizar el experimento las aves fueron eutanasiadas en una cámara de dióxido de carbono y decapitadas, de acuerdo con las guías institucionales (CICUAE) e internacionales de bienestar animal (Fair *et al.*, 2010). Todos los procedimientos y protocolos que involucraron animales vivos fueron aprobados por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación (CICUAE-INTA permiso #03/2015).

La  $DL_{50}$  del IMI para el tordo músico fue calculada según las indicaciones del protocolo estandarizado número 223: “Toxicidad aguda en aves” de la OECD (OECD, 2016). La Figura 2 presenta de manera gráfica las distintas etapas del protocolo. El protocolo 223 de la OECD está diseñado para reducir el número de individuos experimentales mediante un diseño secuencial, y está validado mediante simulaciones en las que se demostró que produce resultados equivalentes a aquellos obtenidos mediante un diseño convencional (OECD, 2010; Edwards *et al.*, 2017). La determinación de reversiones y muertes parciales es esencial para identificar cuáles son las etapas correctas para continuar con el protocolo o para finalizarlo (Figura 2.2). La reversión se refiere a instancias en donde el porcentaje de mortalidad a una determinada dosis es mayor que el porcentaje de mortalidad observado a una dosis mayor; mientras que una muerte parcial

ocurre cuando se dosifica a más de un individuo con la misma dosis y se observa una mortalidad entre el 0 y el 100%.



**Figura 2.2.** Diseño experimental para el cálculo de la DL<sub>50</sub> y la pendiente de la curva dosis- respuesta. Las etapas del protocolo se definen según los resultados de las reversiones o muertes parciales observadas. Las líneas solidas indican las etapas que se llevaron a cabo para obtener la DL<sub>50</sub> del IMI en el tordo músico. Adaptado del Protocolo 223 de la OECD (2016).

En la Etapa 1, cuatro tordos fueron tratados con cuatro dosis distintas (i.e., 8.48, 31.3, 115, 424 mg IMI/ kg pc) calculadas en una escala logarítmica alrededor de una dosis de referencia de 60 mg IMI/kg pc, obtenida por Addy-Orduna *et al.* (2019) para *Zenaida auriculata*. Las mortalidades observadas en la Etapa 1 proporcionaron una DL<sub>50</sub> provisoria a partir de la cual se calcularon para la Etapa 2, diez nuevas concentraciones (20,6; 26,1; 33,1; 42; 53,3; 67,6; 85,7; 109; 138; 175 mg IMI/kg pc), cada una administrada a un solo individuo. En las Etapas 3 y 4 (etapa 3b), se trataron dos aves por

concentración de IMI, por un total de cinco concentraciones (Etapa 3b: 29,7; 37,7; 47,8; 60,7; 77,1 mg IMI/kg pc; Etapa 4: 35; 44,4; 56,4; 71,5; 90,8 mg IMI/kg pc). En la Tabla 2 se presentan el número de individuos tratados, la mortalidad, las DL<sub>50</sub> y las pendientes de las curvas provisionarias de cada etapa experimental. Todas las aves fueron observadas durante 14 días a partir de la dosificación, sin embargo, debido a que el protocolo 223 de la OECD lo permite, a partir del tercer día de dosificación se continuó con las etapas experimentales ya que las aves tratadas no exhibieron efectos de intoxicación (OECD, 2016).

#### **2.2.5. Consumo diario (CD) de semillas sin tratar**

Para estimar el peso de semillas que los tordos consumen normalmente por día, 37 individuos fueron colocados en jaulas individuales de 30x40x40 cm y alimentados *ad libitum* con agua y semillas de mijo pelado (Forrajera Lunic, Argentina) durante 15 días para asegurar su aclimatación a las condiciones experimentales (temperatura  $23 \pm 2$  °C; fotoperiodo 10:14 horas luz: oscuridad). Luego de este periodo de aclimatación, cada tordo fue colocado en una bolsa de algodón y pesado con una exactitud de  $\pm 1$  g por medio de una balanza de resorte marca Pesola®. El CD de semillas fue estimado durante nueve días. Para lograr esto, todas las mañanas entre las 10 y 12 am se colocaron 10 g de semillas y al día siguiente a la misma hora, se recolectaron las semillas que quedaban en el comedero y bandeja. Las semillas colectadas fueron secadas en una estufa a 37° C antes de ser pesadas. El CD de cada ave se estimó calculando la diferencia entre el peso de las semillas ofrecidas y las que quedaron sin consumir. Se calculó el número de semillas equivalentes al CD para los distintos cultivos de la Región Pampeana de Argentina. Se dividió el CD por el peso promedio de cada tipo de semilla. El peso promedio de la semilla fue obtenido para cada cultivo a partir de reportes técnicos (Barbera, P. and Benítez, 2016; Cencig *et al.*, 2017; Enrico *et al.*, 2019; Ferreyra and Murgio, 2019; Flores *et al.*, 2019; Mendez *et al.*, 2014; Moreyra *et al.*, 2014).

#### **2.2.6. Número de semillas equivalentes a la DL<sub>50</sub> y área equivalente**

Para realizar la evaluación de riesgo, se calculó el número de semillas que deberían ser ingeridas para alcanzar la DL<sub>50</sub> de los principales cultivos extensivos de la Región Pampeana: avena, trigo, soja, girasol, maíz, sorgo y alfalfa. La concentración de

IMI usada en los cálculos para cada tipo de semillas corresponde al valor máximo de recomendado según las normas de uso vigentes en la Argentina (SENASA, 2020). Primero se calculó la cantidad de IMI presente en una sola semilla, en base al tratamiento de semillas específico para cada cultivo y al peso promedio de una semilla, obtenido de los reportes técnicos mencionados en la sección anterior.

En paralelo, la cantidad de IMI que un tordo debe ingerir para alcanzar la  $DL_{50}$  (estimada en la Sección 2.2.4) se calculó para un ave promedio, usando el peso promedio de los 37 tordos utilizados en la Sección 2.2.5. Luego, se calculó el número de semillas tratadas con IMI que un tordo de peso promedio debería ingerir para alcanzar una dosis equivalente a la  $DL_{50}$ . La cantidad de IMI que un tordo debe ingerir para alcanzar la  $DL_{50}$ , estimada previamente, se dividió por la cantidad de IMI presente en una sola semilla. Finalmente, el porcentaje del CD necesario para alcanzar la  $DL_{50}$  se calculó dividiendo el número de semillas correspondiente a la  $DL_{50}$  por el número de semillas que corresponde al CD.

El número de semillas necesarias para alcanzar la  $DL_{50}$  se comparó con el número de semillas presentes luego de la siembra, calculando el área teórica que contendría el número de semillas requeridas para alcanzar la  $DL_{50}$ . Para realizar los cálculos, se utilizó información, previamente reportada en la literatura, sobre la densidad de semillas presentes luego de la siembra (De Snoo, 2004; Lopez-Antia *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2019; Lennon *et al.*, 2020). Cuando la disponibilidad de datos lo permitió, las estimaciones sobre la densidad de semillas se realizaron para el centro y el borde de los lotes de cultivo. Finalmente, el número de semillas que un tordo músico necesita ingerir para alcanzar la  $DL_{50}$  se comparó con el número promedio de semillas ingerido en un evento de alimentación o “picoteo”. Los eventos de alimentación (o picoteos) representan la cantidad máxima de semillas que un ave ingiere durante una sola visita a los comederos, o en este caso a los derrames de semillas (Prosser, 2001).

### **2.2.7. Mortalidad de tordos alimentados con semillas tratadas**

Para conocer el efecto agudo que puede tener el consumo de semillas tratadas con IMI sobre el tordo músico, tres individuos fueron alimentados con semillas tratadas con una concentración de 3 g IMI/kg de semillas (sem.), la cual es representativa de las dosis utilizadas en cultivos de alfalfa, girasol, maíz y sorgo (SENASA, 2020). De acuerdo con



las instrucciones del formulado comercial se preparó una solución conteniendo 7,5 mL de Confidor OD® en 17,5 mL de agua destilada. Los 25 mL de la solución final fueron asperjados sobre 500g de semillas de mijo pelado y luego se dejó secar las semillas tratadas a temperatura ambiente. Una vez secas, las semillas tratadas fueron fraccionadas en alícuotas de 15 g que fueron almacenados a -20°C hasta su uso en los días siguientes. Dos alícuotas de 10 g fueron, además, separadas y almacenadas a -20°C para ser usadas en la confirmación analítica de la concentración de IMI presente en las semillas.

Como se describió anteriormente, las aves fueron mantenidas en jaulas individuales de 30x40x40 cm y alimentadas *ad libitum* con semillas de mijo pelado y agua (Forrajera Lunic, Argentina) durante 15 días antes de iniciar los experimentos de manera a asegurar su aclimatación a las condiciones experimentales (temperatura  $23 \pm 2$  °C; fotoperiodo 10:14 horas luz: oscuridad). Luego de este periodo de aclimatación, cada ave fue colocada en una bolsa de algodón y pesado con una exactitud de  $\pm 1$  g por medio de una balanza de resorte marca Pesola®.

El CD de las semillas tratadas fue estimado durante 7 días, siguiendo la metodología descrita en la Sección 2.5. Todas las mañanas entre las 10 y 12 am se colocaron 15 g de semillas (descongeladas el día anterior y conservadas a 4°C), y al día siguiente a la misma hora se recolectaron las semillas que quedaban en el comedero y bandeja. Diariamente la supervivencia y el consumo de cada ave se estimó calculando la diferencia entre el peso de las semillas ofrecidas y las que quedaron sin consumir. El uso de mijo pelado permitió asegurar que las dosis ingeridas calculadas fueran realmente consumidas, y que parte de la dosis no se perdiera en la cáscara de las semillas.

#### **2.2.8. Evaluación de riesgo**

Se utilizó el esquema de la EFSA para evaluar el riesgo de toxicidad aguda que poseen las semillas tratadas con IMI para el tordo músico cuando se utilizan para el tratamiento concentraciones regionalmente aprobadas (EFSA, 2009). En este esquema, el Nivel 1 de la evaluación de riesgo consiste en el cálculo de la Tasa entre la toxicidad aguda y la exposición (TER, por su nombre en inglés *Toxicity Exposure Ratio*). Para el cálculo del TER se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{TER} = \text{DL}_{50}/(\text{CAS}*(\text{CD}/pc))$$

Donde:

$DL_{50}$  es la dosis letal media calculada en la Sección 2.4.

CAS es la concentración de IMI utilizada en el tratamiento de semillas (mg/kg sem.).

CD es el consumo diario de semillas estimado en la Sección 2.5.

$pc$  es el peso corporal promedio de un tordo músico (calculado a partir del peso promedio de los 37 tordos utilizados en la Sección 2.5).

De acuerdo con el esquema de EFSA (2009), los siguientes valores límites deben ser aplicados:

Si  $TER \geq 10$  Se asume que no hay riesgo y no se requieren otras evaluaciones de riesgo.

Si  $TER < 10$  Se debe pasar al siguiente nivel y realizar una evaluación de riesgo refinada siguiendo la metodología basada en la evidencia.

### **2.2.9. Verificación analítica de las concentraciones nominales**

La solución de Confidor 35 sc® al 25% usada para la estimación de la  $DL_{50}$  fue diluida 1:2 en metanol antes de verificar analíticamente su contenido de IMI. Para esta determinación, se construyó una curva de calibración realizando diluciones seriadas en metanol de una solución estándar de IMI (CL40.0918, Chem-Lab, Bélgica).

Por su parte, la concentración en IMI de las semillas tratadas con Confidor OD® fue verificada analíticamente, extrayendo su contenido de IMI en una mezcla de sales con acetonitrilo. Durante un minuto, 10 g de semillas fueron colocadas en el vórtex junto a 5 mL de agua destilada que contenía 20% de cloruro de sodio y 40% de acetato de sodio y sulfato de magnesio. Luego de la agitación, la mezcla se extrajo con 20 mL de acetonitrilo que contenía ácido acético 5mM. La solución extraída se agitó y se colocó durante 30 minutos en el sonicador. Una vez terminada la sonicación, la mezcla se colocó por 30 minutos más en el rotor giratorio y después se centrifugó por 10 minutos a 10 000g. Finalmente, 20 mL del sobrenadante fue evaporado hasta sequedad a 45°C y resuspendido en 1,5 mL de ACN para su análisis. Las muestras para el control de calidad se realizaron fortificando semillas sin tratar con distintas concentraciones de una solución estándar de

IMI (CL40.0918, Chem-Lab, Bélgica), y sometidas al proceso de extracción descrito anteriormente.

El análisis químico de las muestras se realizó en el Laboratorio de Contaminantes Químicos, del Instituto de Tecnología en Alimentos del INTA. La concentración de imidacloprid fue evaluada mediante Cromatografía Líquida de Ultra-Resolución/Espectrometría de Masas con un detector cuadrupolo (Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC-MS)). Se utilizó una columna XBridge BEH C18 2.5  $\mu\text{m}$  2.1x150 mm y la fase móvil se compuso de una solución 0,1% de ácido acético en agua (A) y metanol (B). El gradiente de elución fue de la siguiente manera (%A: %B): (95:5) 0-2 minutos, (95:5)- (80:20) 2-5 minutos, (80:20)- (20:80) 5-10 minutos, (20:80)- (0:100) 10-11 minutos, (0:100) 11-13 minutos, (0:100)- (95:5) 13-14 minutos, y (95:5) 14-20 minutos para reacondicionar la columna a la siguiente muestra. Las configuraciones de adquisición del MS fueron: ESI positivo, ion 256,7 m/z. El límite de detección (LD) fue definido como la concentración más baja que podía ser diferenciada del nivel basal de ruido. Se calculó el LD como la relación 3:1 entre la señal más baja de IMI y la señal de ruido. Por su parte, el límite de cuantificación (LQ) se definió como la mínima concentración que fue posible de cuantificar dentro de la curva de calibración. Se calculó el QL como la relación 10:1 entre la señal más baja de IMI y la señal de ruido (Bonmatin *et al.*, 2003). Todo el método, incluidos la preparación de las muestras y el análisis por UPLC- cuadrupolo, fue validado en términos de linealidad, efecto matriz, precisión, recuperación, y LD y LQ.

#### **2.2.10. Análisis estadístico**

Se comparó el peso corporal de las aves tratadas versus control antes del cálculo de la  $DL_{50}$ , mediante una ANOVA de una vía, luego de comprobar la normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos. El valor de significancia fue  $p < 0,05$ . El análisis de la varianza y el cálculo de los promedios fueron realizados con el software estadístico SigmaStat (SPSS, Chicago, IL, USA).

Para calcular las dosis de cada etapa experimental, la pendiente de la curva dosis-respuesta, así como la  $DL_{50}$  y sus intervalos de confianza, se utilizó el programa “SEquential DEsign Calculator” (SEDEC) software Versión 1.3 (octubre 2009). El programa SEDEC se creó en asociación con el Protocolo 223 (OECD, 2016) y es un

software de acceso libre disponible en la página de la OECD (<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/softwaretobeusedwithtg223.htm>). El programa SEDEC ajusta los datos de mortalidad a un modelo probit estándar, basado en una función de distribución normal acumulada (Finney, 1964). La guía de usuario del programa SEDEC (OECD, 2010; Springer TA, 2009) describe como se utilizan los algoritmos para estimar los parámetros del modelo probit y la  $DL_{50}$ , mediante métodos de máxima verosimilitud (MLE). La estimación de los intervalos de confianza de la  $DL_{50}$ , se estimaron usando el teorema de Fieller (Finney, 1964).

## **2.3. RESULTADOS**

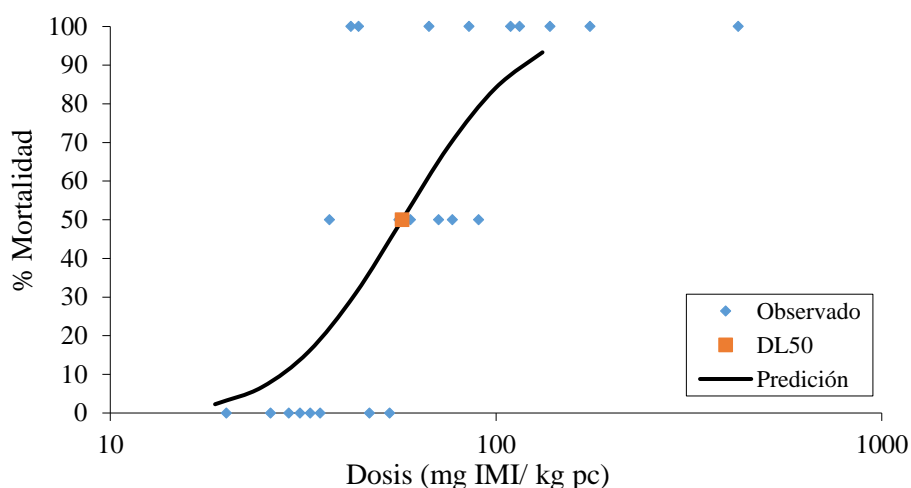
### **2.3.1. Toxicidad aguda y determinación de la $DL_{50}$**

La concentración de la solución de imidacloprid utilizada para estimar la  $DL_{50}$  fue de  $21,25 \pm 0,685$  mg/ mL ( $n=6$ ). LD y LQ del sistema analítico fueron respectivamente 0,5 y 1  $\mu\text{g/L}$ , y la curva estándar presentó una fuerte linealidad ( $r^2 = 0,9979$ ). Como los valores analíticos de IMI representaron el 84,98% del valor nominal de 25 mg/mL. Para el cálculo de las dosis experimentales y la  $DL_{50}$ , se utilizó el valor nominal de IMI de la solución madre ya que el valor real de IMI se encontró dentro del 80% del valor nominal (USEPA, 2012b).

El peso de los tordos (promedio  $\pm$  D.E.) utilizados en este experimento fue de  $40,2 \pm 2,683$  g. No se observaron diferencias iniciales en peso de las aves entre las etapas experimentales ( $F= 2.072$ ;  $df= 38$ ;  $p = 0.106$ , datos no ilustrados). Solo se observaron indicios de una leve regurgitación en dos individuos durante la etapa 2, a los que se les había tratado con 53,3 o 67,6 mg IMI/kg pc. Como la detección del regurgitado ocurrió dentro de la primera media hora desde la administración del imidacloprid, estas aves fueron retiradas del experimento y reemplazadas por otros dos individuos.

Los primeros signos de intoxicación se detectaron antes de los 30 minutos desde la dosificación con IMI, siendo los efectos típicos observados: pérdida del equilibrio, incapacidad para percharse, disminución de la actividad, plumas erizadas, ojos entrecerrados y temblores. La intensidad de los signos varió en según la dosis ingerida por los tordos. La dosis más baja a la que se detectaron efectos leves, como disminución de la actividad y plumas erizadas, fue a 20,6 mg IMI/kg pc (el diseño experimental solo

incluyo una dosis más baja de 8,48 mg/kg pc). A partir de los 29,7 mg IMI/kg pc la disminución de la actividad de los tordos fue mayor, se observaron quietos en la percha o en el piso con las plumas erizadas, los ojos entrecerrados y el cuello contraído, en muchos casos con el abdomen tocando el piso. Los tordos que recibieron dosis mayores a 35 mg IMI/kg pc, presentaron signos severos de intoxicación como temblores fuertes, caídas con imposibilidad de levantarse, ojos entrecerrados o cerrados, pico abierto, falta de movimiento y de reacción de escape; y postura no erguida con las alas y patas abiertas. La concentración más baja a la que hubo mortalidad fue a 37,7 mg IMI/kg pc. Todas las muertes ocurrieron dentro de las 24 horas desde la administración de IMI. Las aves que sobrevivieron al tratamiento se recuperaron rápidamente una vez que fueron provistas de agua y alimento, y a las 48 horas, ya no mostraban ningún signo de intoxicación, ni diferencias detectables en la conducta respecto al grupo control.



**Figura 2.3.** Curva dosis- respuesta del imidacloprid para el tordo músico (*Agelaiodes badius*) estimada a partir del programa de computación SEDEC.

Aunque el experimento podría haber concluido en la Etapa 3b, de acuerdo al protocolo 223 (OECD, 2016), se llevó a cabo una cuarta etapa para reducir la variabilidad de la DL<sub>50</sub> obtenida. En total, se testearon concentraciones entre 8,48 y 424 mg IMI/kg pc (Figura 3). Los valores calculados de DL<sub>50</sub> en cada etapa fueron muy similares entre sí: 59,99; 47,85 y 56,36; mg IMI/kg pc para las etapas 1, 2, y 3b (Tabla 2.2). La combinación de todos los resultados contribuyó a disminuir la variabilidad y acortar los intervalos de confianza (95% IC) para obtener una DL<sub>50</sub> final de 57,11 mg IMI/ kg pc

(95% IC: 40,94–86,38 mg IMI/kg pc); y una pendiente de la curva dosis respuesta de 4,12 (95% CI: 1,39–6,86).

**Tabla 2.2.** Etapas experimentales para el cálculo de la DL50 del IMI para el tordo músico (*Agelaiodes badius*). En cada etapa se reportan las dosis evaluadas, el número de individuos por dosis, el porcentaje de mortalidad, y las estimaciones de la DL<sub>50</sub> y la pendiente de la curva dosis- respuesta según corresponda.

	Dosis	N	% Mortalidad
<i>Control</i>	0	5	0
<i>Etapa 1</i>	8,48	1	0
	31,3	1	0
	115	1	100
	424	1	100
<b>DL<sub>50(1)</sub></b>	<b>59,99</b>		
<i>Etapa 2</i>	20,6	1	0
	26,1	1	0
	33,1	1	0
	42	1	100
	53,3	1	0
	67,6	1	100
	85,7	1	100
	109	1	100
	138	1	100
	175	1	100
<b>DL<sub>50(1+2)</sub></b>	<b>47,85</b>		
Pendiente <sub>1+2</sub>	8,26		
Intervalo de confianza pendiente	-0,82	17,39	
<i>Etapa 3b</i>	29,7	2	0
	37,7	2	50
	47,8	2	0
	60,7	2	50
	77,1	2	50
<b>DL<sub>50(1+2+3b)</sub></b>	<b>56,36</b>		
Intervalo de confianza DL <sub>50(1+2+3b)</sub>	39,4	91,87	
Pendiente <sub>1+2+3b</sub>	5,3		
Intervalo de confianza pendiente	1,5	9,1	
<i>Etapa 4</i>	35	2	0
	44,4	2	100
	56,4	2	50
	71,5	2	50
	90,8	2	50
<b>DL<sub>50(1+2+3b+4)</sub></b>	<b>57,11</b>		
Intervalo de confianza DL <sub>50(1+2+3b+4)</sub>	40,94	86,38	
Pendiente <sub>1+2+3b+4</sub>	4,12		
Intervalo de confianza pendiente	1,39	6,86	

### **2.3.2. Consumo diario de semillas**

El peso (promedio  $\pm$  D.E.) de los tordos músico empleados en este ensayo fue de  $39,38 \pm 3,024$  g. El CD de semillas de mijo pelado (promedio  $\pm$  E.E.) fue de  $4,895 \pm 0,0522$  g/día por tordo correspondiendo al 12,43% del peso corporal promedio, con un consumo máximo registrado de 8,05 g/día y mínimo de 2,22 g/día. El número de semillas de cultivo necesario para alcanzar el CD dependió del tamaño de las semillas consideradas, variando entre un máximo de 1633 semillas para la alfalfa y un mínimo de 14,8 para las semillas de maíz (Tabla 2.3).

### **2.3.3. Número de semillas**

La Tabla 2.3 demuestra que la ingesta diaria de cualquiera de las semillas de cultivo alcanzaría o superaría ampliamente la  $DL_{50}$ . Para las semillas de cultivos que registran mayor concentración de imidacloprid como el sorgo, maíz, girasol y alfalfa, una ingesta de semillas tratadas correspondiente a menos del 10% de la dieta diaria sería suficiente para alcanzar la  $DL_{50}$ . En semillas con menor concentración de IMI como la avena y el trigo, un consumo de semillas tratadas correspondiente al 31 y 54% respectivamente, sería necesario para alcanzar la  $DL_{50}$ . El consumo de menos de cinco semillas de sorgo o girasol es suficiente para alcanzar la concentración a la cual se observan los primeros síntomas de intoxicación nerviosa (20,6 mg IMI/kg pc), mientras que el consumo de menos de dos semillas de maíz es suficiente para alcanzar la mortalidad. La Tabla 4 muestra que, para todos los cultivos, excepto para la alfalfa, la cantidad letal de semillas se encontraría en un área de suelo menor a 60 m<sup>2</sup>.

Finalmente, el número de semillas tratadas con IMI que un tordo debe ingerir para alcanzar la  $DL_{50}$  (Tabla 2.3), se comparó con el número promedio de semillas ingeridas por un ave granívora pequeña en un evento de alimentación, de acuerdo a lo reportado por Prosser (2001). Este análisis muestra que el número de semillas de avena (42) y de sorgo (13) que un tordo debe ingerir para alcanzar la  $DL_{50}$  se encuentran dentro del rango de pequeñas semillas ingeridas en un evento de alimentación, mientras que el número de semillas de trigo necesarias para alcanzar la letalidad (91) se encuentra apenas por encima del rango de semillas ingeridas. Por otro lado, el número de semillas de maíz (1) y de girasol (10) requeridas para alcanzar la  $DL_{50}$  se encuentran dentro del rango de semillas grandes ingeridas en un evento de alimentación que varía entre 3 y 11 semillas. Sólo en el caso de la alfalfa y la soja, el número de semillas ingeridas en un evento de

alimentación es considerablemente menor que el número de semillas tratadas requeridas para alcanzar la DL<sub>50</sub> (174 semillas de alfalfa pequeñas y 34 semillas grandes de soja).

**Tabla 2.3.** Peso y número de semillas necesarias para alcanzar la DL<sub>50</sub> del tordo músico para distintos cultivos extensivos comunes en la región pampeana Argentina†.

	Avena	Trigo	Soja	Girasol	Maíz	Sorgo	Alfalfa
<i>Dosis de aplicación<sup>1</sup></i> (g IMI/100 kg sem.)	150	85	42	500	640	640	430
<i>Peso promedio de una semilla</i> (g)	0,04 <sup>2</sup>	0,03 <sup>3</sup>	0,16 <sup>4</sup>	0,05 <sup>5</sup>	0,33 <sup>6</sup>	0,03 <sup>7</sup>	0,003 <sup>8</sup>
<i>mg IMI por semilla</i>	0,05	0,02	0,07	0,24	2,11	0,17	0,013
<i>Nro. de semillas equivalentes al CD</i>	136,1	169,0	30,63	104,26	14,85	181,5	1633
<i>Nro. de semillas equivalentes a la DL<sub>50</sub></i>	41,67	91,28	33,48	9,57	1,07	13,02	174,42
<i>% dieta para alcanzar DL<sub>50</sub></i>	30,61	54,02	109,33	9,18	7,17	7,17	10,68
<i>TER</i>	3,07	5,4	10,9	0,92	0,72	0,72	1,07
<i>Refinamiento</i>	SI	SI	NO	SI	SI	SI	SI

†Las estimaciones están basadas en un ave de 39,38 g de peso corporal (pc), un consumo diario de 4,9g/día de semillas, y una DL<sub>50</sub> equivalente a 57,11 mg IMI/kg pc. <sup>1</sup>SENASA, 2020. <sup>2</sup>Moreyra *et al.*, 2014; <sup>3</sup>Ferreyra *et al.*, 2019; <sup>4</sup>Enrico *et al.*, 2019; <sup>5</sup>Cencig *et al.*, 2017; <sup>6</sup>Flores *et al.*, 2019; <sup>7</sup>Barbera and Benitez, 2016; <sup>8</sup>Mendez *et al.*, 2014.



**Tabla 2.4.** Número de semillas presentes en la superficie de un lote de cultivo luego de la siembra, número de semillas equivalentes a la DL<sub>50</sub> y número de semillas para manifestar los primeros signos de intoxicación en el tordo músico (*Agelaioides badius*).

Cultivo	Ubicación en el lote	Semillas/m <sup>2</sup>	Número de semillas para alcanzar DL <sub>50</sub> <sup>†</sup>	m <sup>2</sup> para alcanzar DL <sub>50</sub>	Número de semillas para alcanzar primeros signos <sup>†</sup>	m <sup>2</sup> para alcanzar primeros signos <sup>§</sup>	Referencia
<i>Alfalfa</i>	Promedio	1,03	174,2	179,4	50,39	48,92	De Snoo <i>et al.</i> , 2004
<i>Maiz</i>	Promedio	0,02		53,5			De Snoo <i>et al.</i> , 2004
<i>Maiz</i>	Centro	0,04	1,07	26,8	0,31	7,75	Roy <i>et al.</i> , 2019
	Borde	0,1		10,7			Roy <i>et al.</i> , 2019
<i>Soja</i>	Centro	0,6	33,48	55,8	9,76	16,27	Roy <i>et al.</i> , 2019
	Borde	1,5		22,42			Roy <i>et al.</i> , 2019
<i>Trigo</i>	Promedio primavera	1,66		55	26,37	15,90	De Snoo <i>et al.</i> , 2004
	Promedio otoño	19,84		4,6		1,33	De Snoo <i>et al.</i> .2004
	Promedio otoño	31,26	91,28	2,92		0,84	De Snoo <i>et al.</i> .2004
<i>Trigo</i>	Centro	11,3		8,1		2,33	Lopez-Antia <i>et al.</i> , 2016
<i>Trigo</i>	Borde	43,4		2,1		0,61	Lopez-Antia <i>et al.</i> , 2016
<i>Trigo</i>	Centro	7,8	91,28	11,7	26,37	3,38	Roy <i>et al.</i> , 2019
	Borde	8,4		10,9		3,14	Roy <i>et al.</i> , 2019
	Centro	0,9		101,4		29,3	Lennon <i>et al.</i> , 2020
	Borde	4,2		21,7		6,28	Lennon <i>et al.</i> , 2020

<sup>†</sup> Las estimaciones están basadas en un ave de 39,38 g de peso corporal (pc), un consumo diario de 4,9g/día de semillas, y una DL<sub>50</sub> equivalente a 57,11 mg IMI/kg pc.

<sup>§</sup> La dosis para manifestar los primeros signos de intoxicación fue de 20,6 mg IMI/kg pc.

#### **2.3.4. Mortalidad de tordos alimentados con semillas tratadas**

Las concentraciones de IMI determinadas analíticamente en las semillas (promedio  $\pm$  E.E.) fue de  $2,93 \pm 0,088$  g IMI/ kg sem. (n=2), correspondiendo al 97% del valor nominal (3g IMI/kg sem.). La recuperación promedio del proceso de extracción fue de  $81 \pm 6\%$ , basada en las concentraciones detectadas de IMI de los controles fortificados. La curva de calibración presentó una fuerte linealidad ( $r^2 = 0,9987$ ). Los límites de detección y cuantificación fueron de 1 y 4  $\mu$ g/kg, respectivamente. Como la concentración analítica del IMI en las semillas correspondió al 97% del valor nominal (3 g IMI/kg sem.), la concentración nominal fue utilizada en los cálculos.

En la Tabla 2.5 se resume para cada individuo los valores diarios de consumo de semillas, los mg de IMI/kg pc ingerido y porcentaje de la  $DL_{50}$  a la que esta ingesta corresponde. Antes de la exposición a las semillas tratadas, los tordos consumieron (promedio  $\pm$  D.E.)  $4,53 \pm 1,63$  g de semillas de mijo pelado, que representó el  $92,5 \pm 33,2\%$  (promedio  $\pm$  D.E.) del CD estimado en la Sección 2.3.2 (datos no ilustrados). Una vez que comenzó el tratamiento, los tordos disminuyeron drásticamente el consumo de semillas diario, correspondiendo respectivamente al 26,1, 11,2 y 10% del CD para los individuos 1, 2 y 3. El consumo total de los tres individuos a lo largo del periodo que duró el experimento, correspondió al 53%, 17% y 19% del CD, respectivamente.

Los individuos 1 y 2 murieron luego de tres días de tratamiento, mientras que el individuo 3 murió luego de 5 días de tratamiento. Los tres individuos presentaron signos de intoxicación como plumas erizadas y falta de movimiento a partir del segundo día de tratamiento. La dosis total de IMI ingerida fue mayor a la  $DL_{50}$  en los tres casos, correspondiendo a 373%, 123% y 112% de la  $DL_{50}$  para los individuos 1, 2 y 3 respectivamente. Es importante destacar, que sólo el individuo 1 ingirió diariamente dosis de IMI que representaron mas del 100% de la  $DL_{50}$ , los otros dos individuos nunca consumieron mas del 85 y 59% de la  $DL_{50}$  en un día.

**Tabla 2.5.** Consumo diario y dosis ingerida de IMI por individuos de tordo músico (*Agelaioides badius*) alimentados con semillas de mijo pelado tratadas con 3g de IMI/ kg de sem.

	Individuo 1 (36,5 g)			Individuo 2 (34,5 g)			Individuo 3 (43 g)		
	Consumo (g)	IMI*	% DL <sub>50</sub>	Consumo (g)	IMI*	% DL <sub>50</sub>	Consumo (g)	IMI*	% DL <sub>50</sub>
Día 1	1,06	3,18	152,52	0,18	0,54	27,41	0,08	0,24	9,77
Día 2	1,3	3,9	187,05	0,56	1,68	85,28	0,03	0,09	3,66
Día 3	0,23	0,69	33,09	0,07	0,21	10,66	0,08	0,24	9,77
Día 4	-	-	-	-	-	-	0,24	0,72	29,32
Día 5	-	-	-	-	-	-	0,49	1,47	59,85
<b>Total</b>	<b>2,59</b>	<b>7,77</b>	<b>372,7</b>	<b>0,81</b>	<b>2,43</b>	<b>123,4</b>	<b>0,92</b>	<b>2,76</b>	<b>112,4</b>

\*mg IMI/kg pc

### 2.3.5. Evaluación de riesgo

La Tabla 2.3 también ilustra que en el Nivel 1 de la evaluación de riesgo realizada, el índice TER fue menor al valor crítico 10 para todos los cultivos excepto para soja, indicando que debería llevarse a cabo una evaluación de riesgo refinada. En el caso de la soja, aunque el TER fue mayor a 10, el valor obtenido fue de 10,9, muy cercano al valor límite. El Nivel 1 de la evaluación de riesgo realizada en este estudio indica que los tordos estarían en riesgo de experimentar toxicidad aguda y muerte cuando se encuentran en el peor escenario: en el que el 100% del alimento consumido consiste en semillas tratadas con IMI. Es importante mencionar que, aunque algunos granos (i.e. soja) pueden no ser ingeridos específicamente por el tordo músico, fueron incluidos en los análisis para que los resultados sean aplicables a la mayoría de las aves que habitan los agroecosistemas, y no sólo al tordo músico. Cuando el TER obtenido, a partir del Nivel 1 de la evaluación de riesgo, es menor al valor crítico como ocurrió en este análisis, la EFSA recomienda refinar la evaluación. El protocolo de la EFSA recomienda diversas opciones de refinamiento, para llevar a cabo una nueva evaluación de riesgo basada en el procedimiento del “peso de la evidencia” (*weight-of-evidence risk assessment*) (EFSA, 2009). Los elementos considerados en la evaluación basada en el peso de la evidencia son descritos en la Tabla 6 y comentados en la discusión.

**Tabla 2.6.** Líneas de evidencia consideradas durante la evaluación de riesgo basada en el peso de la evidencia.

Línea de evidencia	Resultados	Implicancias de la evaluación de riesgo	Certezas- Incertidumbres
<i>Nivel 1 de la evaluación basada en la DL<sub>50</sub>, el CD y el pc*</i>	Todos los cultivos superan el valor crítico excepto la soja que se encuentra muy cercano al límite.	-Riesgo de mortalidad asociado a todos los cultivos excepto soja.	Peor escenario en el que el 100% del alimento contiene IMI. El riesgo debería reducirse en una dieta mixta.
<i>Proporción del CD de los tordos que debe ser consumida como semillas tratadas para alcanzar la mortalidad<sup>#</sup></i>	Solo el 7-10% del CD como semillas tratadas es suficiente para inducir la mortalidad del tordo para semillas de girasol, maíz, sorgo y alfalfa. 30 y 54% son necesarios para avena y trigo. 109% para soja.	-Alto riesgo de mortalidad con maíz, sorgo y alfalfa. -Riesgo moderado con avena y trigo. -Riesgo bajo para soja	-Este refinamiento muestra que la dieta mixta no es suficiente para eliminar el riesgo en caso del maíz, sorgo y alfalfa. - Pelar las semillas podría reducir el riesgo en el caso del girasol. -Buen nivel de Certeza debido a que está basado en valores experimentales.
<i>Número de semillas tratadas para alcanzar la DL<sub>50</sub> vs. Número típico de semillas ingeridas en un evento de alimentación (picoteo).<sup>†</sup></i>	El número de semillas necesario para alcanzar la DL <sub>50</sub> está dentro, o cercano, al rango de número de semillas pequeñas ingerida en un picoteo (avena, trigo, sorgo). Lo mismo sucede con las semillas grandes como maíz y girasol. El número de semillas de alfalfa y soja ingeridas en un picoteo son menores que el número de semillas necesarias para alcanzar la DL <sub>50</sub> .	- Existe riesgo de mortalidad asociado a varios cultivos, excepto alfalfa y soja.	- Este refinamiento demuestra que la DL <sub>50</sub> puede ser alcanzada en un solo evento de alimentación para todos los cultivos excepto para la alfalfa y la soja. -Pelar las semillas podría reducir los riesgos asociados a las semillas de girasol. - Incertidumbre: basado en datos genéricos.
<i>Número de semillas presentes en un área de cultivo menor a 100 m<sup>2</sup> vs. el número de semillas necesarias para alcanzar la DL<sub>50</sub><sup>§</sup></i>	Con excepción de la alfalfa, el número de semillas presentes en 100 m <sup>2</sup> excede el número de semillas necesario para alcanzar la DL <sub>50</sub> .	- Riesgo de mortalidad asociado a todos los cultivos excepto a alfalfa.	-Este refinamiento muestra que en un área pequeña se encontrarían las semillas suficientes para alcanzar la DL <sub>50</sub> -Incertidumbre: la densidad de semillas está basada en la literatura de otros países. La densidad de semillas podría ser variable.
<i>Datos históricos sobre eventos de envenenamiento.</i>	Al menos tres estudios reportaron eventos de envenenamiento en el ambiente.	-Resalta el riesgo de mortalidad.	-Nivel razonable de certeza debido a que los eventos de envenenamiento son difíciles de identificar debido a que las carcasas pueden ser comidas rápidamente, pueden no ser conspicuas o no localizadas. Implica que es probable que ocurran más casos.
<i>Muerte de todos los tordos alimentados con semillas tratadas con una concentración promedio (3g IMI/kg sem.)<sup>¶</sup></i>	Los tres tordos tratados murieron dentro de los 5 días luego de comer diariamente un número de semillas máximo que varió entre 10 y 26% del consumo CD.	-Riesgo de mortalidad de los tratamientos de semillas con concentraciones aprobadas según las regulaciones vigentes.	-Alto nivel de certeza porque, aunque las aves no tuvieron un alimento alternativo, el número de semillas requeridas para causar la muerte correspondió a un pequeño porcentaje del CD.

\*Basado en los resultados presentados en la Tabla 4. <sup>#</sup>Basado en los resultados presentados en la Tabla 2. <sup>†</sup>Basado en los datos de Prosser (2001) y Tabla 2. <sup>§</sup>Basado en los resultados presentados en la Tabla 3. <sup>¶</sup>Basado en los resultados presentados en la Tabla 5.

## 2.4. DISCUSIÓN

La DL<sub>50</sub> obtenida con un formulado de imidacloprid calculada para el tordo músico (57,11 mg IMI/kg pc) se encontró dentro del rango de los valores reportados tanto con el ingrediente activo como con los formulados comerciales. En general, los valores reportados varían entre 13,9 mg IMI/kg pc para la perdiz gris, y 283 IMI mg/kg pc para el ánade real (Tabla 2.1). Hasta el momento, los valores de toxicidad aguda reportados son equivalentes, independientemente de si se obtuvieron utilizando un formulado comercial o el ingrediente activo solo. Esta observación pareciera señalar que el ingrediente activo IMI es el componente responsable de la toxicidad de los formulados. Dado que los IC de la DL<sub>50</sub> varían entre 40,49 y 86,38 mg IMI/kg pc, el IMI debería ser considerado de clase I o “altamente tóxico” para el tordo músico, de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2009) que coloca en esa clasificación las DL<sub>50</sub> que varían entre 5 y 50 mg/kg pc. De hecho, si se consideran los IC de los valores reportados de las DL<sub>50</sub> de las especies de aves testeadas, el 75% (9 de 12) deberían ser clasificados como de clase I (Tabla 2.1).

Los efectos agudos observados en los tordos músico fueron consistentes con efectos tóxicos asociados al sistema nervioso. La pronta aparición de los signos implica una rápida absorción del imidacloprid por el tracto intestinal y su distribución al sistema nervioso (Tomizawa and Casida, 2005; Bean *et al.*, 2019). La unión del imidacloprid a los receptores nicotínicos del sistema nervioso provoca una hiper-exitación de las neuronas que se traduce en movimientos descoordinados, pérdida de equilibrio, locomoción reducida, temblores, parálisis, convulsiones y muerte (Tomizawa *et al.*, 1999; Tomizawa y Casida, 2005). La severidad de los signos observados fue dependiente de la dosis, de acuerdo a lo reportado en otras especies: perdiz común (*Coturnix coturnix*) (Rawi *et al.*, 2019); paloma común (*Columba livia*) (Abu Zeid *et al.*, 2019), torcaza común (*Zenaida auriculata*) (Addy-Orduna *et al.*, 2019), tordo sargento (*Agelaius phoeniceus*) y tordo cabeza café (*Molothrus ater*) (Avery *et al.*, 1993). Si bien la mortalidad ocurrió a partir de 37,7 mg IMI /kg pc, los primeros signos de intoxicación se manifestaron a partir de 20,6 mg IMI/kg pc, dosis correspondiente al 36% de la DL<sub>50</sub>. En las aves silvestres, los efectos subletales sobre la conducta como la falta de movilidad, reacción, o pérdida de equilibrio, podrían llevar a la mortalidad indirecta de los individuos al impedir la búsqueda de un refugio o escapar de un predador (Millot *et al.*, 2017). La aparición de efectos de intoxicación a bajas concentraciones de IMI, resalta la necesidad

de estudiar en mayor detalle las dosis a partir de las cuales comienzan los efectos subletales y cuáles son sus consecuencias para las aves silvestres. En el ambiente, el riesgo de exposición al IMI de las aves que habitan los agroecosistemas es aún mayor si se considera que la siembra de los cultivos de verano, que registran mayores concentraciones de IMI, se corresponde con el inicio de la temporada reproductiva para las aves. Durante ese período los cambios fisiológicos asociados al desarrollo de los caracteres sexuales secundarios implican un requerimiento energético mayor y en consecuencia un incremento en la ingesta de alimento, aumentando la probabilidad de alcanzar la letalidad al consumir semillas tratadas (Naguib y Nemitz, 2007; Krause y Naguib, 2014; Werner *et al.*, 2018; Mishra *et al.*, 2020).

Esta reportado que las aves paseriformes tienen un CD que equivale aproximadamente al 30% de su peso corporal, debido a sus requerimientos energéticos (Crocker *et al.*, 2002). Sin embargo, en el tordo músico el CD fue menor, equivalente al 12,5% del peso corporal. Es probable que la diferencia en la cantidad de semillas consumidas se deba a las condiciones de cautiverio: la temperatura templada constante, y la comida *ad libitum*, disminuyen el gasto energético de buscar comida y regular la temperatura, en comparación con un ave silvestre. Estas observaciones se corresponden con los resultados obtenidos en un estudio realizado con la tarabilla (*Saxicola torquata*), en la que se evaluó el consumo de alimento a largo plazo, a dos temperaturas ambientales distintas: 5 y 22°C (Goymann, *et al.*, 2006). De acuerdo con lo esperado, se observó que las tarabillas mantenidas a una temperatura más baja ingerían hasta el doble de alimento, para compensar el gasto metabólico de mantener la temperatura corporal.

Conocer el CD aporta información valiosa para las evaluaciones de riesgo, ya que permite estimar la toxicidad a la que se puede encontrar expuesta un ave que se alimenta de semillas tratadas (EFSA, 2009). Por ejemplo, considerando las concentraciones de IMI recomendadas para las semillas de los cultivos de verano: maíz, girasol y sorgo; los tordos músicos alcanzarían la letalidad comiendo una cantidad de semillas tratadas correspondiente a menos del 10% de sus requerimientos diarios. En comparación, Addy-Orduna, *et al.* (2019) reporta que la torcaza común, alcanzaría la letalidad consumiendo 1,7g de semillas de sorgo tratadas que equivalen al 26,5% de su dieta diaria. Los resultados obtenidos son comparables con el estudio de Millot *et al.* (2017) que estima cuántas semillas tratadas deberían consumir las aves para alcanzar la mortandad, y concluye que la cantidad de semillas de trigo que quedan disponibles en los

campos luego de la siembra son suficientes para alcanzar la letalidad. Con un tratamiento de 0,7 g IMI/ kg de semillas una perdiz gris alcanzaría la letalidad consumiendo en promedio 8 g de trigo (154 semillas), la paloma común lo haría consumiendo 10,71 g de semillas (214 semillas); mientras que el tordo músico solo necesita 3,21 g (64,2 semillas). Los resultados obtenidos en este trabajo están en línea con estudios previos que alertan sobre el riesgo real que implica el tratamiento de semillas con IMI para las aves (Pisa *et al.*, 2014; Lopez-Antia *et al.*, 2016; Eng *et al.*, 2019). Debido a su menor tamaño, los requerimientos energéticos de las aves paseriformes son mayores, y por ello tienen una demanda de alimento mayor (Nagy, 2005). Esto se traduce en que las aves paseriformes deben consumir una menor proporción de su dieta diaria de semillas tratadas para alcanzar la letalidad, respecto a otras especies de mayor tamaño. Por este motivo, el riesgo de letalidad por consumo de semillas tratadas con IMI es aún mayor para las aves pequeñas (<100g), como ya lo expresó previamente Mineau (Mineau *et al.*, 1996; Mineau y Palmer, 2013).

En la sección anterior, se estimó que el consumo de menos un gramo de semillas tratadas (menos del 10% de la dieta diaria) sería suficiente para que un tordo músico alcanzara la mortalidad. Para evaluar la cantidad real de semillas tratadas necesarias y comparar los efectos de la ingesta de IMI a través del alimento versus su administración oral, se expuso a tres tordos músico a semillas tratadas con IMI siguiendo las recomendaciones de uso vigentes (3g IMI/ kg sem.) (SENASA, 2020). Todos los tordos murieron entre los tres y cinco días, aportando evidencia sólida sobre la letalidad de las semillas tratadas con IMI para las aves paseriformes. Como los resultados obtenidos fueron claros (i.e. las tres aves murieron), no se trataron más tordos para minimizar el número de aves sacrificadas y extraídas del ambiente. Interesantemente, en todos los casos, el consumo de semillas tratadas fue menor al CD estimado con semillas sin tratar. La aversión a las semillas tratadas puede haber influido en los resultados obtenidos, como ya ha sido reportada en otras especies de aves (Avery *et al.*, 1994; Lopez-Antia *et al.*, 2013). Sin embargo, es posible que los efectos negativos, sobre la salud y la movilidad, observados luego de la ingesta de las semillas tratadas estén involucrados en la falta del apetito. De hecho, tanto Avery *et al.* (1994) como Lopez-Antia *et al.* (2013) reportaron que la aversión ocurría en función del estrés posterior a la ingesta de semillas tratadas, i.e. sólo luego de que las aves sienten malestar, disminuye la probabilidad de que se alimenten. De manera similar, Eng *et al.* (2019) reportó la falta de apetito por comida sin

tratar luego de la administración de una dosis de IMI por vía oral. En este estudio, la falta de opción por otro alimento excepto por las semillas tratadas, simula el peor escenario que podía ocurrir en el ambiente, por ejemplo, cuando las aves se alimentan en la pila de semillas tratadas derramadas pueden consumir la cantidad de semillas necesarias para alcanzar la mortalidad en un solo picoteo. Como la evitación de las semillas es una respuesta aprendida, la aversión no asegura que las aves dejen de alimentarse de las semillas tratadas y que puedan ingerir cantidades letales antes de desarrollar la aversión y el reconocimiento de las semillas tratadas (Avery *et al.*, 1994; Lopez-Antia *et al.*, 2013; Millot *et al.*, 2017; Botha *et al.*, 2018).

El experimento de alimentación con semillas tratadas también mostró como difiere la ingesta de IMI según sea a través de las semillas tratadas u oral, vía sonda. Los efectos comportamentales, y neurológicos entre otros, podrían limitar la dosis ingerida a través del alimento, mientras que, por vía oral, la dosis es forzada a un momento específico. El proceso de eliminación asociado a los dos modos de ingestión también fue diferente, en la administración oral la dosis fue alta y única, mientras que a través del alimento la dosis fue continua. De hecho, el tiempo de ingesta del IMI y del proceso de intoxicación fue diferente entre los tres animales alimentados con semillas tratadas, y con las aves a las que se administró IMI de forma oral. Finalmente, aunque las aves a las que se les administró IMI a través del alimento ingirieron dosis diarias menores a la  $DL_{50}$ , la dosis total ingerida fue mayor a la  $DL_{50}$ . A pesar de las diferencias individuales, el resultado de alimentar a las aves con semillas tratadas con 3 mg IMI/ kg sem. durante múltiples días sin otro alimento fue el mismo, la muerte de los individuos.

## **2.5. EVALUACIÓN DE RIESGO BASADA EN EL PESO DE LA EVIDENCIA**

El Nivel 1 de la evaluación de riesgo realizada indicó que el tordo músico se encontraría en riesgo de experimentar toxicidad aguda y mortalidad cuando se encuentra en el peor escenario posible, en el que el 100% del alimento consumido consiste en semillas tratadas con IMI. Para ponderar la significancia de estos resultados, se necesita definir si es posible que en el ambiente ocurra este “peor escenario”. Para evaluar esta posibilidad existen dos líneas de evidencia disponibles. Primero, el hecho de que la cantidad de semillas necesarias para alcanzar la letalidad de encuentren en una superficie pequeña de los lotes de cultivo (<60m<sup>2</sup>) indica que el peor escenario es plausible. Segundo, el hecho de que el número de semillas tratadas con IMI que un tordo músico



necesita para alcanzar la  $DL_{50}$  se encuentra dentro del rango del número de semillas ingeridas en un picoteo o evento de alimentación, refuerza la postura de que el peor escenario es una posibilidad real.

Cuando el TER obtenido, de la evaluación de riesgo del Nivel 1, es menor al valor crítico como ocurrió en este análisis, la EFSA recomienda refinar la evaluación y realizar una nueva evaluación de riesgo basada en el procedimiento del peso de la evidencia (EFSA, 2009) (Tabla 2.5). Una forma de refinamiento propuesta es emplear en CD y el peso corporal de una especie focal, en lugar de utilizar datos genéricos (EFSA, 2009). En este estudio ese refinamiento fue contemplado al utilizar datos generados con el tordo músico, con lo cual el Nivel 1 de la evaluación de riesgo realizada puede ser considerada refinada desde el inicio.

Otra forma importante de refinar la evaluación es evaluando y considerando la proporción de semillas tratadas que un ave silvestre puede llegar a ingerir como parte total de su dieta diaria. Aunque se haya demostrado que la ocurrencia del peor escenario es una posibilidad real, también es posible que un ave silvestre tenga una dieta mixta donde las semillas tratadas solo representen una proporción del total de alimento ingerido. Desde este punto de vista, considerar la proporción del CD que un tordo músico debe ingerir como semillas tratadas para alcanzar la mortalidad, constituye un refinamiento válido de la evaluación de riesgo. Como se describió anteriormente, el consumo de solo el 7-10% del CD del tordo músico como semillas tratadas, es suficiente para alcanzar la  $DL_{50}$  para el sorgo, el maíz y el girasol; mientras que el consumo del 31 y 54% del CD serían necesarios para alcanzar la  $DL_{50}$  en el caso de la avena y el trigo respectivamente. De hecho, la proporción de la dieta que debe ser constituida por semillas tratadas con IMI para causar la muerte podría ser menor, si se tiene en cuenta que las proporciones utilizadas están basadas en las tasas de consumo determinadas en el laboratorio, que probablemente sean menores que las esperadas en el ambiente (ver más arriba). Principalmente estos datos indican que, incluso en un escenario en el que las aves tienen una dieta mixta, existe para las aves, riesgo de toxicidad aguda y mortalidad causada por el IMI.

Algunos elementos que podrían reducir la dosis ingerida de IMI, y por lo tanto el riesgo son: pelar la semilla, y el hecho de que algunas semillas sean muy grandes para ser manipuladas por pequeñas aves granívoras. Si bien pelar las semillas podría reducir el riesgo para algunos tipos de semillas, involucra el contacto entre el plaguicida y el ave,

y en consecuencia alguna absorción de IMI. Más aun, no todas las semillas son peladas, y las aves las tragan directamente, principalmente cuando se trata de semillas pequeñas (Prosser *et al.*, 2006). Alternativamente, aunque semillas mas grandes como el maíz o la soja podrían presentar dificultad para ser manipuladas por aves pequeñas, es necesario considerar que algunas especies o parten las semillas y se comen los fragmentos, o comen los fragmentos partidos por otras especies de aves (Prosser *et al.*, 2006).

A los aspectos expuestos anteriormente se le suman dos líneas de evidencia adicionales que señalan el riesgo del tratamiento de semillas con IMI para las aves silvestres y deben ser consideradas en la evaluación de riesgo final: 1) tres estudios diferentes reportaron previamente eventos de mortandad de aves silvestres, aun considerando que los incidentes de envenenamiento son difíciles de identificar porque las carcasas no son conspicuas, no son localizadas, o son rápidamente consumidas por otro animal (Berny *et al.*, 1999; Millot *et al.*, 2017; Botha *et al.*, 2018); y 2) este estudio demostró que todos los tordos músicos alimentados con semillas tratadas con una concentración promedio (3 g IMI/kg sem.) murieron entre los 3 y 5 días. Todas las líneas de evidencia consideradas en este análisis son consistentes con la postura de que el riesgo de mortalidad es posible en varios escenarios. El peso de la evidencia reunida en este estudio indica que los tratamientos de semillas con IMI, aprobados según las regulaciones vigentes, poseen un riesgo de toxicidad aguda y muerte para el tordo músico, y probablemente para otras aves paseriformes que habitan los agroecosistemas.

En base a los resultados obtenidos con el tordo músico en este estudio, es plausible que otras especies paseriformes pequeñas tengan acceso ocasional a semillas tratadas con IMI e ingieran cantidades letales, especialmente cuando ocurren derrames de semillas durante la época de siembra. Esta conclusión es consistente con otros estudios en los que se concluyó que la cantidad de semillas que quedan disponibles en los campos de cultivos luego de la siembra son suficientes para causar la mortalidad de varias especies de aves (de Snoo and Luttik, 2004; Lopez-Antia *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2019; Lennon *et al.*, 2020). Por otro lado, la evaluación de riesgo realizada en este estudio podría ser más precisa y predictiva si se hubieran generado datos específicos respecto a la frecuencia y tamaño de los derrames de semillas, y de la ingesta de semillas tratadas por las aves locales, o si existieran relevamientos de eventos de mortalidad en la región. El desarrollo líneas de investigación considerando cualquiera de las líneas mencionadas proveerían datos valiosos para refinar la evaluación de riesgo.

En Argentina, la Región pampeana es habitada por al menos 300 especies de aves (Brown *et al.*, 2006), de las cuales casi 60 son especies passeriformes que habitan comúnmente los agroecosistemas (Giacomo and Casenave, 2010; Goijman *et al.*, 2015; Frutos *et al.*, 2016). En la zona núcleo, el clima templado y los suelos de la Región Pampeana de la Argentina permiten la siembra de al menos dos cultivos diferentes cada año (MAGyP, 2020), lo que implica que las aves pampeanas podrían enfrentar el riesgo de mortalidad dos veces al año. Adicionalmente, como se mencionó anteriormente, debe ser considerado que junto con las muertes causadas por la toxicidad aguda del IMI, las aves silvestres también se encontrarían en peligro debido a los efectos subletales. La reducción en la capacidad de buscar un refugio, o de escapar de un predador, están relacionados a la alteración del sistema nervioso que ocurre a dosis subletales (Millot *et al.*, 2017). Por otro lado, una condición corporal empobrecida, debida a la anorexia causada por el IMI, también podría afectar la supervivencia de las aves en condiciones ambientales extremas, o retrasando la migración como fue reportado por Eng *et al.* (2019). Los riesgos que podrían afectar la supervivencia de las aves ocurrirían luego de un consumo menor (i.e. no letal) de semillas tratadas con IMI. El consumo de menos de cinco semillas de sorgo y girasol (equivalentes al 4,8 y 5.8% del CD, respectivamente) serían necesarios para que las aves alcancen la dosis a la que se manifiestan los primeros signos de intoxicación (20,6 mg IMI/kg pc). Además es importante mencionar que los predadores de las pequeñas aves también podrían verse afectados considerando que se detectó IMI en la sangre de pichones de búho real (Taliensky-Chamudis *et al.*, 2017).

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el tratamiento de semillas vigente puede poseer un riesgo para la supervivencia del tordo músico en el ambiente, y que otras aves passeriformes también podrían verse afectadas. Los resultados obtenidos en este estudio sobre el tordo músico refuerza las conclusiones de estudios previos, que también advierten sobre los riesgos que puede implicar para las aves el tratamiento de semillas con IMI ( Mineau and Palmer, 2013; Lopez-Antia *et al.*, 2016; Addy-Orduna *et al.*, 2019; Eng *et al.*, 2019), y que la cantidad de semillas que quedan disponibles en los campos de cultivo luego de la siembra son suficientes para causar la mortalidad de las aves (de Snoo and Luttik, 2004; Millot *et al.*, 2017; Roy *et al.*, 2019; Lennon *et al.*, 2020). En conjunto, el peso de la evidencia acumulada hasta el momento respecto a los posibles impactos sobre las aves resalta la necesidad urgente de

reconsiderar la practica del tratamiento de semillas con IMI aprobadas en la Región Pampeana de Argentina y otros países donde permanece vigente.

### **3. CAPÍTULO 2. Exposición subletal aguda de tordos músicos (*Agelaioides badius*) al imidacloprid: distribución en el organismo y evolución en el tiempo de los efectos biológicos**

#### **3.1. INTRODUCCION**

En las últimas décadas, el declive de las poblaciones de aves que habitan en los agroecosistemas ha sido atribuido a la intensificación agrícola (Donald *et al.*, 2001; Donald *et al.*, 2006; Boatman *et al.*, 2007). Aspectos como la pérdida del hábitat, y el incremento en el uso de plaguicidas han sido identificados como factores causantes del declive de las poblaciones de aves (Boatman *et al.*, 2004; Newton, 2004; Burns *et al.*, 2016). De hecho, según el reporte “Living Planet” (WWF, 2018) la actividad agrícola es responsable del hecho de que 1091 especies de aves se encuentren en estado amenazado, correspondiendo al 74% del total de las especies amenazadas. En Europa se demostró que, de los componentes analizados, el uso de plaguicidas y fungicidas era el factor que más afectaba a la aves, insectos y plantas (Geiger *et al.*, 2010; Hallmann *et al.*, 2014). Mientras que en América del Norte se reportó, en un estudio reciente, una tendencia similar donde el uso de plaguicidas fue el factor más reportado como causa del declive de las poblaciones de aves, seguido de la pérdida y alteraciones del hábitat (Stanton *et al.*, 2018).

En la actualidad, los neonicotinoides son uno de los grupos de plaguicidas más utilizados globalmente. Los neonicotinoides son insecticidas sistémicos que, desde su aparición en la década de los 90, se han convertido en la clase más vendida de insecticidas, los tres compuestos principales siendo el imidacloprid, el tiametoxam y la clotianidina (Bass *et al.*, 2015). Los neonicotinoides se aplican en los principales cultivos extensivos como en soja, trigo, arroz, maíz, sorgo, y algodón, así como en hortalizas y frutales e (Jeschke *et al.*, 2011). El principal uso de los neonicotinoides es como curasemillas: su alta solubilidad en agua permite que el ingrediente activo se trasloque rápidamente por los fluidos de las plantas hacia los tejidos, proveyéndole protección en contra de los insectos chupadores (Elbert *et al.*, 2008; Simon-Delso *et al.*, 2015). Los neonicotinoides actúan a través de su unión a los receptores nicotínicos post-sinápticos del sistema nervioso central, lo que causa la parálisis y muerte de los insectos blanco. Los neonicotinoides son altamente selectivos, y pueden ser hasta 450 veces más tóxicos para

los insectos que para los vertebrados (Tomizawa y Casida, 2005; Jeschke y Nauen, 2008). La diferencia de toxicidad entre insectos y mamíferos se debe a los tipos de subunidades que componen los receptores post-sinápticos de cada grupo animal y a su ubicación en el sistema nervioso (Yamamoto y Casida, 1999; Tomizawa y Casida, 2005).

A pesar de la diferencia de afinidad de los receptores nicotínicos entre insectos y vertebrados, se han demostrado efectos adversos de los neonicotinoides sobre los vertebrados, especialmente las aves (Mineau y Palmer, 2013; Gibbons *et al.*, 2015; Wood y Goulson, 2017). En el ambiente, las aves se encuentran expuestas a los neonicotinoides principalmente a través del consumo de semillas tratadas que quedan disponibles en los lotes de cultivo, ya sea porque no quedan bien enterradas, o debido a derrames al momento de la siembra (de Snoo y Luttik, 2004; Balfour *et al.*, 2016; Lopez-Antia *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2019; Lennon *et al.*, 2020). De hecho, se han reportado casos de mortandad de aves silvestres por intoxicación con neonicotinoides al consumir semillas tratadas (Berny *et al.*, 1999; Millot *et al.*, 2017; Botha *et al.*, 2018), y hasta inmediatamente luego de aplicaciones foliares (Rogers *et al.*, 2019).

Se ha demostrado en algunas especies de aves y roedores de laboratorio, que una vez que ingresa al organismo, el IMI es rápidamente absorbido por el tracto intestinal donde pasa a la sangre, y es distribuido y eliminado dentro de las 48 horas desde su administración (Banasiak, 2000; Solecki, 2001; Kapoor *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2017; Bean *et al.*, 2019). El IMI es distribuido a todo el organismo, y en las aves, los principales órganos en los que se detectó fueron el hígado, el riñón, el cerebro y el músculo (Bean *et al.*, 2019; Roy *et al.*, 2020). La distribución del IMI en el organismo provee información valiosa ya que permite relacionar la disponibilidad del IMI en los tejidos blanco con sus efectos biológicos. Hasta el momento, existe poca información sobre los efectos tóxicos que tiene el IMI sobre los tejidos blanco de las aves luego de una ingesta subaguda. Rawi *et al.* (2019), reportaron alteraciones en la cantidad de neurotransmisores del cerebro y en las acetilcolinesterasas plasmáticas dentro de las 96 horas de una exposición a IMI equivalente al 25% de la DL50 en la codorniz japonesa. Por otro lado, Bean *et al.* (2019), luego de administrar el 9% de la DL50, también a codornices japonesas, no detectaron efectos significativos dentro de las primeras 24 horas con respecto al daño oxidativo al ADN, los niveles de hormonas tiroideas y corticosterona, y la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los xenobióticos; justificando la falta de respuesta debida a la alta tasa de eliminación del IMI.

En el Capítulo 1 de esta tesis se demostró que existe un alto riesgo de que las aves passeriformes que habitan las zonas cultivadas de la región Pampeana Argentina, puedan ingerir dosis letales y subletales de IMI a través del consumo de semillas tratadas. Un mejor entendimiento de los efectos subletales del IMI en las aves passeriformes inmediatamente luego de su ingesta, es de vital importancia ya que permitiría la identificación de signos y biomarcadores necesarios para la detección temprana de casos de intoxicación en el campo. Los biomarcadores son cambios fisiológicos o bioquímicos en los individuos que indican la presencia de contaminantes, y son utilizados como alerta temprana ya que suelen ser detectables antes de que se observen efectos a mayores niveles de organización (Newman, 2015). En este contexto, los objetivos del presente trabajo consistieron en 1) evaluar la distribución del IMI en el tiempo en distintos tejidos del tordo músico (*Agelaioides badius*) luego de una ingesta subaguda 2) caracterizar los efectos biológicos inducido mediante la determinación de una serie de parámetros hematológicos, genéticos, y bioquímicos a distintos tiempos desde la administración del IMI 3) identificar potenciales biomarcadores para el reconocimiento de la exposición de las aves al IMI entre los parámetros evaluados.

## **3.2. METODOLOGÍA**

### **3.2.1. Sustancia testada y preparación de la solución**

Se utilizó el producto comercial Confidor® 35SC (Bayer) que contiene 35% de imidacloprid (N-[1-[(6-Chloro-3-pyridyl)methyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl]nitramida, CAS. Nro. 13826-41-3) suspendido en una mezcla patentada de surfactantes, emulsionantes y aditivos de composición reservada. El mismo día del experimento se preparó una solución de IMI al 25% diluyendo con agua el producto comercial. Seis alícuotas de 1mL de la solución madre fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis químico para comprobar la concentración nominal.

### **3.2.2. Diseño experimental**

La metodología utilizada para la captura de las aves y su mantenimiento en el laboratorio se describen en detalles en el Capítulo 1 de esta tesis. Para evaluar los efectos subletales del IMI, 22 tordos músico fueron dosificados una única vez con 35 mg IMI/kg.

Esta dosis corresponde al 61% de la DL50, y es inferior a la mayor dosis sin causar mortalidad que fue observada durante los ensayos realizados para definir la dosis letal media (57,11 mg IMI/kg) en el Capítulo 1. Un grupo control de 8 individuos recibió agua al mismo tiempo que los individuos tratados. El día previo al inicio del experimento, se retiró el alimento de las jaulas a última hora del día. Inmediatamente antes de ser dosificado, cada tordo fue colocado en una bolsa de algodón y pesado con una exactitud de  $\pm 1$ g por medio de una balanza de resorte (Pesola®). El volumen de la solución necesario para alcanzar la dosis de IMI fue calculado en base al peso exacto de cada ave, y diluido en agua hasta un volumen final de 500  $\mu$ L de manera de que todos los individuos recibieran el mismo volumen de líquido. Todas las soluciones se prepararon con colorante alimentario color rojo, con el fin de controlar casos de regurgitación que serían conspicuos en el papel blanco colocado en la base de las jaulas. La dosificación se realizó a través de una sonda gástrica de 2 mm embebida en vaselina líquida y conectada a una jeringa de 1 mL. Se reanudó la provisión de agua y comida *ad libitum* a partir de 12 horas luego de la administración de IMI. Durante las primeras dos horas los tordos se observaron cada media hora para caracterizar el comportamiento de las aves e identificar la aparición de signos de intoxicación como plumas erizadas, pérdida de equilibrio, dificultad para percharse o caminar, y temblores, entre otros. Además, se observó y registró el uso del espacio dentro de la jaula por las aves para así evaluar su nivel de actividad: Si los tordos estaban quietos, se anotaba que estaban en el “Piso” o en la “Percha”. Si presentaban el comportamiento normal que consiste en moverse con regularidad entre el piso y la percha se registró como “Ambos”. Luego se hizo un seguimiento de las aves cada 12 horas hasta el final del experimento durante el cual no se registró individualmente el comportamiento.

Aves tratadas y controles fueron sacrificadas y muestreadas a 4, 12, 24 y 48h luego de la administración de IMI (agua para los controles). Seis aves tratadas fueron sacrificadas a 4 y 12 horas, cinco aves tratadas fueron sacrificadas a 24 y 48h, mientras que dos aves control fueron sacrificadas en cada tiempo de muestreo (4, 12, 24 y 48h). Las aves fueron eutanasiadas en una cámara de dióxido de carbono y decapitadas, de acuerdo con las guías institucionales (CICUAE) e internacionales de bienestar animal (Fair *et al.*, 2010; Turaga *et al.*, 2016). La manipulación de las aves y los protocolos de trabajo fueron realizados según las guías internacionales de bienestar animal y aprobados por el comité institucional de cuidado animal (CICUAE- INTA #03-2015).



Una vez eutanasiadas las aves, se colectó sangre mediante punción cardíaca utilizó una aguja 25 G y una jeringa heparinizada de 1 mL. Dos alícuotas de sangre de 10  $\mu$ L se usaron para el recuento de eritrocitos (RE) y para la determinación de la concentración de hemoglobina (Hb); 20  $\mu$ L se utilizaron para el ensayo cometa; se llenaron dos capilares heparinizados para estimar el hematocrito (HTC) y finalmente se realizaron dos frotis para el recuento leucocitario (RL), el conteo de micronúcleos (MN), y la determinación del grado de policromasia (PC). La sangre restante fue centrifugada a 10.000g por 5 minutos y el plasma fue separado y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis. El pellet compuesto de eritrocitos fue lavado resuspendiéndolo y centrifugándolo con 500  $\mu$ L de una solución 0,9% de NaCl tres veces seguidas. Luego de la última centrifugación, el pellet final fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En base a la observación de las gónadas se registró el sexo de los individuos. Finalmente, se tomaron muestras de cerebro, hígado, riñón y músculo pectoral que fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis químico y bioquímico.

### **3.2.3. Determinación analítica de IMI en la solución madre y los tejidos**

La concentración de IMI presente en la solución preparada a partir del formulado comercial Confidor® 35sc (Bayer) fue corroborada comparando las seis alícuotas recolectadas contra una curva de calibración preparada con diluciones seriadas de una solución estándar de IMI en metanol (CL40.0918, Chem-Lab, Bélgica).

El IMI presente en las muestras de plasma fue extraído diluyendo 10  $\mu$ L de plasma 1:25 en acetonitrilo (ACN), seguido por una centrifugación a 10.000g durante 15 minutos. El sobrenadante fue colectado y utilizado para la determinación química del IMI. Para la extracción del IMI de las muestras de hígado y riñón, 0,1 g de tejido fue homogeneizado en 1 mL de tampón fosfato (0,1M pH 6,5). El homogenato fue sonificado durante 15 minutos y luego centrifugado a 10.000g durante otros 15 minutos. A continuación, 100  $\mu$ L del sobrenadante obtenido fue diluido al 25% en una mezcla de metanol: ACN (50:50), y se volvió a centrifugar 15 minutos a 10.000g. El sobrenadante final fue utilizado para la determinación de IMI. Las curvas de calibración se hicieron sobre extractos de los distintos tejidos para considerar el efecto matriz. Para ello, muestras de plasma, hígado y riñón de las aves del grupo control fueron fortificadas con una solución estándar de IMI (CL40.0918, Chem-Lab, Bélgica) con concentraciones entre 8

y 400 (ng IMI/mL), y extraídas como arriba descrito (Jiao *et al.*, 2016). Se agregaron 10 µL (1:200) del standard interno fosfato de trifenilo (TPP) (CAS Nro. 115-86-6, Chem-Lab, Bélgica) a todas las muestras incluidas las de la curva de calibración para corregir, en caso de que ocurriera, la pérdida de analito durante la preparación de la muestra o la entrada de la muestra al equipo.

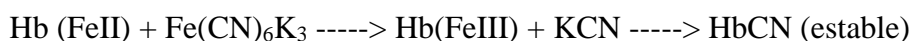
El análisis químico se realizó en el Laboratorio de Contaminantes Químicos, del Instituto de Tecnología de alimentos de INTA. La concentración de IMI fue determinada mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia y Espectrometría de Masas acoplada a una trampa lineal de iones (HPLC-MSMS) LQT XL™ (ThermoScientific System™). Se utilizó una columna C18 Núcleo DUR 618 Gravity 3 µm MACHEREY-NAGEL®. La fase móvil era compuesta de 50 mM de formiato de amonio (fase A) y acetonitrilo: metanol 50:50 (fase B). El gradiente de elución se realizó de la siguiente manera (%A: %B): 0 a 1 minuto (90:10), 1 a 5 minutos de (90:10) a (50:50), de 5 a 12 minutos de (50:50) a (20:80), de 12 a 14 minutos de (20:80) a (0:100), de 14 a 17 minutos (0:100), de 17 a 20 minutos de (0:100) a (90:10); y finalmente de 20 a 25 minutos se mantuvo en (90:10) para reacondicionar la columna para la siguiente muestra. El volumen de inyección fue de 10 µL, la temperatura de la columna fue 45°C, el flujo 0,25 mL/minuto, y la energía de ionización (ESI) positiva de 45 unidades arbitrarias. El ion de IMI fue 256.16 m/z y el tiempo de retención fue de 8,20 minutos para las muestras de plasma y de 9,9 minutos para las muestras de riñón e hígado; el ion del estándar interno TPP fue 327,3 m/z, y el tiempo de retención del fue de 16 y 17,7 minutos en las muestras de plasma, riñón e hígado respectivamente. El límite de detección (LD) se definió como la concentración más baja a la cual el sistema analítico podía diferenciarla del nivel de base (ruido), y se calculó en base a una relación señal/ruido 3:1. El límite de cuantificación (LQ) se definió como la mínima concentración cuantificable de la curva de calibración y se calculó en base a una relación señal/ruido 10:1 (Cheng *et al.*, 2019).

#### **3.2.4. Parámetros hematológicos**

El recuento de eritrocitos (RE) se realizó dentro de las 12 horas desde la dilución de la sangre en la solución de Natt Herrick. El RE fue realizado por duplicado en una cámara de Neubauer mejorada. En un microscopio óptico (40x) se contó el número de células en los cuatro cuadrados de la esquina y el cuadrado central (cada cuadrado está

dividido en 16 cuadrados más pequeños), de la gradilla de la cámara de Neubauer. El número total de eritrocitos se multiplicó por 10.000 para obtener el número de células por microlitro de sangre (Campbell, 2015).

La concentración de hemoglobina (Hb) fue determinada con el método de cianohemoglobina de Drabkin (Clark *et al.*, 2009). La sangre colectada fue inmediatamente diluida 1:200 en la solución de Drabkin que contiene ferrocianuro y cianuro potásicos (Biopur, Rosario, Argentina) El reactivo de Drabkin lisa los eritrocitos y oxida todas las formas de Hb a cianometahemoglobina (HbCN) (con excepción de la sulfohemoglobina que se encuentra presente en cantidades mínimas), a través de la siguiente reacción:



Las muestras fueron incubadas al menos un día en la solución de Drabkin antes de ser centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 540 nm, y se calculó la concentración de hemoglobina comparando contra una curva realizada con un estándar de hemoglobina (HemogloWiener, Wiener Lab, Rosario, Argentina).

El hematocrito (HTC) se calculó como el porcentaje de la fracción sólida de la sangre que contiene las células respecto al volumen total. El HTC fue determinado luego de centrifugar de capilares con sangre por 5 minutos a 10.000 g.

Los índices eritrocitarios: volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) fueron estimados a partir del HTC, Hb y RE a partir de las siguientes ecuaciones (Samour *et al.*, 2016):

$$\text{VCM (fL)} = (\text{Hcr (L/L)} / \text{RE} (10^{12}\text{L}))$$

$$\text{HCM (pg)} = [\text{Hb (g/dL)} * 10] / \text{RE} (10^{12}\text{L})$$

$$\text{CHCM (g/dL)} = \text{Hb (g/dL)} / \text{Hcr (L/L)}$$

Se realizaron dos frotis por ave para realizar el recuento total y diferencial de leucocitos, y de micronúcleos (MN). Cada frotis se dejó secar al aire libre, se fijó con metanol y se tiñó con la solución de Wright-Giemsa (solución comercial Biopack®)

(Clark, 2009). Los frotis se recodificaron al azar para evitar sesgos en la toma de datos, y todos los recuentos se realizaron sobre campos de células que estaban dispuestas en una sola capa y con distribución uniforme. El recuento leucocitario (RL) se hizo según Lane (1991) bajo un aumento de 40X, se contó el número de leucocitos en 10 campos. Se realizó un promedio de los 10 campos y se multiplicó por 2 para obtener el número de leucocitos por microlitro (Dunbar, *et al.*, 2005). El recuento diferencial de leucocitos se expresó como el porcentaje de cada tipo celular: linfocitos, heterófilos, basófilos, eosinófilos y monocitos; sobre un total de 100 células blancas contadas a 1000X. La policromasia (PC) se estimó como el número de eritrocitos policromáticos por 1000 eritrocitos, a partir de un total de 10 000 eritrocitos examinados a 1000X (Campbell, 2015).

### **3.2.5. Genotoxicidad: micronúcleos y ensayo cometa**

Bajo un aumento de 1000X se realizó el recuento de MN utilizando los frotis descriptos en las secciones anteriores. La frecuencia de MN se calculó contando el número de MN de un total de 8000 eritrocitos maduros; y se expresó como número de MN /1000 células. Brevemente, se registraba la presencia de micronúcleos si se cumplía con el siguiente criterio de identificación: diámetro menor a 1/3 del diámetro del núcleo principal; no reflectante; tinción de menor o igual intensidad que la del núcleo principal; sin unión con el núcleo principal; sin superposición con el núcleo principal; y el borde del MN y del núcleo principal debían ser distinguibles entre sí (Fenech, 2000).

El ensayo cometa, o electroforesis alcalina de células individuales, es un método sensible para estudiar el daño al ADN. La técnica se basa en la visualización microscópica del ADN después de que las células son embebidas en agarosa, lisadas y sometidas a una electroforesis alcalina. Para realizar el ensayo cometa se utilizaron 20 µL de sangre entera, y se siguió el procedimiento descrito por Singh (1996) con modificaciones menores reportadas por Pérez-Iglesias *et al.*, (2014). Los portaobjetos fueron tenidos con SYBR® Safe (ThermoFisher Scientific, Invitrogen, Argentina) y examinados con el filtro apropiado en un microscopio de fluorescencia Leica DM2500. El daño genético fue clasificado visualmente en cinco categorías, de acuerdo al grado de migración del ADN como: células sin daño (tipo 0 y I) y células dañadas (tipos II, III y IV) (Çavaş y Könen, 2007). En total se analizaron 100 células por individuo, y se calculó el índice de daño genético (IDG) de acuerdo a la fórmula de Pitarque *et al.* (1999):

$$\text{IDG} = (1 * \text{tipo I} + 2 * \text{tipo II} + 3 * \text{tipo III} + 4 * \text{tipo IV}) / (\Sigma \text{tipo 0-IV})$$

### 3.2.6. Actividad enzimática

Las actividades enzimáticas de las colinesterasas (ChE), la catalasa (CAT) y el glutatión-S-transferasa (GST) fueron determinadas en hígado, músculo, cerebro, plasma y GR; siguiendo los protocolos de Brodeur *et al.* (2011, 2012, 2017). Los tejidos de hígado, músculo y cerebro fueron homogeneizados en frío en una solución tampón compuesta por 50mM de tris(hidroximetil)aminometano (pH 7,4), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1mM, y 0,25M de sacarosa. Los homogenatos fueron centrifugados por 10 minutos a 4°C para remover los restos celulares, y el sobrenadante se utilizó para las determinaciones enzimáticas. La actividad de las ChE se midió de acuerdo al método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961) el método se basa en el uso de acetilcolina iodada como sustrato para reducir el ácido 5 5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB). El cambio en la absorbancia se registró a 37°C y 412 nm, y la actividad enzimática fue calculada utilizando un coeficiente de extinción molar de 14150 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. La actividad de la CAT se determinó midiendo la caída de absorbancia resultante del consumo de peróxido de hidrógeno a 240 nm y 37°C, y se utilizó un coeficiente de extinción molar de 43,6 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. La actividad de la GST se midió utilizando 2,4-dinitroclorobenceno (CDNB) como sustrato. Los cambios en la absorbancia se registraron a 340 nm y 37°C, y la actividad enzimática fue calculada con un coeficiente de extinción molar de 9,6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. La concentración de proteínas se midió según el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), y se usó albumina bovina como estándar.

### 3.2.7. Análisis estadístico

Los controles se agruparon para su análisis debido a que no presentaron diferencias significativas en el tiempo. Se verificó que el tiempo de muestreo no fuera una variable significativa mediante un análisis ANOVA de una vía, en el caso de que se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedacea de los datos. Los parámetros: MN, eosinófilos, MCH, MCHC, IDG, GST de cerebro y ChE de músculo, no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedacea aun luego de transformados, por lo que se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Los parámetros bioquímicos, genéticos y hematológicos se analizaron mediante una ANOVA de una vía en el caso de que se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedacea de los datos. Algunas variables se transformaron para que cumplieran con los supuestos de la siguiente manera: raíz cuadrada (PC, RL, MN, heterófilos, linfocitos, plasma GST, y músculo GST), logaritmo natural (MCV y cerebro GST), coseno (MCH y linfocitos), tangente (HCT), y  $1/x$  (músculo ChE). Cuyo hubo diferencias significativas entre los tratamientos se realizó una prueba de contraste de Holm-Sidack. El valor de significancia fue  $p < 0,05$  en todos los casos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software estadístico SigmaStat (SPSS, Chicago, IL, USA).

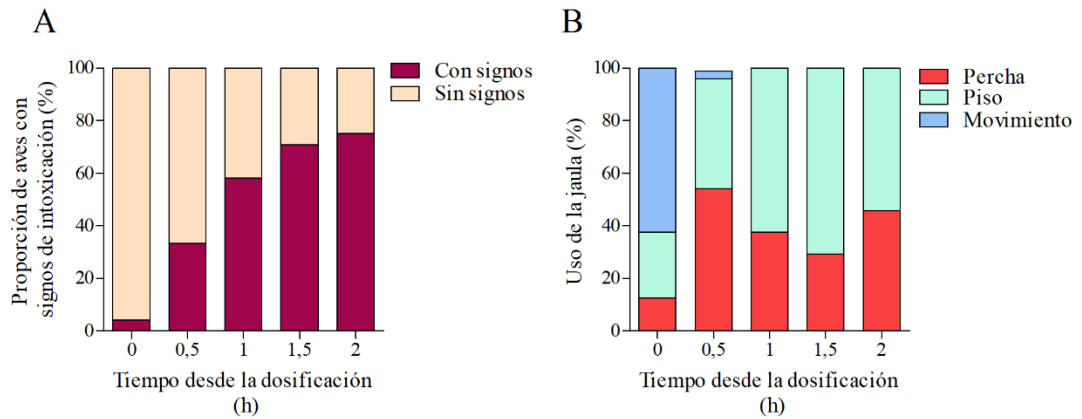
### **3.3. RESULTADOS**

#### **3.3.1. Efectos subletales del IMI**

La concentración de IMI medida en la solución madre fue de  $21,25 \pm 0,685$  mg/mL (N=6). Como ese valor corresponde al 84,98% del valor nominal (25 mg/mL), se utilizó el valor nominal para la totalidad de los análisis realizados en este trabajo (USEPA, 2012c). En total se testearon 30 tordos músico: 13 machos y 17 hembras. El peso promedio inicial de las aves fue de  $38,37 \pm 0,531$  g. No se encontraron diferencias significativas en el peso de los animales asignados a los distintos tratamientos, ni entre los machos y las hembras ( $p > 0,05$ ).

Todos los individuos tratados presentaron síntomas de intoxicación relacionados al sistema nervioso a partir de los 30 minutos posteriores a la administración del IMI, ya fueran alteraciones en el aspecto o en la actividad (Figura 3.1). De menor a mayor grado de intensidad, los síntomas observados fueron: plumas erizadas, movimientos descoordinados, pérdida del equilibrio, disminución de la actividad, incapacidad para percharse, ojos entrecerrados, temblores, ojos cerrados, pico abierto, postura no erguida con las alas y patas abiertas, falta total de movimiento, e imposibilidad de levantarse luego de una caída. En la Figura 3.1A se muestra como la proporción de animales que presentan signos de intoxicación aumenta gradualmente durante las dos horas que siguen la administración de IMI. Inmediatamente luego de la dosificación solo un individuo presentó temblores, sin embargo, a las dos horas de la administración del IMI, el 75% de las aves presentaba algún signo de intoxicación en respuesta a la ingesta de IMI. Por su parte, la Figura 3.1B ilustra la movilidad de las aves y su ubicación en la jaula. Se observa

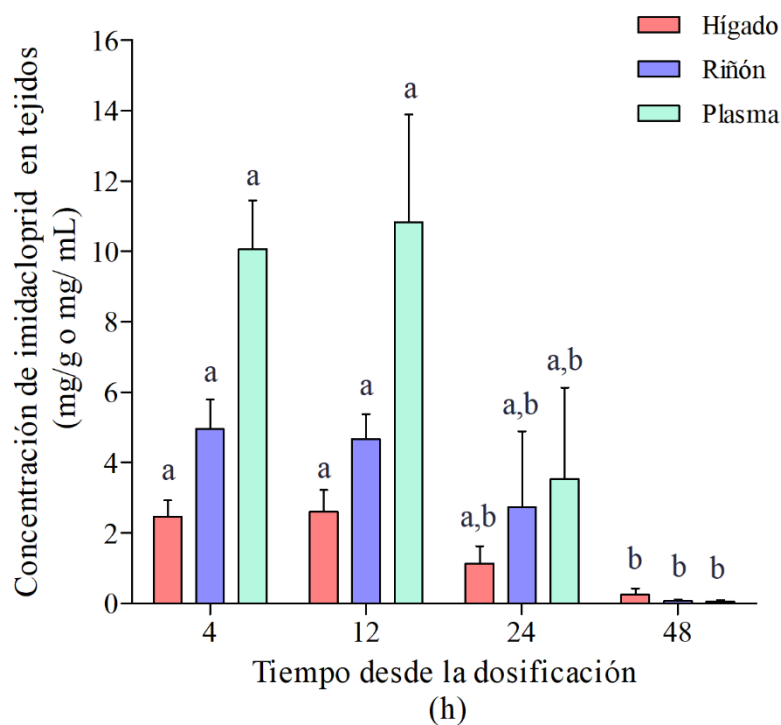
que, a partir de los 30 minutos después de la administración de IMI, más del 90% de las aves se encuentran inmóvil en el piso o en la percha. A las 48 horas, los tordos músicos tratados parecían completamente recuperados, sin diferencias comportamentales con respecto al grupo Control.



**Figura 3.1.** A) Proporción de aves que presentó signos de intoxicación y B) Uso del espacio dentro de la jaula durante las primeras dos horas después de la administración de una dosis de 35mg IMI/kg a tordos músicos (*Agelaioides badius*).

### 3.3.2. Distribución del IMI en plasma y órganos

Las concentraciones de IMI presentes en el plasma, hígado y riñón a las 4, 12, 24 y 48 horas luego del tratamiento están ilustradas en la Figura 3.2. El IMI no se detectó en ningún tejido de los individuos del grupo Control. La dinámica de la aparición y eliminación de IMI fue similar entre los distintos tejidos examinados. En promedio las concentraciones más altas se detectaron entre las 4 y las 12 horas desde la administración de IMI. La máxima concentración de IMI detectada en plasma fue de 19,3  $\mu\text{g/mL}$  a las 12 horas. Mientras que en el hígado y el riñón los valores máximos se detectaron a las 24 horas y fueron 5,52 y 11,3  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente. En todos los momentos de muestreo, las concentraciones de IMI registradas fueron mayores en plasma que en riñón, y las concentraciones observadas en estos dos tejidos fueron mayores que las determinadas en hígado. A partir de las 24 horas, las concentraciones de IMI se redujeron significativamente en la mayoría de los tejidos, y a las 48 horas casi no se detectó IMI en los tejidos.



**Figura 3.2.** Concentración de imidacloprid en hígado, riñón y plasma de *Agelaioides badius* a las 4, 12, 24 y 48 horas luego de la administración de una dosis de 35mg IMI/kg. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tiempos para el mismo órgano ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.3. Parámetros hematológicos

La Tabla 3.1 indica los valores obtenidos a los distintos tiempos de muestreo para los parámetros hematológicos e índices eritrocitarios determinados. De manera general, el efecto sobre estos parámetros de la administración de una única dosis de IMI fueron transitorios y leves. Se observó un incremento transitorio en el RE, que era significativo respecto al grupo control 12 horas luego de la dosificación con IMI. El HTC presentó un comportamiento similar, encontrándose elevado respecto al grupo control a las 4 y 24 horas luego la administración de IMI, y volviendo a los valores similares con los controles a las 48 horas. La Hb estuvo elevada respecto al grupo control a las 4 horas desde la dosificación, y retornó a los valores normales a partir de las 12 horas. Los tres índices eritrocitarios evaluados: VCM, HCM y CHCM, se encontraron aumentados a las



4 horas respecto al grupo control, y retornaron a los valores normales a partir de las 12 horas desde la ingesta de IMI. No se observaron diferencias significativas entre los tordos músico del grupo control y los tratados con IMI en términos del RL total y diferencial, o en el grado de policromasia (Tabla 3.2).

**Tabla 3.1.** Efecto de la administración de una dosis única de IMI sobre los parámetros hematológicos (media  $\pm$  E.S.) de *Agelaioides badius*. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tiempos ( $p < 0,05$ ). RE= recuento de eritrocitos; HTC= hematocrito; Hb= hemoglobina; VCM= volumen corpuscular medio; HCM= hemoglobina corpuscular media; CHCM= concentración de hemoglobina corpuscular media.

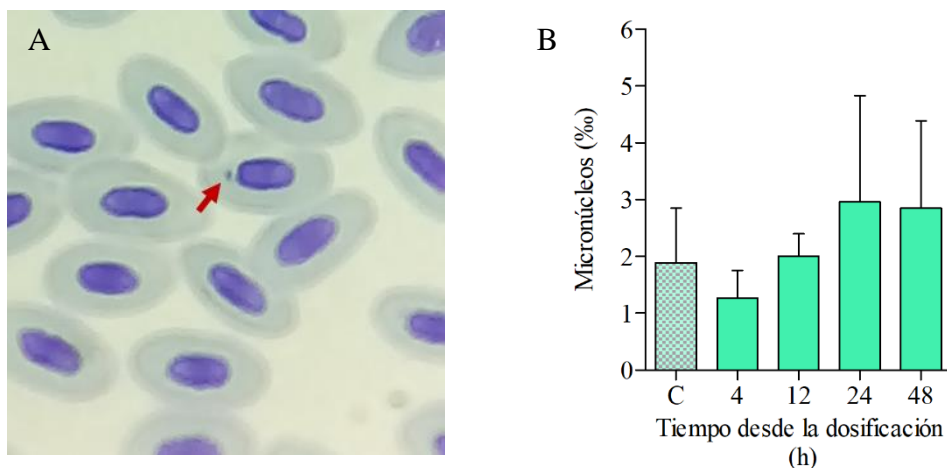
	Control	4 H	12 H	24 H	48 H
<i>RE</i> ( $10^{12}/L$ )	1,96 $\pm$ 0,335 <sup>a</sup> (7)	1,86 $\pm$ 0,873 <sup>a</sup> (6)	4,43 $\pm$ 0,594 <sup>b</sup> (5)	3,83 $\pm$ 0,488 <sup>a</sup> (5)	3,82 $\pm$ 1,12 <sup>a</sup> (5)
<i>HTC</i> (%)	37,88 $\pm$ 5,48 <sup>a</sup> (7)	56,33 $\pm$ 1,75 <sup>b</sup> (6)	52,24 $\pm$ 1,51 <sup>a,b</sup> (6)	54,95 $\pm$ 2,76 <sup>b</sup> (5)	40,00 $\pm$ 3,07 <sup>a</sup> (5)
<i>Hb</i> (g/dL)	12,80 $\pm$ 1,51 <sup>a</sup> (7)	20,82 $\pm$ 1,43 <sup>b</sup> (6)	15,44 $\pm$ 0,704 <sup>a</sup> (5)	16,79 $\pm$ 1,08 <sup>a,b</sup> (5)	14,95 $\pm$ 1,16 <sup>a</sup> (5)
<i>VCM</i> (fL)	205,9 $\pm$ 28,3 <sup>a,b</sup> (7)	497,3 $\pm$ 142 <sup>a</sup> (5)	123,0 $\pm$ 16,45 <sup>b</sup> (5)	151,7 $\pm$ 18,5 <sup>b</sup> (5)	132,3 $\pm$ 27,8 <sup>b</sup> (5)
<i>HCM</i> (pg)	71,69 $\pm$ 10,0 <sup>a,b</sup> (7)	167,2 $\pm$ 51,7 <sup>a</sup> (5)	35,21 $\pm$ 4,22 <sup>b</sup> (5)	45,89 $\pm$ 4,84 <sup>b</sup> (4)	49,46 $\pm$ 10,2 <sup>a,b</sup> (4)
<i>CHCM</i> (g/dL)	34,92 $\pm$ 1,58 <sup>a,b</sup> (7)	37,20 $\pm$ 2,88 <sup>a</sup> (6)	29,48 $\pm$ 0,644 <sup>b</sup> (6)	30,50 $\pm$ 0,769 <sup>a,b</sup> (5)	37,42 $\pm$ 10,2 <sup>b</sup> (5)

**Tabla 3.2.** Efecto de la administración de una dosis única de IMI sobre el conteo total y diferencial de leucocitos (media  $\pm$  E.S.) en *Agelaioides badius*. RL= recuento de leucocitos; PC= policromasia.

	Control	4 H	12 H	24 H	48 H
<i>RL (10<sup>9</sup>/L)</i>	3,64 $\pm$ 0,862 (7)	2,88 $\pm$ 0,588 (6)	3,92 $\pm$ 1,85 (5)	2,28 $\pm$ 0,671 (5)	2,43 $\pm$ 1,09 (5)
<i>Heterófilos (%)</i>	49,6 $\pm$ 7,91 (7)	49,5 $\pm$ 4,45 (6)	55,6 $\pm$ 6,44 (5)	43,1 $\pm$ 7,16 (5)	40,4 $\pm$ 5,96 (5)
<i>Linfocitos (%)</i>	40,0 $\pm$ 7,08 (7)	39,7 $\pm$ 4,97 (6)	34,4 $\pm$ 5,41 (5)	44,90 $\pm$ 6,33 (5)	43,2 $\pm$ 5,23 (5)
<i>Eosinófilos (%)</i>	2,83 $\pm$ 0,588 (7)	4,80 $\pm$ 1,18 (6)	3,75 $\pm$ 1,41 (5)	2,60 $\pm$ 0,679 (5)	6,20 $\pm$ 1,96 (5)
<i>Basófilos (%)</i>	5,94 $\pm$ 1,15 (7)	4,64 $\pm$ 1,33 (6)	6,09 $\pm$ 1,14 (5)	7,99 $\pm$ 1,77 (5)	9,60 $\pm$ 1,69 (5)
<i>Monocitos (%)</i>	0,709 $\pm$ 0,285 (7)	1,33 $\pm$ 0,555 (6)	0,198 $\pm$ 0,198 (5)	1,40 $\pm$ 0,748 (5)	0,600 $\pm$ 0,600 (5)
<i>PC (%)</i>	7,71 $\pm$ 0,801 (7)	6,70 $\pm$ 0,421 (6)	7,91 $\pm$ 0,709 (5)	7,10 $\pm$ 0,645 (5)	6,46 $\pm$ 0,491 (5)

### 3.3.4. Genotoxicidad: MN y ensayo cometa

En total se evaluó la presencia de micronúcleos en 241.216 eritrocitos. No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de MNs observada en las aves control y las tratadas con IMI; el promedio de MNs encontrado en cada 1000 células (media  $\pm$  E.S.) correspondiendo a 1,69 ( $\pm$  0,946) ‰, y 1,62 ( $\pm$  0,425) ‰, respectivamente (Figura 3.3). La Tabla 3.3 resume los resultados obtenidos a partir del ensayo cometa. En total se evaluaron 2.989 células, y no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células dañadas o en el índice de daño genético entre los tordos tratados con IMI y los del grupo control.



**Figura 3.3.** Frecuencia de MN en eritrocitos de *Agelaioides badius* muestreados a distintos tiempos luego de una dosis de 35 mg IMI/kg. A) Micronúcleo (flecha), B) Número de micronúcleos cada 1000 células. C: control.

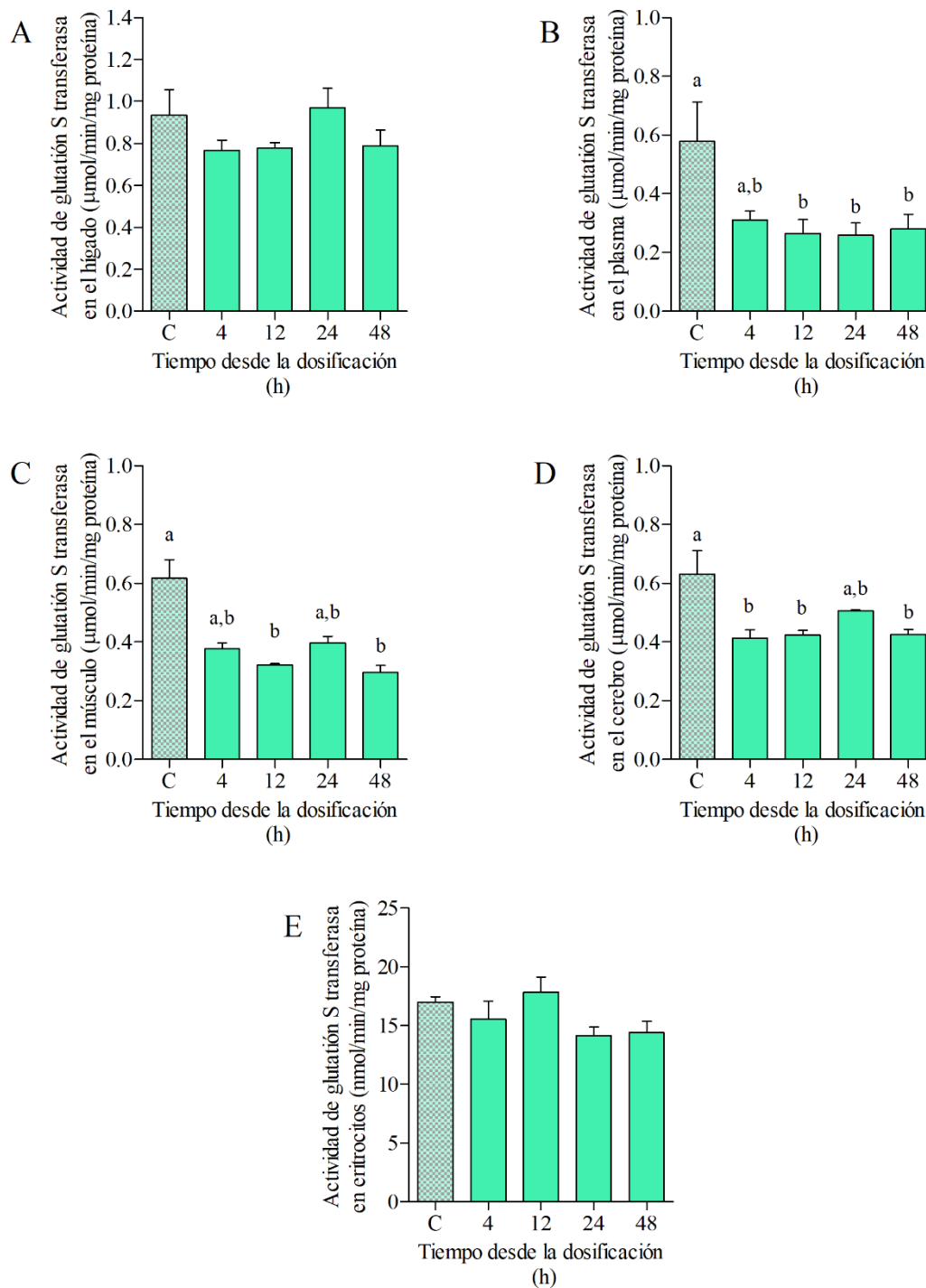
**Tabla 3.3.** Número de células sanguíneas clasificadas según el daño genético observado en el ensayo cometa y evaluadas en *Agelaioides badius* a distintos tiempos luego de una dosis de 35 mg IMI/kg. IDG: Índice de daño genético.

	Control	4 H	12 H	24 H	48 H
<i>Grado de daño</i>					
<i>(nro. células)</i>					
0	27,1 ± 12,2	4,33 ± 1,31	21,0 ± 8,25	5,60 ± 1,89	20,0 ± 8,93
1	53,1 ± 6,05	67,5 ± 9,22	52,0 ± 4,48	61,0 ± 1,89	52,4 ± 13,5
2	12,9 ± 2,71	20,0 ± 3,27	20,2 ± 2,39	19,6 ± 4,27	21,4 ± 6,52
3	5,00 ± 1,07	10,7 ± 2,81	4,83 ± 2,18	5,40 ± 1,17	6,40 ± 2,27
4	0,43 ± 0,30	1,33 ± 0,72	0,33 ± 0,21	1,40 ± 0,93	0,60 ± 0,40
<i>Daño (grado 2+3+4)</i>					
<i>(%)</i>	19,39	31,48	26,0	29,22	27,96
<i>IDG</i>	1,01	1,41	1,11	1,34	1,14

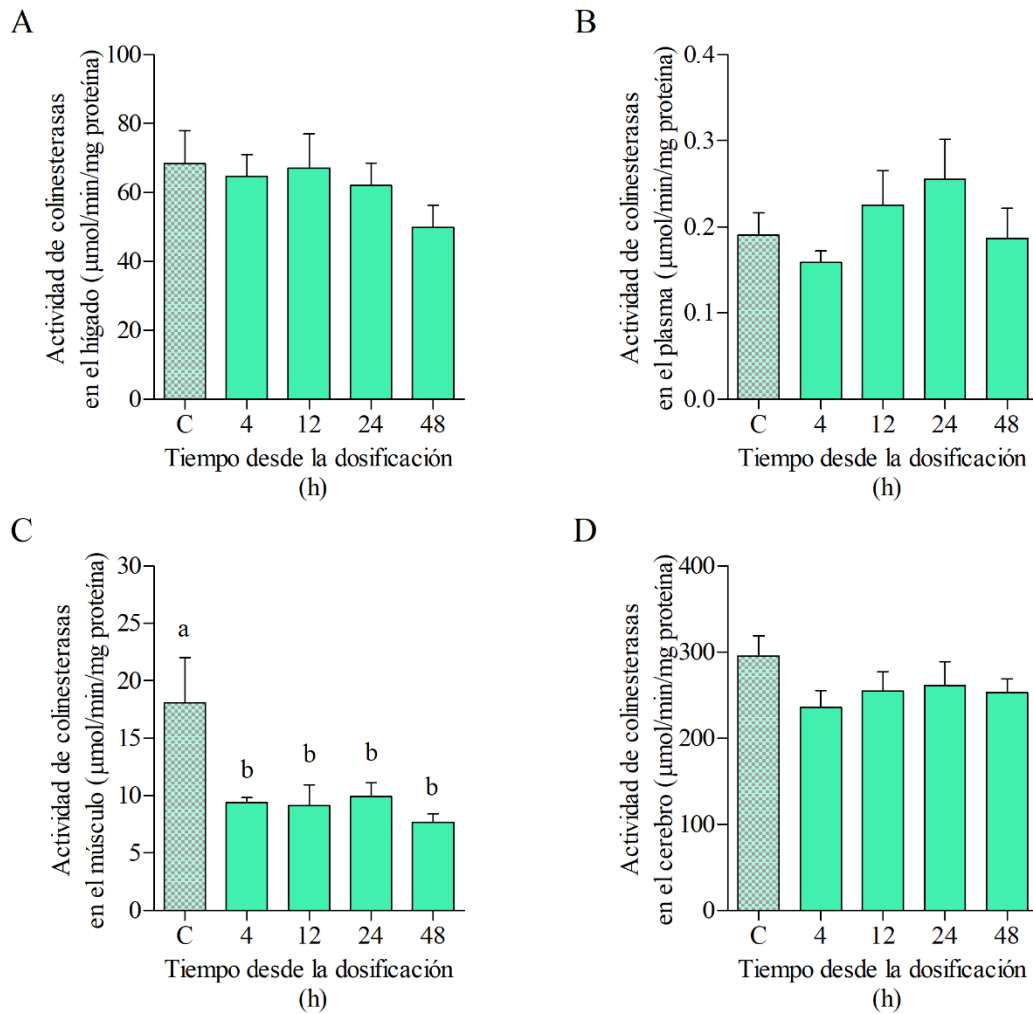
### **3.3.5. Actividad enzimática**

La administración de IMI indujo una disminución de la actividad de la GST en el plasma, el músculo y el cerebro de las aves tratadas respecto a los controles, aunque no alteró la actividad de la GST en el hígado y los eritrocitos (Figura 3.4). La disminución de la actividad de GST en el plasma y el músculo fue notable a partir de las 4 horas desde la administración del IMI y perduró durante las 48h del experimento (Figuras 3.3b, 3.3c, 3.3d).

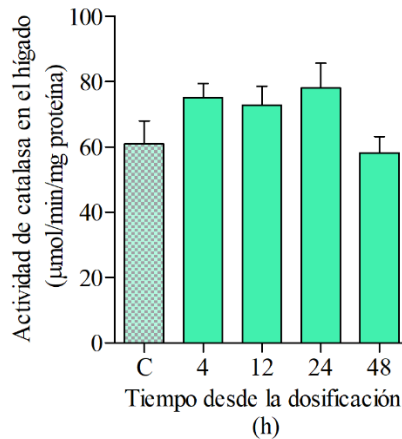
La actividad de las enzimas colinesterasas se midió en hígado, plasma, músculo y cerebro (Figura 3.5). Sólo en el músculo se observó una disminución significativa de la actividad de las colinesterasas en las aves tratadas con IMI respecto al control (Figura 3.5d). Por su parte, la actividad de la enzima CAT fue detectable solamente en el hígado y no se observaron diferencias significativas entre las aves dosificadas con IMI respecto a las del grupo control (Figura 3.6).



**Figura 3.4.** Actividad de la enzima GST en el plasma y en distintos tejidos del tordo músico (*Agelaioides badius*) a distintos tiempos luego de la administración de IMI. A) hígado; B) plasma; C) músculo; D) cerebro; E) eritrocitos. C: control. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los gráficos que no incluyen letras no presentan diferencias significativas entre los tratamientos.



**Figura 3.5.** Actividad de las enzimas ChE en plasma y distintos tejidos del toro músico (*Agelaioides badius*) determinados a distintos tiempos luego de la exposición a IMI. A) hígado; B) plasma; C) músculo; D) cerebro. C: control. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los gráficos que no incluyen letras no presentan diferencias significativas entre los tratamientos.



**Figura 3.6.** Actividad de la enzima CAT en hígado del tordo músico (*Agelaioides badius*) determinada a distintos tiempos luego de la exposición a IMI. C: control.

### 3.4. DISCUSION

En el presente estudio se relacionó la presencia del IMI en los distintos tejidos del tordo músico luego de una ingesta subaguda, con la respuesta temporal de parámetros bioquímicos, hematológicos y genotóxicos, con el objetivo de conocer mejor los efectos biológicos inducidos por el IMI en aves passeriformes e identificar potenciales biomarcadores de exposición subaguda. La aparición en el tiempo de IMI en los distintos tejidos y órganos del tordo músico fue similar a lo reportado para otras especies de aves no passeriformes como gallinas y codornices: el IMI se absorbió rápidamente, se distribuyó en todos los tejidos, y luego se eliminó del organismo dentro de las 48 horas desde su administración (Banasiak, 2000; Bean *et al.*, 2019; Roy *et al.*, 2020).

En consistencia con la rápida absorción del IMI, los efectos comportamentales asociados a alteraciones del sistema nervioso aparecieron rápidamente, al igual que lo reportado para otras especies (Addy-Orduna, *et al.*, 2019; Franzen-Klein *et al.*, 2020). A los 30 minutos posteriores a la administración del IMI, más del 90% de las aves presentaba algún signo de intoxicación. La unión del imidacloprid a los receptores nicotínicos del sistema nervioso provoca una hiper-exitación de las neuronas que se traduce en movimientos descoordinados, pérdida de equilibrio, locomoción reducida, y temblores, entre otros (Yamamoto y Casida, 1999; Tomizawa y Casida, 2005). La falta

de movilidad observada por las aves tratadas, sumada a la baja proporción de las aves que se encontraban en la percha (menos del 50%) sugieren que, al menos en las primeras horas luego de la ingesta del IMI las aves son incapaces de mantenerse perchadas. Los efectos subletales del IMI observados en los tordos músico podrían tener consecuencias letales en el ambiente, al impedir la búsqueda de un refugio o escapar de un predador (Milot *et al.*, 2017).

La presencia de IMI en el tiempo siguió el mismo patrón en el hígado, el riñón y el plasma. Las concentraciones de IMI ya eran las máximas al momento de la primera toma de muestras a las 4 horas, y se mantuvieron elevadas hasta las 12 horas luego de la administración. Tiempos similares fueron registrados por Roy *et al.*, (2020) en gallinas, en donde se observó la máxima concentración de IMI en plasma a las 2 horas luego de la administración de IMI, y su eliminación a partir de las 24 horas. Por otro lado, Bean *et al.*, (2019) reportan en codornices que las máximas concentraciones de IMI en varios tejidos fueron observadas a la hora posterior a la administración, siendo su eliminación casi total a las 8 horas. La diferencia respecto a los tiempos observados en las codornices se debe probablemente a que los tordos músicos recibieron una dosis mayor de IMI, demorándose más su eliminación del organismo: los tordos músico recibieron concentraciones equivalentes al 63% de su DL50 (35 mg IMI/kg), comparado con las codornices que solo recibieron el 3 y 9% de su DL50 (0,9 y 2,7 mg IMI/kg respectivamente). Estos resultados coinciden con los reportados por Hao *et al.* (2018) y Roy *et al.* (2020) que observaron que las concentraciones de IMI detectadas en el plasma del gorrión corona blanca y gallinas, respectivamente, son dependientes de la dosis sugiriendo que cuando se administran concentraciones altas, se saturan los procesos de biotransformación y eliminación, haciendo que la permanencia del IMI en el organismo sea mayor. En general, los individuos del tordo músico presentaron una alta variabilidad en las concentraciones de IMI a todos los tiempos. La mayor diferencia entre las concentraciones de IMI se detectó en el riñón a las 24 horas, donde el valor más alto fue 117 veces mayor que el más bajo. Esto se debió principalmente a que a partir de las 24 horas algunos individuos presentaban concentraciones casi nulas de IMI, lo indicó que existe variación individual en la absorción, biotransformación y/o eliminación.

La detección de residuos de IMI en los tejidos, indica su pasaje sistémico al organismo, y sirve como biomarcador de exposición. En el tordo músico, el tejido que apareció como el mejor indicador de la exposición a IMI fue el plasma, ya que ahí se



alcanzaron las mayores concentraciones. El muestreo del plasma también presenta la ventaja, en comparación a otros tejidos, de que es posible de realizar sin sacrificar el animal, algo que es muy valioso para los estudios a campo y los trabajos con especies amenazadas. En este trabajo, además, la cantidad de plasma utilizada para realizar la determinación química del IMI (20  $\mu$ L) fue menor que las cantidades reportadas previamente en la determinación de IMI en plasma (Taliensky-Chamudis *et al.*, 2017, Hao *et al.*, 2018; Byholm *et al.*, 2018), representa una ventaja para el monitoreo de aves pequeñas (< 50 g). En todos los tiempos de muestreo, la concentración de IMI en el plasma fue entre dos y cinco veces mayor que las concentraciones detectadas en riñón e hígado, respectivamente. Si bien los tiempos a los que ocurren las máximas concentraciones de IMI en plasma dependerían de la dosis (Hao *et al.*, 2018), el IMI es eliminado del organismo rápidamente, por lo que la detección de IMI en el plasma de las aves estaría indicando una exposición reciente. Con el objetivo de maximizar la detección de casos de exposición en el ambiente, sería importante incorporar en investigaciones futuras la determinación del IMI en las heces. Además de ser un método no invasivo, en un trabajo publicado recientemente (Roy *et al.*, 2020), se demuestra que en las heces la concentración de IMI es detectada hasta 15 días después de la exposición. Sin embargo, hay que considerar que en aves pequeñas (< 50 g) la obtención de la cantidad necesaria de muestras en el campo puede no ser factible. Finalmente, incorporar a futuro la detección de los metabolitos del IMI (5-hidroxi-IMI y IMI-olefina) en las muestras biológicas colectadas, contribuiría a un diagnóstico más sensible de casos de exposición en las aves, ya que se ha demostrado que el IMI es rápidamente metabolizado, y la concentración de los productos obtenidos es mayor que la del compuesto original a las pocas horas desde la ingesta de IMI (Bean *et al.*, 2019), y han sido detectados en los tejidos hasta 15 días después (Roy *et al.*, 2020).

Los parámetros hematológicos son ampliamente utilizados para monitorear los cambios fisiológicos y evaluar la salud de las aves con un mínimo impacto negativo sobre el individuo (Clark, 2009; Pistone, *et al.*, 2017). El diagnóstico basado en parámetros hematológicos es una herramienta muy sensible pero poco específica, y por ello es importante contar con valores de referencia (Samour *et al.*, 2016). Hasta el momento, este es el primer trabajo en reportar valores hematológicos para el tordo músico, aportando herramientas para la evaluación de la salud de las poblaciones silvestres. En general, los valores del grupo Control se encontraron dentro de los límites reportados para otras

especies de aves (Campbell, 2015; Clark et al., 2009; Samour et al., 2016). Por su parte, las aves tratadas con IMI exhibieron alteraciones en los valores de RE, HTC, y Hb, y en los índices eritrocitarios derivados de esos valores (Tabla 3.1 y 3.2). En general se observó un incremento transitorio de estos valores entre las 4 y las 24 horas desde la administración del IMI; coincidiendo con los momentos de mayor concentración de IMI en los tejidos. Estos resultados son coherentes con un cuadro de policitemia relativa (Tabla 3.1: incremento transitorio de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito) y coincide con el diagnóstico de una deshidratación momentánea, probablemente debida al malestar general (Campbell, 2015). Existe escasa bibliografía sobre la respuesta de los parámetros hematológicos a dosis subagudas de IMI (Kataria *et al.*, 2016). En estudios de toxicidad crónica, Lopez-Antia *et al.* (2013) reporta una disminución en el HTC en perdicés luego de 10 días de exposición a IMI; mientras que Siddiqui, (2004), Balani *et al.* (2011), y Sasidhar *et al.* (2014) no reportan cambios en los parámetros hematológicos luego de la administración de IMI por 28 días a gallinas, a excepción de un incremento en el recuento leucocitario, indicó una respuesta inmune.

Por el contrario, existe numerosa bibliografía que reporta el efecto del IMI sobre el ADN en el corto plazo, en peces (Ge *et al.*, 2015; Iturburu *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2018), anfibios (Feng *et al.*, 2004; Pérez-Iglesias *et al.*, 2014; Ruiz De Arcaute *et al.*, 2014) y mamíferos (Feng *et al.*, 2005; Kataria *et al.*, 2016). En el presente trabajo, los biomarcadores de genotoxicidad evaluados no indicaron diferencias significativas entre los individuos tratados con IMI y el grupo control (Figura 3.2 y tabla 3.3). Los resultados obtenidos coinciden con los observados por Bean *et al.* (2019), que no detectaron daño oxidativo del ADN (concentración de 8-OHdG, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina) en sangre, hígado y cerebro de codornices, luego de 1, 4 y 24 horas desde la administración del IMI. En las aves, la posible formación de MNs depende de la proliferación de las células sanguíneas, que tarda entre 25 y 45 días (Scanes, 2014), y la tasa de recambio diario de células no supera el 3% (Glomski y Pica, 2016). Si se considera que que existe una frecuencia basal de MNs en las aves silvestres (Zúñiga-González *et al.*, 2000; Baesse *et al.*, 2015; Quero *et al.*, 2016), es posible que el tiempo transcurrido desde la administración del IMI no haya sido suficiente para detectar cambios en la frecuencia de MNs entre las aves tratadas y el grupo control (Wolf *et al.*, 2002). En futuras investigaciones, una alternativa para evaluar el efecto genotóxico del IMI en el corto plazo, sería evaluar las células de la médula ósea, ya que es el órgano dónde se generan

las células sanguíneas, y en donde se esperarí una respuesta más rápida (Alimba y Bakare, 2016; Olayemi y Jagun, 2014).

La variación de las colinesterasas por efecto del IMI ha sido previamente reportada en hígado, plasma y cerebro de gallinas, palomas y ratas; tanto en experimentos crónicos como agudos (Abu Zeid *et al.*, 2019; Kapoor *et al.*, 2014; Lonare *et al.*, 2014; Vohra *et al.*, 2014). En el presente trabajo, solo las ChE presentes en el músculo presentaron una disminución en su actividad respecto al grupo control. En el músculo, las ChE provienen de los nervios de la placa motora, por lo que la disminución de su actividad podría estar relacionada con la alteración del sistema nervioso (Nassar, 2016). Por otro lado, Rawi *et al.*, (2019) no detecta variación en la actividad de las ChE en plasma hasta luego de las 72 horas de administrado el IMI, por lo que es posible que la duración del experimento no haya sido suficiente para detectar cambios en la actividad enzimática de las ChE en el resto de los tejidos.

De manera similar, la actividad de la GST disminuyó en el cerebro, músculo y plasma de los individuos tratados con IMI respecto a los individuos del grupo control. En los animales químicamente estresados, tanto el aumento como la disminución de la actividad de la GST son posibles, dependiendo del tipo de la sustancia química, de la dosis y del tiempo de exposición (Drobne *et al.*, 2008). En este caso es posible que el estrés oxidativo provocado por el IMI haya causado la inhibición de la enzima GST disminuyendo su actividad luego de la exposición (Brodeur *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018). Resultados similares fueron observados en ratas administradas con IMI donde la actividad de la GST se recuperó luego de la administración de curcumina, un extracto vegetal considerado antioxidante (Lonare *et al.*, 2014). En base a los resultados obtenidos, la determinación de la actividad de la GST sería un potencial biomarcador inespecífico de efecto, especialmente teniendo en cuenta que el efecto sobre la actividad enzimática perduró aun cuando el IMI había sido eliminado del organismo (48 horas), lo cual representa una ventaja para el monitoreo de aves en el campo.

Los experimentos realizados en este trabajo demostraron que, en el tordo músico, el IMI es rápidamente absorbido, distribuido por el plasma a los riñones y al hígado y, consecutivamente, eliminado dentro de las 48 horas. Durante este periodo, la actividad enzimática en respuesta al IMI en tejidos como músculo y cerebro, indicó que el IMI se distribuyó también hacia esos órganos como fue reportado en gallinas y codornices (Bean

*et al.*, 2019; Roy *et al.*, 2020). El presente trabajo resalta la utilidad de dos biomarcadores para la evaluación de la exposición al IMI en las aves: la detección del IMI en plasma y la actividad de la enzima GST. La detección de IMI en el plasma indicaría una exposición reciente (dentro de las 48 horas) o repetida a IMI, mientras que la alteración de la enzima GST indicaría un efecto inespecífico sobre el individuo.

Finalmente, la rápida aparición de efectos comportamentales asociados a la alteración del sistema nervioso resalta la importancia de realizar un estudio más exhaustivo de los efectos del IMI sobre el comportamiento, del cual podrían surgir nuevos indicadores del efecto del IMI en las aves paseriformes.

Considerando que las aves de los ambientes agrícolas se encuentran amenazadas por la expansión de la agricultura y el uso de plaguicidas, la detección temprana de la exposición es de vital importancia, ya que no solo afecta la salud de un individuo, sino que podría tener consecuencias a nivel poblacional afectando la supervivencia o la reproducción de las aves. En este contexto el presente trabajo aporta información sobre los efectos biológicos asociados a la distribución del IMI y en un ave paseriforme, y propone la detección del IMI en plasma y la actividad de la enzima GST como biomarcadores para la detección de casos de exposición subaguda al IMI, al aportar herramientas para la conservación de las aves silvestres.

## **4. CAPÍTULO 3. Caracterización de la respuesta fisiológica y comportamental al consumo de semillas tratadas con el insecticida imidacloprid en el tordo músico (*Agelaioides badius*).**

### **4.1. INTRODUCCIÓN**

Los insecticidas neonicotinoides surgieron en la década del 90 como respuesta ante la creciente resistencia de las plagas a los insecticidas organoclorados y organofosforados (Goulson, 2013). Debido sus propiedades sistémicas, los neonicotinoides fueron adoptados para el tratamiento de las semillas de los grandes cultivos extensivos como soja, maíz, girasol, y trigo, entre otros. Rápidamente, los neonicotinoides se posicionaron entre los insecticidas más vendidos en el mercado mundial (Jeschke *et al.*, 2011; Bass *et al.*, 2015). Si bien el tratamiento de semillas elimina la necesidad de fumigar sobre grandes superficies, en los últimos años, el uso global de los neonicotinoides ha contribuido a su dispersión en el ambiente (Wood y Goulson, 2017). Cuando las semillas tratadas con neonicotinoides son sembradas, solo una pequeña fracción (~5%) del ingrediente activo permanece en la semilla y se trasloca a los tejidos de la planta en crecimiento, mientras que el resto pasa al ambiente circundante (Sur and Stork, 2003; Radolinski *et al.*, 2018). Así se ha detectado la presencia de neonicotinoides en el suelo (Bonmatin *et al.*, 2005, 2014; Schaafsma *et al.*, 2015; Limay-Rios *et al.*, 2016), y en los cuerpos de agua cercanos a los campos de cultivo, (Hladik *et al.*, 2014; Anderson *et al.*, 2015; Morrissey *et al.*, 2015; Humann-Guillemint *et al.*, 2019). Incluso la vegetación silvestre presente en los campos de cultivo es capaz de acumular neonicotinoides del suelo a través de las raíces y traslocarlos al polen y néctar de las flores (Greatti *et al.*, 2006; Krupke *et al.*, 2012; Botías *et al.*, 2015).

Actualmente, es un tema de preocupación que los organismos no blanco que habitan las zonas aledañas a los cultivos, se encuentren afectados por la presencia de los neonicotinoides en el ambiente (Pisa *et al.*, 2017). El modo de acción por el cual los neonicotinoides controlan a los insectos plaga, es a través de la unión a los receptores nicotínicos post sinápticos, causándoles parálisis y muerte. Diferencias en la composición de los receptores y de su localización en el sistema nervioso, hacen que los insectos sean más sensibles al efecto de los neonicotinoides que los vertebrados (Tomizawa y Casida, 2005). Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado la presencia de efectos

perjudiciales de los neonicotinoides sobre los vertebrados, y en especial en las aves (Mineau y Palmer, 2013; Gibbons *et al.*, 2015).

Las aves se encuentran expuestas a los neonicotinoides directamente a través del consumo de semillas tratadas que quedan disponibles en los lotes de cultivo. La exposición resulta de dos fenómenos: Por un lado, los derrames de semillas desde las maquinas sembradoras son comunes y dejan pequeñas acumulaciones de semillas en el terreno. A su vez, luego de la siembra, algunas semillas no son enterradas, y quedan en la superficie con mayor abundancia en los bordes de cultivo (de Snoo y Luttik, 2004; Lopez-Antia *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2019; Lennon *et al.*, 2020). La disponibilidad de semillas tratadas en los bordes del cultivo aumenta el riesgo de exposición, ya que muchas aves utilizan los bordes como refugio o sitio de nidificación y suelen alimentarse en los límites del cultivo (Giacomo y Casenave, 2010).

En este contexto, el peor escenario para las aves ocurre cuando la exposición a los neonicotinoides es suficiente para alcanzar la mortalidad, como ya se ha reportado para varias especies en distintos lugares del mundo (Berny *et al.*, 1999; Millot *et al.*, 2017; Botha *et al.*, 2018). Sin embargo, en un escenario menos drástico, aunque la cantidad ingerida de neonicotinoides no sea letal, pueden desencadenarse una serie de efectos subletales fisiológicos que afectan la salud, la supervivencia y la reproducción de las aves en el ambiente, (Gibbons *et al.*, 2015; Pisa *et al.*, 2017). Las recientes detecciones de neonicotinoides en aves de distintos grupos tróficos (Taliensky-Chamudis *et al.*, 2017; Bishop *et al.*, 2018, 2020; Byholm *et al.*, 2018; Hao *et al.*, 2018; MacDonald *et al.*, 2018; Graves *et al.*, 2019; Humann-Guillemot *et al.*, 2019b; Lennon *et al.*, 2020), indica que en la actualidad las aves se encuentran expuestas a dosis subletales de neonicotinoides en distintas partes del mundo.

El IMI imidacloprid (IMI) es el primer neonicotinoide comercializado y es el más tóxico para las aves (Jeschke *et al.*, 2011; Addy-Orduna *et al.*, 2019). Los efectos subletales de la ingesta del IMI en las aves son numerosos e implican alteraciones bioquímicas, inmunológicas, fisiológicas y reproductivas, entre otras (Revisado por Pisa *et al.*, 2017 y Wang *et al.*, 2018). Efectivamente, se han reportado alteraciones del sistema inmunológico en gallinas y perdicés tratadas con IMI (Balani *et al.*, 2011; Lopez-Antia *et al.*, 2013), así como alteraciones bioquímicas y estrés oxidativo (Siddiqui *et al.*, 2007; Kammon *et al.*, 2010; Balani *et al.*, 2011; Badgujar *et al.*, 2013; Sasidhar *et al.*, 2014;

Gupta *et al.*, 2017). Estudios realizados en machos silvestres de bengalí rojo expuestos a IMI, reportaron alteraciones del sistema endócrino y efectos en el desarrollo de caracteres sexuales secundarios (Mohanty *et al.*, 2017; Pandey *et al.*, 2017). Finalmente, gallinas y perdices expuestas a IMI presentaron disminuciones en la tasa de fertilidad, en el tamaño de los huevos y hasta retraso en el crecimiento de los embriones (Lopez-Antia *et al.*, 2015, 2013; Hussein y Singh, 2016; Gobeli *et al.*, 2017). Dentro de los efectos del IMI en las aves, se incluyen anormalidades comportamentales asociadas a alteraciones del sistema nervioso como falta de reacción, hipersensibilidad, temblores, desorientación y retraso en la migración (Addy-Orduna *et al.*, 2019; Eng *et al.*, 2017, 2019; Franzen-Klein *et al.*, 2020).

En los capítulos previos de esta tesis, se demostró que existe un alto riesgo de que las aves paseriformes que habitan las zonas cultivadas de la región Pampeana de Argentina, puedan ingerir tanto una dosis letal, como una dosis subletal de IMI a través del consumo de semillas tratadas. En el Capítulo 1 se caracterizó el efecto agudo del IMI utilizando como modelo experimental al tordo músico (*Agelaioides badius*) (Brodeur y Poliserpi, 2017); y se evaluó el riesgo de que las aves paseriformes alcancen la letalidad al alimentarse de semillas tratadas con IMI (Poliserpi, *et al.*, 2020). En el Capítulo 2, se caracterizaron los efectos subletales que ocurren inmediatamente luego de la administración forzada de una dosis subletal de IMI. En este tercer capítulo, el objetivo es caracterizar los efectos subletales del IMI en las aves paseriformes en un escenario más realista: a través del consumo de semillas tratadas. Previamente, se observó que los individuos que habían sido alimentados con semillas tratadas con una dosis de referencia de 3 g IMI/ kg de semillas, murieron rápidamente (Cap. 1). Los objetivos específicos de este trabajo fueron: 1) evaluar el consumo diario de semillas tratadas con IMI ofrecidas *ad libitum* a aves en condiciones de cautiverio; 2) caracterizar el efecto de la ingesta de una dosis subletal de IMI sobre el comportamiento de las aves; 3) caracterizar los efectos biológicos inducidos por la ingesta de IMI, mediante la determinación de una serie de parámetros hematológicos, bioquímicos y genéticos; 4) identificar potenciales biomarcadores para el reconocimiento de la exposición subletal de las aves al IMI en condiciones de campo.

## 4.2. METODOLOGÍA

### 4.2.1. Tratamientos experimentales y preparación de las semillas

Las semillas fueron tratadas con el producto comercial Confidor® OD (Bayer) que contiene 20% de imidacloprid (N-[1-[(6-Chloro-3-pyridyl)methyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl]nitramida, CAS. Nro. 13826-41-3) suspendido en una mezcla patentada de surfactantes, emulsionantes y aditivos de composición reservada. Los tratamientos experimentales fueron definidos de la siguiente manera: primero se calculó el promedio de las distintas concentraciones de uso recomendadas en Argentina (SENASA, 2020) para el tratamiento de las semillas de distintos cultivos de granos comunes en la región pampeana (avena, trigo, soja, girasol, maíz, sorgo y alfalfa) (Tabla 4.1). De esta manera, se definió que, en la práctica, se utiliza una concentración promedio de 2,8 g de IMI/ kg semilla (sem.) para el tratamiento de semillas. En el Capítulo 1 de esta tesis se expusieron a tres tordos músicos a semillas tratadas con 3 g de IMI/ kg sem y todos alcanzaron la mortalidad entre los tres y los cinco días. En base a estos resultados, se definió utilizar dos concentraciones experimentales de 0,075 y 0,45 g IMI/kg sem. que corresponden respectivamente al 2,5 % y el 15% de la concentración promedio de 3 g de IMI/ kg sem.

De acuerdo con las instrucciones de uso del formulado comercial, la solución para preparar las semillas con la concentración baja se preparó diluyendo 420 µL de Confidor OD® en 40,5 mL de agua destilada. Esta solución fue luego asperjada sobre 1200 g de semillas de mijo pelado, para obtener semillas de mijo tratadas con una concentración de 0,075 g IMI/kg sem. Por su parte, la solución para preparar las semillas con la concentración más alta se preparó diluyendo 1,8 mL de Confidor OD® en 39 mL de agua destilada, los cuales fueron asperjados sobre 1200 g de semillas de mijo pelado, para obtener semillas de mijo tratadas con una dosis de 0,45 g IMI/kg sem. Las semillas tratadas fueron secadas a temperatura ambiente durante un día antes de ser fraccionadas. Se separaron alícuotas de 15 g que fueron almacenadas a -20°C hasta su uso en los días siguientes. El día anterior a ser usadas, las semillas tratadas fueron descongeladas y almacenadas a 4° C. Dos alícuotas de 10 g, de cada tratamiento, fueron separadas y almacenadas a -20°C para ser usados en la confirmación analítica de la concentración de IMI presente en las semillas.



**Tabla 4.1.** Rango y promedio de concentraciones de IMI aprobadas para el tratamiento de semillas de los distintos cultivos de la Región Pampeana.<sup>a</sup>

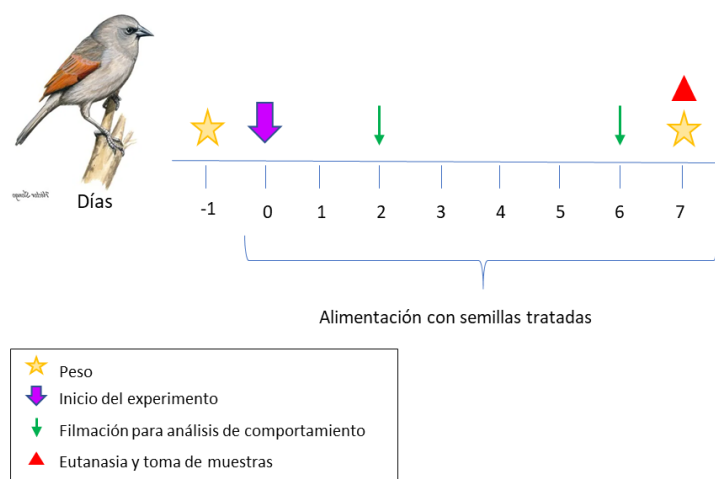
Cultivo	Rango de aplicación (g IMI/kg sem.)	Promedio de aplicación (g IMI/kg sem.)
<i>Alfalfa</i>	4,30 - 3,00	3,50
<i>Avena</i>	1,05 - 1,50	1,28
<i>Girasol</i>	3,00 - 5,00	4,00
<i>Maíz</i>	3,00 - 6,40	4,70
<i>Soja</i>	0,30 - 0,42	0,36
<i>Sorgo</i>	4,50 - 640	5,45
<i>Trigo</i>	0,36 - 0,85	0,61
<b>Total</b>	<b>0,30 - 6,40</b>	<b>2,84</b>

<sup>a</sup>(SENASA, 2020)

#### 4.2.2. Diseño experimental

La captura y el mantenimiento de los tordos músicos (*Agelaioides badius*) en el laboratorio se realizó de acuerdo a la metodología detallada en el Capítulo 1 de esta tesis. Tordos músicos adultos fueron alimentados durante siete días con semillas de mijo tratadas con IMI (Figura 4.1). El día anterior al comienzo del experimento, cada tordo fue colocado en una bolsa de algodón y pesado con una balanza de resorte (Pesola®) con una exactitud de  $\pm 1$  g; y a última hora del día se les retiró la comida de las jaulas. Las aves fueron asignadas al azar a los siguientes tratamientos: Control: 0 mg IMI/kg de semilla (N=9), Tratamiento 1 (T1): 0,075 g IMI/kg sem. (N=10), y Tratamiento 2 (T2): 0,45 g IMI/kg sem. (N=10). Todas las mañanas entre las 9 y 11 horas se colocaron 15 g de semillas tratadas con IMI y al día siguiente, a la misma hora, se recolectaron las semillas que quedaban en el comedero y en la base de la jaula. El comportamiento de los tordos músicos dentro de la jaula fue evaluado los días 2 y 6 del experimento. En estos días, la totalidad de los individuos de cada grupo fueron filmados durante 9 minutos entre las

11:00 y las 15:00 horas. Las filmaciones se realizaron luego del recambio de alimento diario y, de manera de disminuir el disturbio, se esperaron al menos 5 minutos desde que el personal saliera del laboratorio para comenzar a filmar. Para evitar generar un sesgo, los individuos fueron filmados en un orden aleatorio, sin considerar el tratamiento que recibían. Durante todo el experimento, se evaluó diariamente la supervivencia de las aves. El último día de la exposición, las aves fueron pesadas con el mismo procedimiento que se utilizó al principio del ensayo. Se calculó la variación del peso corporal (pc) de cada individuo, como la diferencia entre el peso inicial y el peso final expresado en términos de porcentaje de variación respecto del peso inicial. Luego de siete días de exposición, las aves fueron eutanasiadas en una cámara de dióxido de carbono y decapitadas, de acuerdo con las guías de bienestar animal (Fair *et al.*, 2010). La manipulación de las aves y los protocolos de trabajo fueron aprobados por el comité institucional de cuidado animal (CICUAE- INTA permiso #32/ 2017).



**Figura 4.1.** Esquema del diseño experimental.

#### 4.2.3. Consumo diario y estimación de la dosis ingerida

El consumo diario (CD) de cada ave se estimó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$CD = (10 \text{ g} - \text{sem.jaula}) * 1000 / pc$$

Donde:

10 g: cantidad de semillas ofrecidas diariamente.

*sem.jaula*: semillas que quedaron en la jaula luego de 24 horas.

*pc*: peso corporal promedio.

El consumo diario se expresó como g de sem./ kg pc. A partir de las concentraciones analíticas de IMI en las semillas y del consumo diario, se calculó para cada individuo la dosis diaria de IMI ingerida de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Dosis\ Diaria = (CD * conc.) / 1000$$

Donde:

*CD*: consumo diario de semillas (g sem./kg pc).

*Conc.*: concentración nominal de IMI de las semillas de cada tratamiento.

La dosis diaria se expresó como mg IMI/ kg pc.

#### **4.2.4. Comportamiento**

Para cada individuo, los 9 min de filmación fueron clasificados según el sector de la jaula en el cual se encontraba. Los videos se analizaron con el programa ANY-maze Behavioural Tracking Software y se registró el tiempo en segundos que cada tordo permaneció en: 1) la percha: el ave estaba en la percha o perchado en los barrotes de la jaula, 2) el piso: el ave se encontraba en el piso, y 3) el comedero: el ave estaba posada en el comedero con la cabeza adentro del comedero (Figura 4.2). A partir de los registros obtenidos, se calcularon tres parámetros: el porcentaje del tiempo total que las aves permanecieron en 1) la percha, 2) el piso o 3) el comedero.



**Figura 4.2.** Jaula experimental donde se realizaron las filmaciones.

#### **4.2.5. Toma de muestras**

Luego de la eutanasia, se colectó sangre mediante punción cardíaca utilizando una aguja 25 G acoplada a una jeringa de 1 mL heparinizada. Dos alícuotas de sangre de 10  $\mu$ L fueron diluidas 1:200 en la solución de Natt Herrick para realizar el recuento de eritrocitos. Para la determinación de hemoglobina, otras dos alícuotas de 10  $\mu$ L de sangre fueron diluidas 1:200 en la solución de Drabkin que contiene ferrocianuro y cianuro potásicos (Biopur, Rosario, Argentina). Además, con otra porción de la sangre recolectada, se llenaron dos capilares heparinizados para estimar el hematocrito y se realizaron dos frotis por ave para realizar el recuento total y diferencial de leucocitos, de micronúcleos, células binucleadas y el grado de policromasia. Cada frotis se dejó secar al aire libre, se fijó con metanol y se tiñó con la solución de Wright-Giemsa (solución comercial Biopack®) (Clark, 2009). La sangre restante fue centrifugada a 10.000g por 5 minutos y el plasma fue separado y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis. Finalmente, se extrajo y pesó el hígado para calcular el índice hepatosomático (IHS) como el peso del hígado/peso corporal. En base a la observación de las gónadas se registró el sexo de los individuos y se tomaron muestras de cerebro, hígado, riñón y músculo del pecho y de la pata, que fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis bioquímico.

#### **4.2.6. Parámetros hematológicos**

El recuento de eritrocitos (RE), hematocrito, hemoglobina, y sus índices derivados, el recuento total y diferencial de leucocitos, y el grado de policromasia, se realizaron de acuerdo a la metodología detallada en el Capítulo 2 de esta tesis.

#### **4.2.7. Genotoxicidad**

A partir de los frotis sanguíneos se evaluaron la frecuencia de micronúcleos (MN) y de células binucleadas (BN) como indicadores de genotoxicidad. La frecuencia de MN se calculó contando el número de MN de un total de 8000 eritrocitos maduros examinados a 1000X; y se expresó como número de MN /1000 células. Finalmente se contó el número de células binucleadas (BN) de un total de 8000 eritrocitos examinados a 1000X. Las BN se registraron cuando se observaron dos núcleos de igual tamaño e intensidad de tinción, con o sin contacto entre ellos (Quero *et al.*, 2016). El número de BN se expresó cada 1000 eritrocitos.

#### **4.2.8. Actividad enzimática y daño oxidativo**

Las actividades enzimáticas de las colinesterasas (ChE), la catalasa (CAT) y la glutatión-S-transferasa (GST) fueron determinadas en hígado, músculo, cerebro, riñón y plasma; siguiendo los protocolos de Brodeur *et al.* (2011, 2012, 2017), como fue detallado en el Capítulo 2 de esta tesis.

El grado de peroxidación lipídica (LPO) en los tejidos fue medido mediante la cuantificación de malonaldehído (MDA), el principal producto de la peroxidación, según el método de Buege y Aust (1978). El MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA), y forma un complejo color rosado MDA-TBA que tiene absorbancia a 535 nm. La concentración de MDA se estimó utilizando un coeficiente de extinción de  $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y los resultados fueron expresados como  $\mu\text{mol MDA}/ \text{mg proteína}$ .

#### **4.2.9. Determinación analítica de IMI en las semillas**

La concentración en IMI de las semillas tratadas con Confidor OD® fue verificada analíticamente, extrayendo su contenido de IMI según el siguiente procedimiento: Se dejó en un baño ultrasónico por 30 minutos 1,0 g de semillas tratadas inmerso en una mezcla de 1 mL de agua destilada y 10 mL de acetonitrilo conteniendo 1% de ácido acético, 0,5 g de acetato de sodio y 2 g de sulfato de magnesio. Luego, se centrifugó la solución a 3500 rpm por 10 minutos. Se tomó 1 mL del sobrenadante que fue disuelto en 1 mL de agua de grado-HPLC en un tubo de vidrio, y la solución resultante fue filtrada con una membrana de nylon de 0,22 µm. Los análisis se realizaron inyectando 20 µL de la solución final. La curva de calibración se realizó fortificando semillas sin tratar con distintas concentraciones de una solución estándar de IMI (PESTANAL® (Merck, Alemania), y sometidas al proceso de extracción descrito anteriormente.

La concentración de imidacloprid fue determinada mediante Cromatografía Líquida de Ultra-Resolución/Espectrometría de Masas (UPLC-ESI-MS/MS). Se utilizó una columna Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm, 100 x 2,1 mm), Waters™. Las fases móviles fueron agua (fase A) y metanol (fase B), ambas modificadas con acetato de amonio 0,1 mM and 0,01% ácido fórmico. El flujo de la columna fue de 0.2 mL min<sup>-1</sup> y el gradiente de elución, con el porcentaje de cambio de la fase B, fue el siguiente: 0 min, 0%; 0,5 min, 0%; 3,5 min, 100%; 4,5 min, 100%; 5,0 min, 0%; and 6 min, 0%. La temperatura de la columna se mantuvo constante a 35°C.

Para la detección MS/MS, se utilizó el modo de ionización positivo con un voltaje del capilar de 3,5 kV. El gas de colisión utilizado fue Argón 99.995% con una presión de 4,04×10<sup>-3</sup> mbar en la celda T-Wave. El flujo de gas del cono y de desolvatación fueron optimizados a 60 L h<sup>-1</sup> y 600 L h<sup>-1</sup>, respectivamente. La temperatura del gas de desolvatación fue 400° C, y la temperatura de la fuente 120° C. El escaneo se realizó con una frecuencia de 0,1 segundos. Para procesar los datos obtenidos fueron analizados con el software Masslynx NT v 4.1 (Waters™). Los límites de detección y cuantificación fueron 0,006 y 0.01 µg/g, respectivamente.

#### **4.2.10. Análisis estadístico**

Las variables evaluadas más de una vez sobre el mismo individuo en el tiempo, como el consumo de semillas y los parámetros de comportamiento, fueron comparadas

entre tratamientos y entre días mediante un análisis de ANOVA de dos vías de medidas repetidas (RM), luego de corroborar los supuestos de normalidad y esfericidad de los datos. Para algunas variables, fue necesario transformarlas para que cumplieran con los supuestos. Las transformaciones empleadas incluyeron: raíz cuadrada (porcentaje de tiempo en el comedero),  $\log(x + 1)$  (tiempo de permanencia en el piso, en la percha y en el comedero).

La variación del peso corporal, los parámetros hematológicos, de genotoxicidad, enzimáticos, y de daño oxidativo fueron comparados entre tratamientos mediante una ANOVA de una vía luego de controlar que se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedacea de los datos. Algunos parámetros fueron transformados de la siguiente manera para que cumplieran con los supuestos:  $1/x$  (MCV, MCH y proteínas cerebro);  $\cos x$  (MDA cerebro), y raíz cuadrada (MN, BN, Eosinófilos, Basófilos, y GST cerebro). El IHS se evaluó mediante una ANOVA de dos vías comparando entre tratamientos y por sexo. En ambos análisis de ANOVA, cuando se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos se realizó una prueba de contraste de Holm-Sidack para identificar cuáles eran los grupos que diferían.

Para evaluar si existía una relación entre la dosis y la respuesta de los parámetros comportamentales, hematológicos, bioquímicos, y genotóxicos, se realizó una correlación de Pearson con la dosis promedio de IMI ingerida durante el periodo de exposición. En los análisis de correlación se utilizaron los datos combinados de las aves de todos los tratamientos, incluidos los del grupo control. En todos los casos el valor de significancia fue  $p < 0,05$ . Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software SigmaStat (SPSS, Chicago, IL, USA).

## **4.3. RESULTADOS**

### **4.3.1. Contenido de IMI en las semillas**

La concentración analítica del T1 (promedio  $\pm$  E.E.) fue de  $0,088 \pm 0,022$  g IMI/ kg sem., y correspondió al 117,3% del valor nominal (0,075 g IMI/ kg sem.). Por su parte, la concentración analítica del T2 (promedio  $\pm$  E.E.) fue de  $0,39 \pm 0,023$  g IMI/ kg sem., y correspondió al 86,7% del valor nominal (0,45 g IMI/ kg sem.). Debido a que la

diferencia entre las concentraciones nominales y analíticas de IMI fue menor al 20%, para todos los cálculos se utilizaron las concentraciones nominales (USEPA, 2012).

#### **4.3.2. Consumo diario de semillas y dosis ingeridas**

En total se evaluaron 13 hembras y 18 machos. El peso promedio inicial de los individuos (promedio  $\pm$  D.E.) fue de  $38,21 \pm 3,42$  g, y no se observaron diferencias en el peso inicial de los distintos tratamientos, ni entre machos y hembras

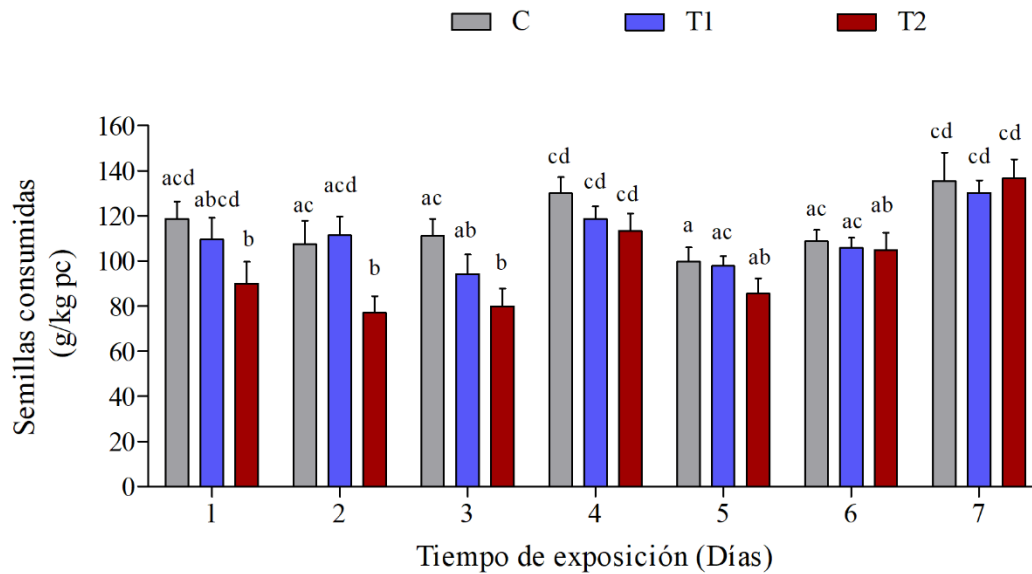
La Tabla 4.2 presenta el promedio de la dosis diaria de IMI ingerida por las aves de cada tratamiento, así como la dosis acumulada durante los siete días de exposición. Los individuos de los tratamientos 1 y 2, ingirieron respectivamente cada día un promedio de  $9,76 \pm 0,412$ , y  $38,23 \pm 3,16$  mg IMI/kg pc (promedio  $\pm$  E.E). Estas dosis diarias representando respectivamente el 17,1 y el 66,9% de la DL50 de 57,11 mg IMI/kg pc calculada en el Capítulo 1 (Poliserpi et al., 2021). Un individuo del grupo T2 murió luego de tres días de exposición, siendo su consumo total de semillas tratadas de 8,06 g, lo que equivale a una dosis total de 100 mg IMI/kg pc (175% DL50).



**Tabla 4.2.** Dosis diaria ingerida y dosis acumulada en el tiempo (promedio  $\pm$  E.E) en *Agelaioides badius* expuestos a semillas tratadas con IMI. Tratamiento 1: 0,075 g IMI/ kg semillas, Tratamiento 2: 0,45 g IMI/ kg semillas.

	Dosis diaria (mg IMI/kg pc)	Dosis acumulada (mg IMI/kg pc)
<i>Tratamiento 1</i>		
Día 1	8,12 $\pm$ 0,731	8,12 $\pm$ 0,731
Día 2	8,36 $\pm$ 0,625	16,6 $\pm$ 1,31
Día 3	7,01 $\pm$ 0,643	23,7 $\pm$ 1,79
Día 4	8,90 $\pm$ 0,407	32,6 $\pm$ 2,14
Día 5	7,33 $\pm$ 0,332	39,9 $\pm$ 2,38
Día 6	7,94 $\pm$ 0,334	47,8 $\pm$ 2,60
Día 7	9,77 $\pm$ 0,418	57,6 $\pm$ 2,96
<i>Tratamiento 2</i>		
Día 1	40,6 $\pm$ 3,81	40,6 $\pm$ 3,81
Día 2	34,1 $\pm$ 2,91	74,7 $\pm$ 5,03
Día 3	34,6 $\pm$ 3,88	109,4 $\pm$ 6,20
Día 4	51,0 $\pm$ 5,50	162,1 $\pm$ 8,25
Día 5	38,5 $\pm$ 4,53	200,7 $\pm$ 10,2
Día 6	47,2 $\pm$ 4,99	247,9 $\pm$ 12,8
Día 7	61,6 $\pm$ 6,15	309,5 $\pm$ 14,4

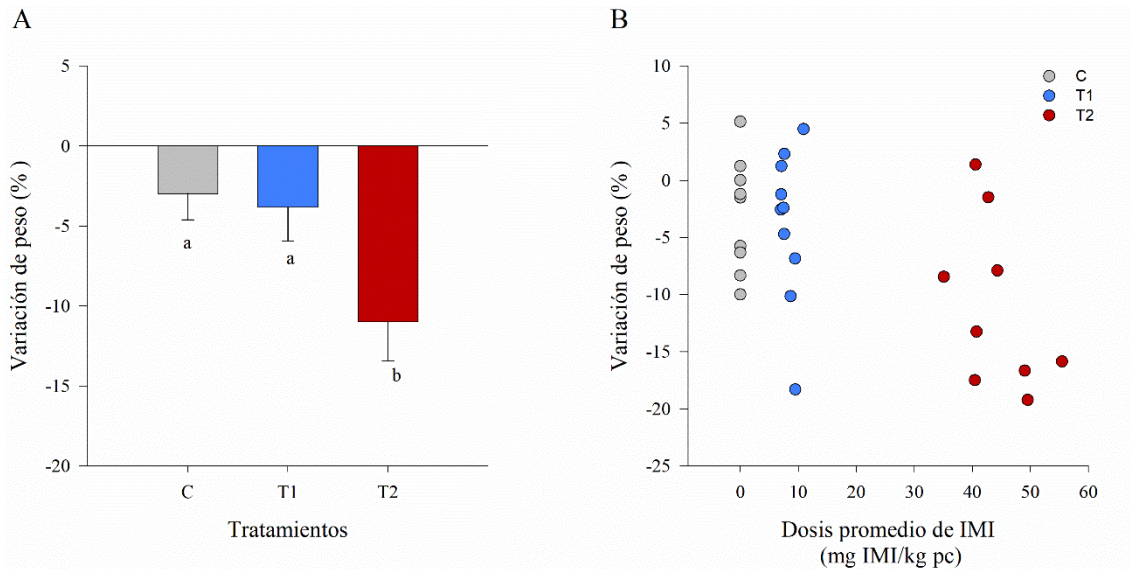
El consumo diario de semillas tratadas (promedio  $\pm$  E.E.), fue de 116,0  $\pm$  3,36 g; 109,7,0  $\pm$  2,86 g y 98,3  $\pm$  3,81 g semillas/ kg pc para los grupos control, T1 y T2 respectivamente. La Figura 4.3 ilustra el consumo diario de semillas tratadas de cada grupo experimental. De manera general, se observó una oscilación en el consumo de semillas a lo largo del experimento, donde los días cuatro y siete fueron los de mayor consumo para todos los grupos. Durante los primeros tres días, los individuos del grupo T2 consumieron significativamente menos semillas que los del grupo control (Figura 4.3). Sin embargo, se observó que el consumo de las aves del grupo T2 aumentó gradualmente con el tiempo, pasando de representar el 69% del consumo del grupo control el primer día, hasta normalizarse y ser igual al consumo de los controles en el último día del ensayo. Por otro lado, el grupo de individuos expuestos al T1 no presentó diferencias significativas en el consumo respecto al grupo control ( $p > 0,05$ ).



**Figura 4.3.** Consumo diario (promedio  $\pm$  E.E) del tordo músico (*Agelaioides badius*) expuestos a semillas de mijo tratadas con IMI. C: control; T1: 0,075 g IMI/ kg sem.; T2: 0,45 g IMI/ kg sem. Letras diferentes indican diferencias significativas.

#### 4.3.3. Peso corporal

La Figura 4.4 muestra la variación de peso observada en las aves de cada tratamiento respecto a su peso inicial, luego de 7 días de exposición. Si bien se observó una disminución en el peso de las aves de todos los grupos, esta disminución fue significativamente mayor para los individuos del T2 (Figura 4.4A), que presentaron una disminución de peso del 11% en comparación a una variación del 2,97 y 3,82% para los grupos control y T1, respectivamente. Sin embargo, se observó una correlación negativa significativa entre la pérdida de peso y la dosis ingerida ( $r = -0,548$ ,  $p=0,00256$ ,  $N=28$ ) (Figura 4.4B). Respecto al IHS, no se observaron diferencias significativas entre sexos ni entre tratamientos (total  $df = 27$ ; tratamiento  $p= 0,243$ ; sexo  $p= 0,538$ ; interacción  $p= 0,225$ , datos no ilustrados).



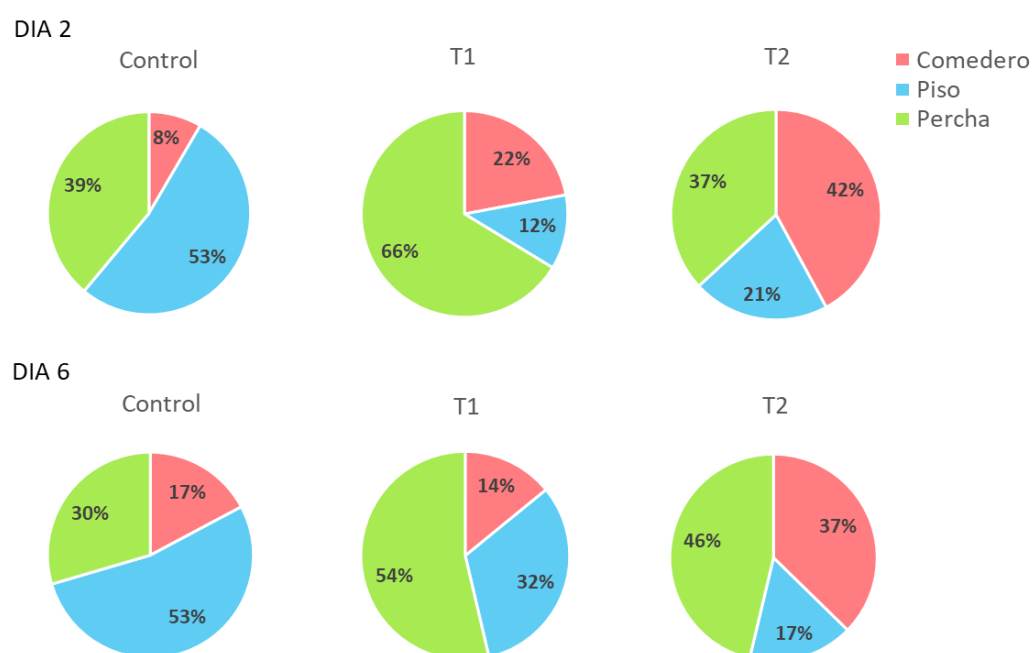
**Figura 4.4.** Variación de peso corporal del tordo músico (*Agelaioides badius*) luego de siete días de exposición a semillas de mijo tratadas con IMI. A) Variación de peso corporal por tratamiento (promedio  $\pm$  E.E), B) Variación de peso corporal individual en función de la dosis diaria promedio ingerida. C: control, T1: 0,075 g IMI/ kg sem., T2: 0,45 g IMI/ kg sem. Letras diferentes indican diferencias significativas.

#### 4.3.4. Comportamiento

Durante las primeras 48 horas, varias de las aves tratadas con la dosis más alta presentaron plumas erizadas y ojos entrecerrados, mientras que entre los individuos tratados con la dosis baja y el grupo control, no se observaron alteraciones en el aspecto. Pasadas las 48 horas, no se observaron diferencias en el aspecto de las aves entre los tratamientos, excepto por algunos individuos del grupo T2 que presentaron ocasionalmente las plumas erizadas. Diariamente, cuando ocurría el recambio de alimento, siempre se observó que todos los individuos se dirigían rápidamente hacia el comedero a comer, aun cuando antes del recambio les quedaba comida en el comedero.

La Figura 4.5 representa las variables comportamentales analizadas para cada tratamiento durante la exposición a las semillas tratadas. De manera general, siempre que las aves se encontraban en el piso, se observaban activas: tomando agua, caminando y picoteando el papel colocado en la base de la jaula, en un comportamiento exploratorio. Cuando se encontraban en la percha, los tordos presentaban menor movilidad que cuando en el piso; permanecían inmóvil en la percha, acomodaban las plumas con el pico

(acicalamiento); se desplazaban un poco a lo largo de la percha o realizaban saltos pequeños entre los barrotes de la jaula y la percha. Finalmente, cada vez que se encontraron en el comedero, se observó a las aves perchadas en el comedero, comiendo las semillas. La alimentación de los tordos implicó movimientos alternados entre, inclinar el torso adentro del comedero para tomar las semillas, y erguirse mientras manipulaban la semilla y la tragaban (aunque en las filmaciones no se logró ver las semillas, se observaron movimientos del pico y la cabeza que indicaban que los tordos se estaban alimentando).

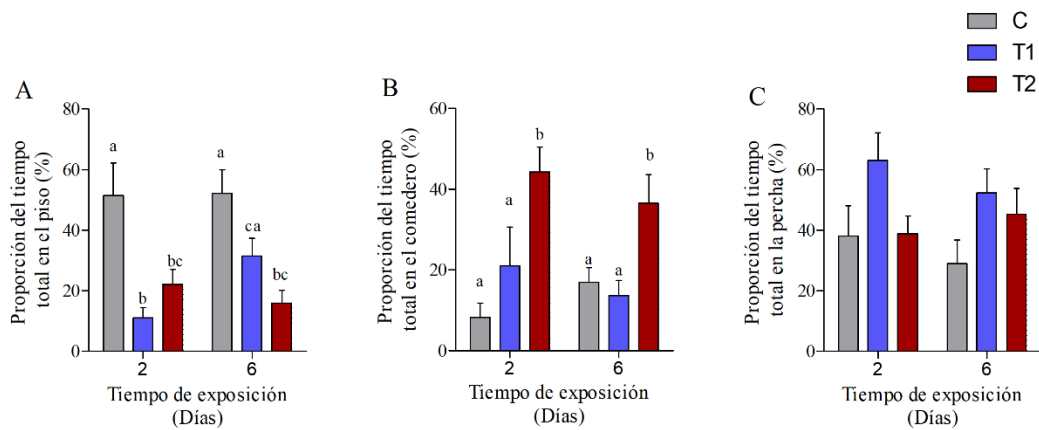


**Figura 4.5.** Comportamiento del tordo músico (*Agelaioides badius*) los días 2 y 6 de exposición a semillas tratadas con distintas concentraciones de IMI. T1: 0,075 g IMI/ kg sem., T2: 0,45 g IMI/ kg sem.

Durante la exposición a las semillas tratadas se observó que cada grupo experimental distribuyó su tiempo de manera distinta entre los sectores de la jaula, y se observó una tendencia de cada grupo a pasar la mayor proporción del tiempo en un sector específico (Figura 4.5). Los individuos del grupo control distribuyeron su tiempo de la siguiente manera piso > percha > comedero, ocupando el 53% del tiempo en el piso. Los individuos del grupo T1, en cambio, presentaron la siguiente distribución del tiempo

percha> comedero> piso, siendo el 66% la proporción de tiempo en la percha. Finalmente, los individuos del grupo T2 distribuyeron su tiempo en el comedero> percha > piso, aunque la distribución del tiempo entre el comedero y la percha fue similar y representó el 42 y 37% del tiempo, respectivamente. El sexto día de exposición, los individuos del grupo control mantuvieron la misma distribución: piso> percha> comedero, con el 53% del tiempo en piso y un aumento del doble del tiempo en el comedero respecto al segundo día. El grupo T1, por su parte, siguió manteniendo la mayor proporción de su tiempo en la percha (54%) pero, a diferencia de lo observado el segundo día, aumentó la proporción del tiempo en el piso y disminuyó el tiempo en el comedero y en la percha. Por último, el grupo T2 mantuvo un patrón de comportamiento parecido al del segundo día, las proporciones de tiempo pasadas en la percha y el comedero siendo similares y correspondiendo al 46 y 37% respectivamente

En la Figura 4.6 se presentan las comparaciones entre tratamientos del tiempo que las aves pasaron en cada sector de la jaula. El segundo día de exposición, las aves del grupo control permanecieron en el piso un porcentaje de tiempo significativamente mayor al de los dos tratamientos (Figura 4.6A). También se observó que los tordos de T2 se encontraban en el comedero una proporción de tiempo mayor a la de T1 y del grupo control (Figura 4.6B). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a la proporción de tiempo que las aves se encontraron en la percha (Figura 4.6C). El sexto día de exposición a las semillas tratadas, solo los individuos del grupo T2 estuvieron en el piso una proporción del tiempo significativamente menor respecto al grupo control, el grupo T1 habiendo aumentado el tiempo pasado en este compartimiento. Respecto a la proporción del tiempo en el comedero, se observó lo mismo que en el segundo día: el grupo T2 presentó una proporción significativamente mayor del tiempo en el comedero respecto al resto de los tratamientos. El sexto día tampoco se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en la proporción del tiempo que las aves se encontraron en la percha. En la Tabla 4.3 se presentan las correlaciones de Pearson entre las variables comportamentales y la dosis de IMI ingerida. Existió una correlación positiva significativa con la proporción de tiempo en el comedero el segundo día, y una correlación negativa significativa con la proporción de tiempo en el piso el sexto día.



**Figura 4.6.** Comportamiento (promedio  $\pm$  E.E) del tordo músico (*Agelaioides badius*) expuesto a semillas tratadas con distintas concentraciones de IMI. A) proporción de tiempo en el piso, B) proporción de tiempo en el comedero, C) proporción de tiempo en la percha. C: control, T1: 0,075 g IMI/ kg sem., T2: 0,45 g IMI/ kg sem. Letras diferentes indican diferencias significativas.

**Tabla 4.3.** Correlación de Pearson obtenida entre las variables comportamentales del tordo músico (*Agelaioides badius*) evaluadas a los 2 y 6 días de exposición a semillas tratadas con IMI, y la dosis diaria promedio de IMI ingerida a través del consumo de semillas tratadas por siete días. En itálica se indican las correlaciones significativas.

		Proporción de tiempo el comedero	Proporción de tiempo en el piso	Proporción de tiempo en la percha
<i>Día 2</i>				
Dosis	<i>r</i>	0,559	-0,274	-0,206
	<i>p</i>	0,0045	0,175	0,313
	N	26	26	26
<i>Día 6</i>				
Dosis	<i>r</i>	0,321	-0,478	0,207
	<i>p</i>	0,110	0,0136	0,311
	N	26	26	26

### 4.3.5. Parámetros hematológicos

En la Tabla 4.4, se presentan los resultados obtenidos con respecto a los parámetros hematológicos: ninguno de los parámetros analizados presentó diferencias significativas entre los controles y los tratamientos ( $p > 0,05$ ). En la Tabla 4.5 se presentan las correlaciones de Pearson entre la dosis diaria promedio ingerida por las aves de los distintos grupos y los parámetros hematológicos. No se observaron correlaciones significativas entre los parámetros hematológicos y la dosis diaria promedio de IMI.

**Tabla 4.4.** Efecto del tratamiento de semillas con IMI sobre parámetros hematológicos (promedio  $\pm$  E.E.) de *Agelaioides badius*. T1: 0,075 g IMI/ kg sem., T2: 0,45g IMI/ kg sem. RE= recuento de eritrocitos; HTC= hematocrito; Hb= hemoglobina; VCM= volumen corpuscular medio; HCM= hemoglobina corpuscular media; CHCM= concentración de hemoglobina corpuscular media.

	Control	T1	T2
<i>RE</i> ( $10^{12}/L$ )	3,53 $\pm$ 0,26	2,85 $\pm$ 0,48	3,17 $\pm$ 0,39
<i>HTC</i> (%)	45,72 $\pm$ 1,84	42,28 $\pm$ 3,86	46,66 $\pm$ 2,24
<i>Hb</i> (g/dL)	15,13 $\pm$ 1,19	13,00 $\pm$ 1,52	14,90 $\pm$ 0,89
<i>VCM</i> (fL)	13,36 $\pm$ 0,76	15,86 $\pm$ 2,18	18,90 $\pm$ 4,55
<i>HCM</i> (pg)	43,06 $\pm$ 1,84	47,07 $\pm$ 5,56	46,46 $\pm$ 3,92
<i>CHCM</i> (g/dL)	32,83 $\pm$ 1,86	30,20 $\pm$ 1,25	31,81 $\pm$ 0,86
<i>Policromasia</i> (%)	7,81 $\pm$ 0,55	8,36 $\pm$ 0,55	6,77 $\pm$ 0,59
<i>Recuento de leucocitos</i> (‰)	3,05 $\pm$ 0,48	4,49 $\pm$ 0,61	3,74 $\pm$ 0,32
<i>Heterófilos</i> (%)	36,57 $\pm$ 5,39	43,32 $\pm$ 7,70	51,07 $\pm$ 5,12
<i>Linfocitos</i> (%)	57,71 $\pm$ 5,74	52,80 $\pm$ 7,89	44,85 $\pm$ 5,06
<i>Eosinófilos</i> (%)	3,18 $\pm$ 0,69	1,49 $\pm$ 0,46	2,02 $\pm$ 0,31
<i>Basófilos</i> (%)	1,00 $\pm$ 0,30	0,97 $\pm$ 0,40	0,62 $\pm$ 0,17
<i>Monocitos</i> (%)	1,54 $\pm$ 0,39	1,42 $\pm$ 0,29	1,45 $\pm$ 0,24

**Tabla 4.5.** Correlación de Pearson obtenida entre los parámetros hematológicos e índices eritrocitarios del tordo músico (*Agelaioides badius*) y la dosis diaria promedio de IMI ingerida a través del consumo de semillas tratadas por siete días. RE= recuento de eritrocitos; HTC= hematocrito; Hb= hemoglobina; VCM= volumen corpuscular medio; HCM= hemoglobina corpuscular media; CHCM= concentración de hemoglobina corpuscular media.

Parámetros hematológicos vs Dosis diaria promedio	<i>r</i>	<i>p</i>	N
<i>RE</i>	-0,0416	0,833	28
<i>HTC</i>	0,102	0,606	28
<i>Hb</i>	0,0687	0,728	28
<i>VCM</i>	0,0032	0,987	28
<i>HCM</i>	-0,0016	0,993	28
<i>CHCM</i>	0,0172	0,931	28
<i>Policromasia</i>	-0,356	0,0633	28
<i>Recuento de leucocitos</i>	0,0539	0,785	28
<i>Heterófilos</i>	0,300	0,120	28
<i>Linfocitos</i>	-0,278	0,151	28
<i>Eosinófilos</i>	-0,183	0,351	28
<i>Basófilos</i>	-0,172	0,382	28
<i>Monocitos</i>	-0,00181	0,993	28



#### 4.3.6. Genotoxicidad

La Tabla 4.6 muestra los valores obtenidos con respecto a los parámetros de genotoxicidad. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ), y no se observó correlación significativa entre los parámetros de genotoxicidad y la dosis diaria promedio de IMI (Tabla 4.7).

**Tabla 4.6.** Efecto del tratamiento de semillas con IMI sobre parámetros de genotoxicidad (promedio  $\pm$  E.E.) de *Agelaioides badius*. T1: 0,075 g IMI/ kg sem., T2: 0,45 g IMI/ kg sem.

	Control	T1	T2
<i>Células binucleadas (%)</i>	1,35 $\pm$ 0,439	1,07 $\pm$ 0,315	0,462 $\pm$ 0,192
<i>Micronúcleos (%)</i>	0,513 $\pm$ 0,190	0,749 $\pm$ 0,295	0,331 $\pm$ 0,117

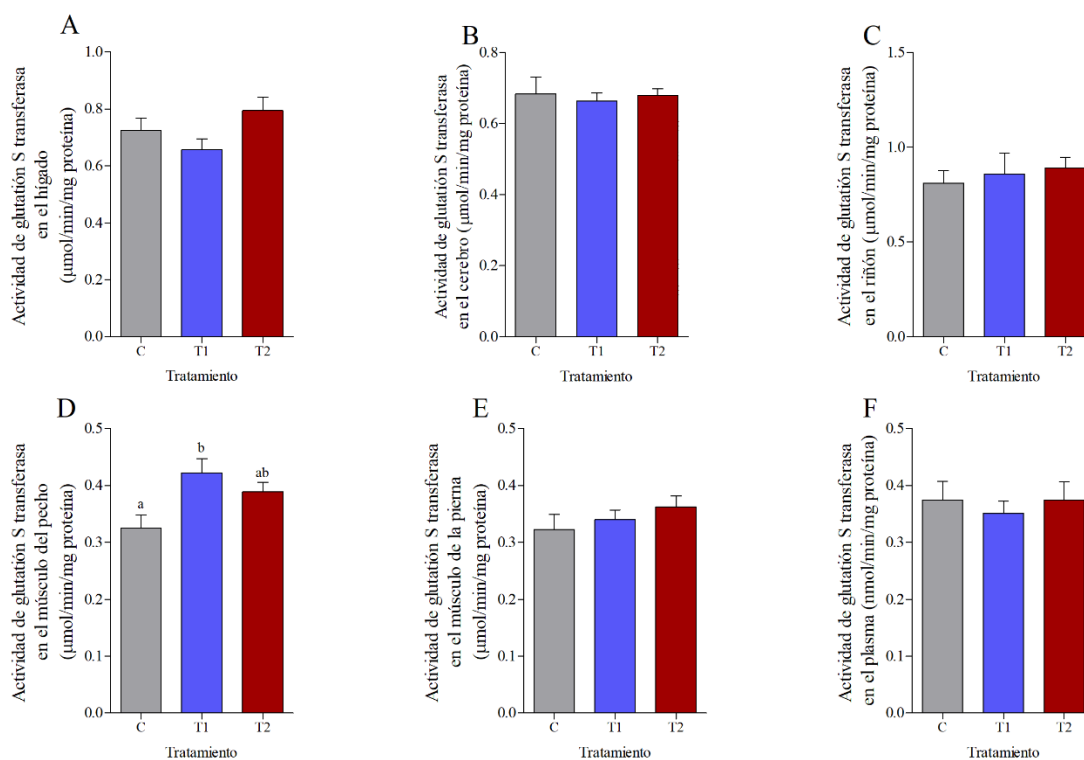
**Tabla 4.7.** Correlación de Pearson obtenida entre los parámetros de genotoxicidad del tordo músico (*Agelaioides badius*) y la dosis diaria promedio de IMI ingerida a través del consumo de semillas tratadas por siete días.

Parámetros de genotoxicidad vs Dosis diaria promedio	<i>r</i>	<i>p</i>	N
<i>Células binucleadas</i>	-0,314	0,104	28
<i>Micronúcleos</i>	-0,167	0,394	28

#### 4.3.7. Actividad enzimática y daño oxidativo

En la Figura 4.7 se muestra la actividad de la enzima GST medida en diferentes tejidos. Se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática del músculo del pecho, donde se observó un incremento de la actividad en el grupo T1 respecto al control, y una tendencia similar en el grupo T2 ( $p = 0,053$ ) (Figura 4.7D). No se

observaron diferencias significativas en la actividad enzimática de la GST entre los tratamientos en el resto de los tejidos evaluados. No se observaron correlaciones significativas entre la dosis diaria promedio ingerida por los distintos individuos y la actividad de la GST (Tabla 4.8).

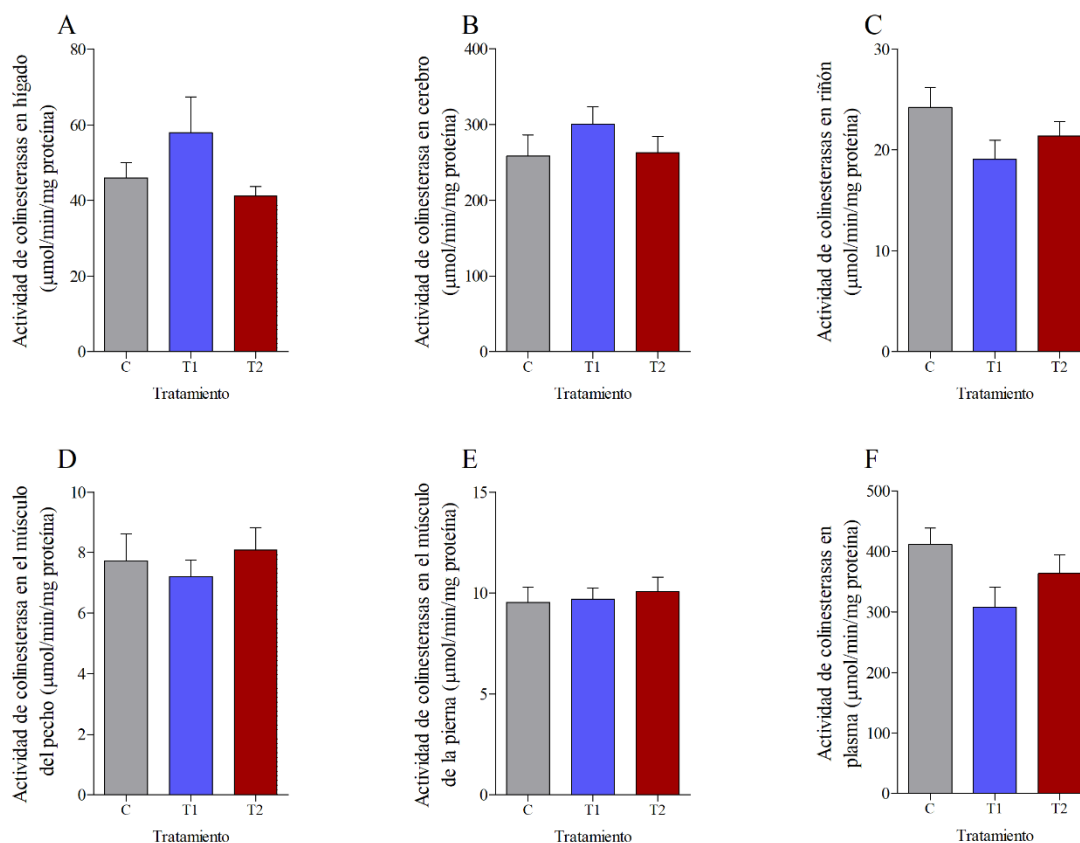


**Figura 4.7.** Actividad de la enzima GST en el plasma y en distintos tejidos (promedio  $\pm$  E.E) del tordo músico (*Agelaioides badius*) alimentados con semillas tratadas con IMI. A) hígado; B) cerebro; C) riñón; D) músculo del pecho; E) músculo de la pierna; F) plasma. C: control, T1: 0,075 g IMI/ kg sem., T2: 0,45 g IMI/ kg sem. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los gráficos que no incluyen letras no presentan diferencias significativas entre los tratamientos.

**Tabla 4.8.** Correlación de Pearson obtenida entre la actividad enzimática y el daño oxidativo (contenido de MDA) en distintos tejidos del toro músico (*Agelaioides badius*), y la dosis diaria promedio de IMI ingerida a través del consumo de semillas tratadas por siete días.

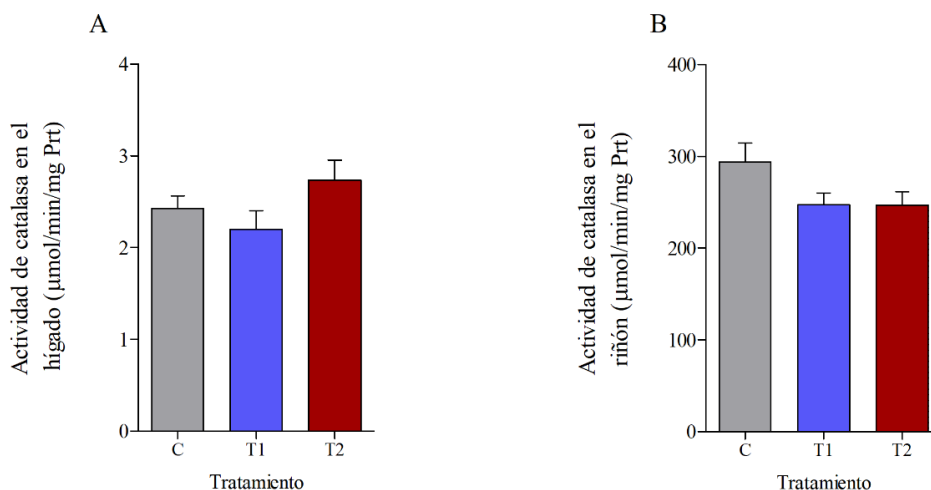
	Dosis diaria promedio		
	<i>r</i>	<i>p</i>	N
Actividad de GST			
<i>Hígado</i>	0,351	0,0668	28
<i>Cerebro</i>	-0,0087	0,965	28
<i>Riñón</i>	0,168	0,393	28
<i>Músculo pecho</i>	0,148	0,454	28
<i>Músculo pierna</i>	0,236	0,228	28
<i>Plasma</i>	-0,0251	0,899	28
Actividad de ChE			
<i>Hígado</i>	-0,215	0,272	28
<i>Cerebro</i>	-0,0248	0,900	28
<i>Riñón</i>	-0,103	0,602	28
<i>Músculo pecho</i>	0,161	0,413	28
<i>Músculo pierna</i>	0,187	0,342	28
<i>Plasma</i>	-0,0894	0,651	28
Actividad de CAT			
<i>Hígado</i>	0,267	0,170	28
<i>Riñón</i>	-0,234	0,230	28
Contenido de MDA			
<i>Hígado</i>	-0,000077	1,00	28
<i>Cerebro</i>	-0,430	0,0252	27
<i>Riñón</i>	-0,0483	0,807	28
<i>Músculo pecho</i>	0,00153	0,994	28
<i>Músculo pierna</i>	-0,0735	0,710	28

La Figura 4.8 presenta la actividad de las enzimas ChE medidas en diferentes tejidos. No se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática entre los tratamientos. Tampoco se observó correlación significativa de la dosis diaria promedio ingerida, y la actividad de la ChE en los distintos tejidos (Tabla 4.8).



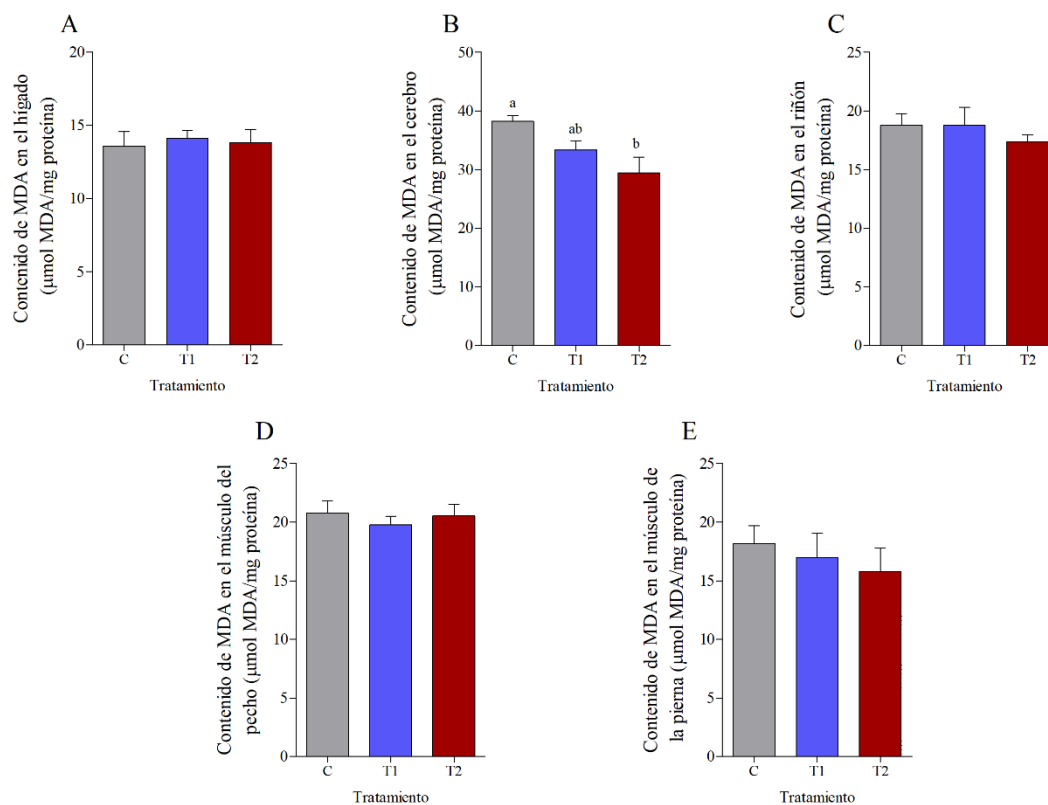
**Figura 4.8.** Actividad de las enzimas ChE en el plasma en distintos tejidos (promedio  $\pm$  E.E) del toro músico (*Agelaioides badius*) alimentados con semillas tratadas con IMI. A) hígado; B) cerebro; C) riñón; D) músculo del pecho; E) músculo de la pierna; F) plasma. C: control, T1: 0,075 g IMI/ kg sem., T2: 0,45 g IMI/ kg sem.

La actividad de la enzima CAT fue detectable en el hígado y en el riñón (Figura 4.9). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en la actividad de la CAT en el hígado y riñón. Tampoco existió correlación significativa entre la dosis diaria promedio, y la actividad enzimática de CAT en el hígado o riñón (Tabla 4.8).



**Figura 4.9.** Actividad de la enzima CAT en tejidos (promedio  $\pm$  E.E) en A) hígado y B) riñón, del tordo músico (*Agelaioides badius*) alimentados con semillas tratadas con IMI. C: control, T1: 0,075 g IMI/ kg sem., T2: 0,45 g IMI/ kg sem.

En la Figura 4.10 se presenta el daño oxidativo de los tejidos medido como el contenido de MDA. No se observaron diferencias significativas en el contenido de MDA entre los tratamientos, en ninguno de los tejidos evaluados. Se observó una correlación negativa significativa correlaciones significativas entre el contenido de MDA y la dosis diaria promedio de IMI ingerida (Tabla 4.8).



**Figura 4.10.** Contenido de MDA en los distintos tejidos (promedio  $\pm$  E.E) del tordo músico (*Agelaioides badius*) alimentados con semillas tratadas con IMI. A) hígado; B) cerebro; C) riñón; D) músculo del pecho; E) músculo de la pierna. C: control, T1: 0,075 g IMI/ kg sem., T2: 0,45 g IMI/ kg sem.

#### 4.3.8. NOAEL y LOAEL de los efectos observados

La dosis diaria promedio más baja que causó alteraciones en las respuestas de los individuos respecto a los grupos control fue determinada como LOAEL (*low observed adverse effect level*), mientras que la dosis más baja a la cual no se observaron diferencias respecto al grupo control se determinó como NOAEL (*no observed adverse effect level*).

En la Tabla 4.9 se resumen los efectos del IMI en los parámetros evaluados en los tordos músico expuestos a semillas tratadas durante siete días. La disminución del tiempo pasado en el piso, que demuestra un comportamiento exploratorio en las aves, y el aumento de la actividad de la GST del músculo del pecho, fueron las respuestas las más sensibles a la ingestión de IMI ya que, para estos parámetros, la LOAEL correspondió a T1: 8,22 mg IMI/kg pc/día. Por otro lado, hubo una disminución del consumo de alimento

y del peso corporal, acompañados por un incremento en el tiempo que las aves se encontraron en el comedero presentando un comportamiento de alimentación, para los cuales se estableció la dosis del T1 como el NOAEL y la dosis del T2 como LOAEL (44,22 mg IMI/kg pc/ día).

**Tabla 4.9.** Dosis diaria de IMI a la que no se observaron efectos adversos (NOAEL) y a la que se observaron efectos adversos (LOAEL) en *Agelaioides badius* expuestos a semillas tratadas. T1: 8,22 mg IMI/kg pc/día estimado a partir del tratamiento de semillas 0,075 mg IMI/kg sem.; T2: 44,22 mg IMI/kg pc/día estimado a partir del tratamiento de semillas de 0,45 mg IMI/kg sem.

Efecto	NOAEL	LOAEL
↓ <i>Consumo diario</i>	T1	T2
↓ <i>Peso corporal</i>	T1	T2
↑ <i>GST musculo pecho</i>		T1
↓ <i>Tiempo en el piso</i>		T1
↑ <i>Tiempo en el comedero</i>	T1	T2

#### 4.4. DISCUSION

Durante siete días los tordos músicos fueron alimentados con semillas tratadas con IMI a concentraciones de 0,075 y 0,45 g de IMI/kg sem., que representan respectivamente al 2,5 y 15% de la concentración promedio de 3 g IMI/kg sem se utiliza en la actualidad para el tratamiento de semillas en los cultivos de granos más comunes de la región Pampeana. La exposición a semillas tratadas causó la muerte de un individuo luego de ingerir una dosis total de 100 mg IMI/kg pc (175% DL50) en tres días, y desencadenó efectos subletales en las aves de los dos tratamientos como: disminución en la ingesta de alimento, pérdida de peso corporal, y alteraciones bioquímicas y comportamentales. El uso de concentraciones inferiores a las utilizadas normalmente en

el tratamiento de semillas simuló un escenario en el que solo el 2,5 o 15% de las semillas consumidas estarían tratadas. El diseño experimental de este trabajo permitió evaluar los efectos de la ingesta de una dosis subletal de IMI simulando una situación real, con la ventaja de poder estimar la dosis diaria ingerida por cada individuo, respecto a un diseño en el que se ofreciera a las aves una mezcla de semillas tratadas y sin tratar.

Durante los primeros tres días de exposición, se observó que las aves expuestas a la dosis más alta de IMI (T2) tuvieron un consumo de semillas inferior al resto de los individuos. La disminución en la ingesta de alimento coincidió con el periodo en el que las aves del grupo T2 presentaron las plumas erizadas y los ojos entrecerrados. Alternativamente, se observó que, pasadas las 72 horas de exposición, cuando ya no se observaban alteraciones en el aspecto ni signos de intoxicación, los tordos tratados reestablecieron su consumo de alimento. De manera conjunta, estos resultados indican que los tordos probablemente dejaron de alimentarse temporalmente debido al malestar provocado por el IMI y no por una aversión a las semillas tratadas.

Efectivamente, la ausencia de aversión de los tordos por las semillas tratadas quedó evidenciada al documentar que los individuos del grupo T1 siempre tuvieron un consumo igual al del grupo control, a pesar de consumir únicamente semillas tratadas, y que los individuos del grupo T2, normalizaron su consumo a partir del cuarto día y hasta el final de la exposición. Además, se observó a las aves tratadas dirigirse hacia el comedero cuando se hacía el recambio de alimento, y se las vio alimentándose en las filmaciones realizadas. Estos resultados son coherentes con los resultados obtenidos en el Capítulo 1 de esta tesis, y refuerzan el concepto de que los tordos músicos no presentan aversión innata por las semillas tratadas con IMI. Los resultados obtenidos en este trabajo se corresponden, además, con estudios en otras especies que demostraron que, a dosis similares a las utilizadas en el presente estudio, la aversión es baja o nula y, cuando ocurre, es una respuesta al malestar que genera la ingesta de IMI y no una respuesta innata (Avery *et al.*, 1994; Lopez-Antia *et al.*, 2013). En el ambiente, la falta de aversión inicial incrementa el riesgo de intoxicación por IMI, ya que las aves no son capaces de distinguir las semillas tratadas de las sin tratar.

Con respecto al peso corporal de las aves, se observó una correlación positiva entre la dosis de IMI ingerida y la pérdida de peso a lo largo de los siete días de exposición. Una disminución del peso similar ha sido previamente reportada en otras



especies de aves tratadas con IMI, la cual fue relacionada a una disminución en el consumo de alimento (Lopez-Antia *et al.*, 2014; Addy-Orduna *et al.*, 2019; Eng *et al.*, 2019; Franzen-Klein *et al.*, 2020). No obstante, considerando que los individuos expuestos a la dosis más baja de IMI consumieron la misma cantidad de semillas que los individuos del grupo control, la pérdida de peso podría deberse al gasto metabólico de eliminar y compensar los efectos del IMI en el organismo (Eng *et al.*, 2019). La pérdida de peso causada por la ingesta de IMI podría tener consecuencias negativas sobre las aves, por ejemplo, retrasando la migración al prolongar las paradas de alimentación (Eng *et al.*, 2019), o afectando su reproducción, ya que las aves invierten grandes cantidades de energía durante ese período (Williams y Ternan, 1999).

En el Capítulo 2 de esta tesis, se sugirió el uso de la actividad de la enzima GST como biomarcador, al encontrarse su actividad disminuida en el músculo, hígado, cerebro y plasma de los tordos. En el presente capítulo, la actividad de la enzima GST solo resultó aumentada en el músculo del pecho a diferencia de lo observado previamente. Considerando que la actividad de la enzima GST es muy variable y puede aumentar o disminuir dependiendo de la dosis y del tiempo de exposición (Drobne *et al.*, 2008), de ser utilizada como biomarcador, debería estar acompañada de una batería de parámetros que puedan indicar de manera integrada la salud de las aves en el ambiente. Por otro lado, la alteración de la enzima GST, podría estar indicando daño oxidativo, como ha sido reportado previamente (Wang *et al.*, 2018). De manera general, el conjunto de los parámetros analizados que podrían indicar daño oxidativo como la actividad de las enzimas GST, CAT y el contenido de MDA, no apuntan a un efecto oxidativo claro, ya que no se observaron diferencias entre las aves control y las aves tratadas.

Respecto a la actividad de las enzimas ChE, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tejidos estudiados, a diferencia de lo reportado en otros trabajos con aves (Wang *et al.*, 2018; Rawi *et al.*, 2019). En el tordo músico, los parámetros hematológicos evaluados, no variaron en las aves tratadas con IMI respecto a las aves del grupo Control. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con otros estudios, donde la respuesta de los parámetros hematológicos a la exposición a IMI fue escasa (Siddiqui *et al.* 2007; Balani *et al.*, 2011; Lopez-Antia *et al.* 2013; Sasidhar *et al.* 2014). Finalmente, los parámetros de genotoxicidad evaluados tampoco resultaron afectados por la exposición a IMI, a diferencia de lo observado en otros grupos de vertebrados como peces (Ge *et al.*, 2015; Iturburu *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2018), anfibios

(Feng *et al.*, 2004; Pérez-Iglesias *et al.*, 2014; Ruiz De Arcaute *et al.*, 2014) y mamíferos (Feng *et al.*, 2005; Kataria *et al.*, 2016).

Durante la exposición a las semillas tratadas se observó que cada grupo experimental distribuyó su tiempo de manera específica entre los distintos sectores de la jaula, lo cual implicó comportamientos específicos. El segundo día de exposición, las aves tratadas pasaron la mayor proporción del tiempo en la percha (grupo T1) y en el comedero (grupo T2). El sexto día se observó en el grupo T1 una transición hacia un aumento del tiempo en el piso (aunque la mayoría del tiempo lo ocupó en la percha), y en el grupo T2, un aumento del tiempo en la percha en detrimento del tiempo en el comedero. Por su parte, las aves del grupo control siempre presentaron una mayor proporción del tiempo ubicados en el piso de la jaula. Cuando las aves se encontraron en el piso (principalmente las del grupo control) se observaron activas en un comportamiento exploratorio, recorriendo y “buscando” con el pico en el piso de la jaula. Aunque este comportamiento no se evaluó específicamente, la diferencia del tiempo que las aves tratadas permanecieron en el piso fue significativamente menor respecto a las del grupo control. El comportamiento exploratorio es un rasgo propio de la personalidad de las aves relacionado con la capacidad de incorporar información sobre el ambiente que las rodea, explorar nuevos territorios, e interactuar con otros individuos (Dingemanse y De Goede, 2004; Maldonado *et al.*, 2012). La disminución en la proporción del tiempo que las aves permanecieron en el piso pudo deberse al malestar generado por la ingesta de IMI, principalmente el segundo día, haciendo que los tordos eligieran zonas de la jaula que implicaran comportamientos con menor movilidad (Franzen-Klein *et al.*, 2020; Roy *et al.*, 2020b). Por otro lado, existen estudios que relacionan el despliegue del comportamiento exploratorio con la concentración de la hormona corticosterona en sangre o heces (Baugh *et al.*, 2012; Carere *et al.*, 2010; Moyers *et al.*, 2018). Hasta el momento, solo Bean *et al.* (2019) reportaron valores de corticosterona en aves a las que se les administró IMI, sin detectar diferencias significativas entre los tratamientos. En su trabajo Bean *et al.*, administraron una única dosis de IMI, y los niveles de corticosterona se midieron dentro de las 24 horas posteriores. Sin embargo, Pandey *et al.* (2015, 2017) luego de exponer aves a alimento tratado con IMI durante 30 días, concluyen que el IMI actúa como disruptor endócrino, y reporta alteraciones en la hipófisis de aves tratadas, una de las glándulas involucrada en la regulación de corticosterona. En su trabajo, Pandey *et al.*, reportan alteraciones comportamentales relacionadas al cortejo y al canto durante

la etapa reproductiva. En base a los resultados observados, sería interesante evaluar el efecto del IMI específicamente sobre el comportamiento exploratorio de los tordos, y determinar si las alteraciones se relacionan con los niveles de corticosterona.

La alimentación de las aves es un comportamiento específico relacionado con la necesidad de cubrir la demanda metabólica (Lovette y Fitzpatrick, 2016). El aumento en el tiempo de alimentación observado en las aves tratadas podría estar asociado con el aumento del gasto energético que requiere el organismo para eliminar el IMI (Eng *et al.*, 2019). Particularmente en el grupo T2, la proporción de tiempo que las aves permanecieron alimentándose fue mayor que la del grupo control, correspondiendo al 42 y 37% los días 2 y 6 de exposición, respectivamente. Sin embargo, el aumento del tiempo en el comedero del grupo T2 no se vio reflejado en un aumento del consumo de semillas, e incluso el segundo día de exposición el consumo fue menor respecto al resto de los tratamientos. Es posible que la exposición al IMI haya afectado la eficiencia de alimentación de los tordos al aumentar el tiempo que las aves necesitaron para ingerir la misma cantidad de semillas que el resto de los tratamientos. Las alteraciones en el sistema nervioso causadas por la unión reversible del IMI y sus metabolitos a los receptores nicotínicos, afectan al sistema nervioso y a la placa neuromotora, y quizás esto podría afectar la capacidad de las aves de manipular las semillas. (Tomizawa y Casida, 2005; Simon-Delso *et al.*, 2015). En base a estos resultados, sería interesante realizar un estudio más detallado de la manipulación e ingestión de alimentos.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la ingesta de semillas tratadas, con dosis menores de IMI a las comúnmente utilizadas, genera efectos subletales en los tordos musico, y la falta de aversión observada, refuerza la evidencia de que si las semillas se encuentran disponibles en el ambiente, las aves se alimentarán de ellas (Berny *et al.*, 1999; Lopez-Antia *et al.*, 2016; Millot *et al.*, 2017; Botha *et al.*, 2018; Lennon *et al.*, 2020b). El conocimiento y la caracterización de los efectos subletales es esencial para entender cómo se ven afectados los individuos y las poblaciones de aves que habitan los agroecosistemas.

En el presente trabajo, se demostró la presencia de efectos subletales comportamentales, bioquímicos y energéticos en tordos que consumen solamente 2,5 - 15% de su dieta como semillas tratadas. Los efectos comportamentales aparecieron rápidamente y perduraron a lo largo del experimento. El uso del piso en la jaula, asociado

al comportamiento exploratorio de las aves, disminuyó a partir del segundo día de exposición a las semillas tratadas. Al mismo tiempo, el incremento del tiempo que las aves permanecieron en el comedero sugiere una eficiencia menor en la alimentación con posibles consecuencias sobre la supervivencia (Avery *et al.*, 1994; Millot *et al.*, 2015; Eng *et al.*, 2019). Finalmente, la ingesta de semillas tratadas con IMI afectó los parámetros relacionados al presupuesto energético de los tordos como el peso corporal y el consumo de alimento, y la actividad de la enzima GST, que podrían afectar procesos biológicos esenciales como la reproducción, la migración o la supervivencia (Williams y Ternan, 1999; Ferretti *et al.*, 2019).

Este trabajo se demuestra que si un tordo consume al menos el 2,5% de su dieta como semillas tratadas se desencadenan efectos subletales, principalmente comportamentales, que podrían afectar negativamente a las poblaciones de aves que habitan los agroecosistemas, en especial a las especies paseriformes. La rápida aparición de efectos comportamentales, así como la alteración de los parámetros bioquímicos y energéticos a dosis pequeñas, resalta la necesidad urgente de regular la práctica del tratamiento de semillas con IMI utilizada a escala global (Wood and Goulson, 2017), ya que procesos biológicos esenciales como la reproducción, la migración o la supervivencia podrían verse alterados.

## **5. CAPÍTULO 4. Exposición crónica de tordos músicos (*Agelaioides badius*) a semillas tratadas con imidacloprid y caracterización de la respuesta fisiológica y comportamental**

### **5.1. INTRODUCCION**

Los neonicotinoides son el grupo de insecticidas sistémicos más utilizados a nivel mundial (Bass et al., 2015). Los neonicotinoides presentan un modo de acción neurotóxico actuando sobre los receptores postsinápticos de acetilcolina, lo que hace que los insectos sean más sensibles a su acción respecto a los vertebrados (Tomizawa y Casida, 2005). El principal uso de los neonicotinoides es como curasemillas: la semilla es tratada y el ingrediente activo se trasloca a los órganos de la planta a medida que crece (Jeschke et al., 2011). Sin embargo, solo una pequeña fracción del ingrediente activo permanece en la planta, mientras el resto pasa al ambiente circundante (Bonmatin et al., 2015; Radolinski et al., 2018; Sur y Stork, 2003). Luego de más de dos décadas, el uso de los principales neonicotinoides: imidacloprid (IMI), tiametoxam y clotianidina, fue prohibido a partir del 2018 en la Unión Europea, debido a los efectos perjudiciales sobre los invertebrados benéficos, principalmente los polinizadores (Pisa et al., 2014). A pesar de las restricciones, el uso de los neonicotinoides sigue vigente para numerosos cultivos, en distintas partes del mundo.

Las aves constituyen uno de los grupos no-blanco de vertebrados más sensible al efecto de los neonicotinoides (Gibbons et al., 2015; Mineau y Palmer, 2013). Estudios recientes han resaltado el efecto perjudicial de los neonicotinoides sobre las poblaciones de aves (Li et al., 2020) ya sea de manera indirecta a través de la disminución del alimento (Goulson, 2014; Hallmann et al., 2014), o de manera directa debido a los efectos tóxicos sobre la salud (Eng et al., 2019; Lopez-Antia et al., 2015a; Millot et al., 2017). Para las aves, la principal ruta de exposición directa a los neonicotinoides ocurre a través del consumo de semillas tratadas que quedan disponibles en los campos de cultivo. Durante la siembra de las semillas tratadas un porcentaje de las semillas que no quedan enterradas adecuadamente, a lo que se le suman los frecuentes derrames de semillas desde las máquinas sembradoras (de Snoo and Luttik, 2004; Lennon et al., 2020a; Lopez-Antia et al., 2016; Roy et al., 2016).

Se ha registrado en distintos eventos, que el consumo de las semillas tratadas puede causar la mortalidad de las aves (Berny et al., 1999; Botha et al., 2018; Millot et al., 2017). En este contexto, es importante resaltar que aunque las aves consuman menos semillas tratadas que las necesarias para alcanzar la letalidad, la ingesta de dosis subletales puede desencadenar efectos perjudiciales sobre la salud de los individuos (Gibbons et al., 2015; Pisa et al., 2017). Las recientes detecciones de neonicotinoides en aves de distintos grupos tróficos (Bishop et al., 2020, 2018; Byholm et al., 2018; Graves et al., 2019; Hao et al., 2018; Humann-Guillemot et al., 2019b; Lennon et al., 2020b; MacDonald et al., 2018; Taliensky-Chamudis et al., 2017), indican que en la actualidad, las aves se encuentran expuestas a dosis subletales de neonicotinoides en distintas partes del mundo.

El IMI imidacloprid (IMI) es el primer neonicotinoide comercializado y es el más tóxico para las aves (Addy-Orduna et al., 2019). Los efectos subletales de la ingesta del IMI en las aves son numerosos e implican alteraciones bioquímicas, inmunológicas, fisiológicas y reproductivas, entre otras (Revisado por Pisa et al., 2017; Wang et al., 2018). En perdices y gallinas expuestas a IMI, se reportaron alteraciones del sistema inmunológico (Balani et al., 2011; Lopez-Antia et al., 2013), bioquímicas y de estrés oxidativo (Siddiqui *et al.*, 2007; Kammon *et al.*, 2010; Badgujar *et al.*, 2013; Sasidhar *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2017); y disminuciones en la tasa de fertilidad, en el tamaño de los huevos y retraso en el crecimiento de los embriones (Gobeli et al., 2017; Hussein and Singh, 2016; Lopez-Antia et al., 2015a). Por otro lado, estudios realizados en machos silvestres de bengalí rojo expuestos a IMI, reportaron alteraciones del sistema endócrino y efectos en el desarrollo de caracteres sexuales secundarios (Mohanty et al., 2017; Pandey et al., 2017). Finalmente, dentro de los efectos del IMI en las aves, se incluyen anormalidades comportamentales asociadas a alteraciones del sistema nervioso como falta de reacción, hipersensibilidad, temblores, desorientación y retraso en la migración (Addy-Orduna et al., 2019; Eng et al., 2019, 2017; Franzen-Klein et al., 2020).

En la región Pampeana de Argentina se demostró, utilizando como modelo experimental al tordo músico (*Agelaioides badius*), que las aves paseriformes tienen un alto riesgo de ingerir dosis subletales de IMI a través del consumo de semillas tratadas (Poliserpi et al., 2021). En el capítulo previo de esta tesis, la exposición de los tordos músicos a semillas tratadas con concentraciones de IMI menores a las utilizadas regularmente, provocó una disminución temporal en el consumo, y la disminución del

peso corporal en función de la dosis ingerida. Por otro lado, se observaron alteraciones comportamentales tempranas y que perduraron en el tiempo, que podrían estar relacionadas con la manipulación de alimentos y el comportamiento exploratorio de los individuos. En un contexto donde las semillas tratadas pueden encontrarse disponibles para las aves más de 15 días después de la siembra (Lennon et al., 2020a), y en base a los resultados obtenidos previamente, el objetivo de este último capítulo fue caracterizar los efectos subletales del IMI en las aves paseriformes en un escenario de exposición crónica a las semillas tratadas. Los objetivos específicos de este trabajo fueron: 1) evaluar el consumo diario de semillas tratadas con IMI ofrecidas *ad libitum* a las aves en condiciones de cautiverio; 2) caracterizar el efecto de la ingesta de una dosis subletal de IMI sobre el comportamiento de las aves; 3) caracterizar los efectos biológicos inducidos por la ingesta de IMI, mediante la determinación de una serie de parámetros hematológicos, bioquímicos y genéticos; 4) identificar potenciales biomarcadores para el reconocimiento de la exposición subletal de las aves al IMI en condiciones de campo.

## **5.2. METODOLOGÍA**

### **5.2.1. Tratamientos experimentales y preparación de las semillas**

Las semillas fueron tratadas con el producto comercial Confidor® OD (Bayer) que contiene 20% de imidacloprid (N-[1-[(6-Chloro-3-pyridyl)methyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl]nitramida, CAS. Nro. 13826-41-3) suspendido en una mezcla patentada de surfactantes, emulsionantes y aditivos de composición reservada. Los tratamientos experimentales fueron elegidos de la siguiente manera: primero se calculó el promedio de las distintas concentraciones de uso recomendadas en Argentina (SENASA, 2020) para el tratamiento de las semillas de distintos cultivos de granos comunes en la región pampeana (avena, trigo, soja, girasol, maíz, sorgo y alfalfa) (Tabla 3.1 del Capítulo 3 de esta tesis). De esta manera, se definió que, en la práctica, se utiliza una concentración promedio de 3 g de IMI/ kg semilla (sem.) para el tratamiento de semillas. En base a ese valor, se definieron dos concentraciones experimentales 0,075 y 0,45 g IMI/kg sem. que corresponden respectivamente al 2,5 % y el 15% de la concentración promedio de 3 g de IMI/ kg sem.

De acuerdo con las instrucciones de uso del formulado comercial, la solución para preparar las semillas con la concentración baja se preparó diluyendo 560  $\mu$ L de Confidor OD® en 40,4 mL de agua destilada. Esta solución fue luego asperjada sobre 1500 g de semillas de mijo pelado, para obtener semillas de mijo tratadas con una concentración de 0,075 g IMI/kg sem. Por su parte, la solución para preparar las semillas con la concentración más alta se preparó diluyendo 3,375 mL de Confidor OD® en 37,7 mL de agua destilada, los cuales fueron asperjados sobre 1500 g de semillas de mijo pelado, para obtener semillas de mijo tratadas con una dosis de 0,45 g IMI/kg sem. Las semillas tratadas fueron secadas a temperatura ambiente durante un día antes de ser fraccionadas. Se separaron alícuotas de 10 g que fueron almacenadas a -20°C hasta su uso en los días siguientes. El día anterior a su uso, las semillas tratadas fueron descongeladas y almacenadas a 4° C. Una vez por semana se preparó un lote de 1,5 kg de semillas tratadas de para cada tratamiento. Por cada lote de semillas tratadas, dos alícuotas de 10 g de cada tratamiento fueron separadas y almacenadas a -20°C para ser usadas en la confirmación analítica de la concentración de IMI presente en las semillas.

### **5.2.2. Determinación analítica de IMI en el formulado y semillas**

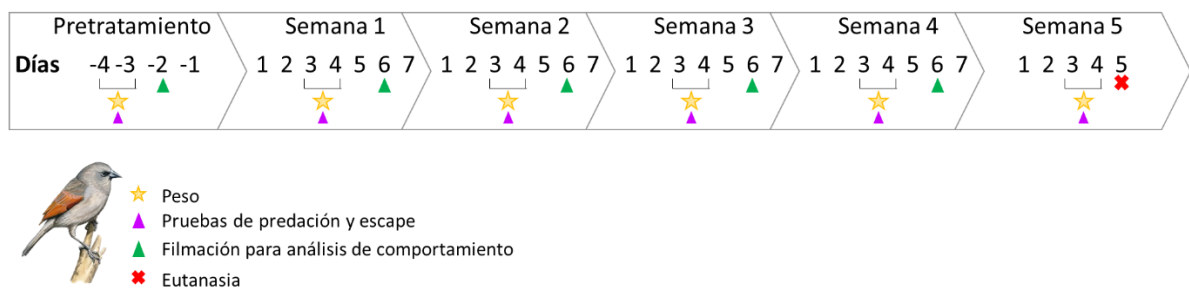
La concentración en IMI de las semillas tratadas con Confidor OD® fue verificada analíticamente, de acuerdo a la metodología detallada en la sección 4.2.9 del Capítulo 3 de esta tesis.

### **5.2.3. Diseño experimental**

Tordos músicos adultos fueron alimentados durante 32 días con semillas de mijo tratadas con IMI. Dos días antes de comenzar el experimento, cada tordo fue colocado en una bolsa de algodón y pesado con una balanza de resorte (Pesola®) con una exactitud de  $\pm$  1g. Las aves fueron asignadas al azar a los siguientes tratamientos: Control: 0 mg IMI/kg de semilla (N=13), Tratamiento 1 (T1): 0,075 g IMI/kg sem. (N=12), y Tratamiento 2 (T2): 0,45 g IMI/kg sem. (N=12). Todas las mañanas entre las 9 y 11 am se colocaron 10 g de semillas, y al día siguiente a la misma hora se recolectaron las semillas que quedaban en el comedero y bandeja. En la Figura 5.1 se describe el cronograma experimental semanal. A partir de los días 3 y 4 de exposición se evaluó



semanalmente la respuesta de los tordos frente a un predador y de escape. La respuesta de los tordos ante los estímulos fue filmada durante 10 minutos, y cada tordo fue evaluado individualmente y de manera aleatoria, como se describe a continuación. Los días que se realizaron las pruebas de respuesta y escape, todos los individuos fueron pesados de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. A partir del día 6 de exposición se evaluó semanalmente el comportamiento de los tordos dentro de la jaula. La actividad de las aves se registró en videos de un minuto filmados con trampas-cámara Bushnell® TROPHY CAM™. Por cada individuo se obtuvieron 15 videos con una diferencia mínima de tiempo entre ellos de 5 minutos, para asegurar la independencia de cada evento registrado. Las filmaciones se realizaron luego del recambio de alimento diario, y para comenzar se esperaron al menos 5 minutos desde que el personal saliera del laboratorio, de manera de disminuir el disturbio. Los individuos de cada tratamiento fueron filmados entre las 11:00 y las 15:00 horas de manera aleatoria e independiente de los tratamientos. Con el mismo criterio, seis individuos del tratamiento 2, seleccionados al azar, fueron filmados nueve minutos diarios, los días 2, 3 y 4 de exposición. Durante todo el experimento, se evaluó diariamente la supervivencia de las aves. Luego de 32 días de exposición, las aves fueron pesadas, y luego eutanasiadas en una cámara de dióxido de carbono y decapitadas, de acuerdo con las guías institucionales (CICUAE) e internacionales de bienestar animal (Fair *et al.*, 2010). La manipulación de las aves y los protocolos de trabajo fueron realizados según las guías internacionales de bienestar animal y aprobados por el comité institucional de cuidado animal (CICUAE- INTA permiso #32/ 2017).



**Figura 5.1.** Esquema del diseño experimental.

#### **5.2.4. Consumo diario y estimación de la dosis ingerida**

El consumo diario (CD) de cada ave, antes y durante el experimento, y la dosis diaria ingerida de IMI, se estimaron de acuerdo a la metodología detallada en el Capítulo 3 de esta tesis (sección 4.2.3).

Antes del comienzo del experimento, se estimó para cada individuo el consumo diario de semillas sin tratar durante nueve días. El consumo de los individuos que murieron durante el periodo de exposición fue estimado sin considerar su último día de consumo.

#### **5.2.5. Comportamiento**

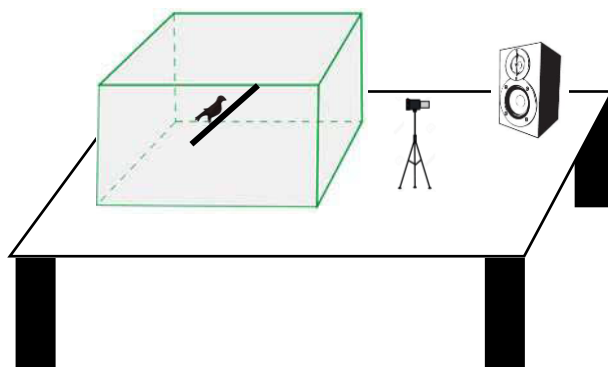
Para cada individuo, los minutos de filmación fueron clasificados según el sector de la jaula en el cual se encontraba. Los videos se analizaron con el programa ANY-maze Behavioural Tracking Software y se calculó el tiempo en segundos que cada tordo permaneció en: 1) la percha: el ave estaba en la percha o perchado en los barrotes de la jaula, 2) el piso: el ave se encontraba en el piso, y 3) el comedero: el ave estaba posada en el comedero alimentándose (Figura 5.2). Además, se contó cada desplazamiento entre los sectores de la jaula como un salto. A partir de los tiempos obtenidos, se calcularon cuatro parámetros: el porcentaje del tiempo total que las aves permanecieron en 1) la percha, 2) el piso o 3) el comedero. Por otro lado, se clasificó la movilidad de las aves como “normal” o “reducida” en los momentos cuando estaban en el piso o en la percha.



**Figura 5.2.** Jaula experimental donde se realizaron las filmaciones.

#### **5.2.6. Respuesta al predador y de escape**

Los tordos fueron expuestos al canto de un predador natural, en un test similar al de de Faria *et al.* (2018). En una habitación aislada, se armó un dispositivo que consistió en un jaulón de madera de 80x 80x 60 cm de altura, se colocó una filmadora frente al jaulón y un parlante conectado a una computadora (Figura 5.3). La prueba consistió en exponer a los tordos al canto del Taguató (*Buteo magnirostris*), un ave rapaz que preda sobre aves pequeñas (Narosky e Yzurieta, 2010). Para ello, cada individuo se colocó en la jaula experimental, se lo dejó 5 minutos en un periodo de aclimatación antes de pasarle estímulo sonoro, y se retiró 5 minutos después. Cada individuo fue filmado los diez minutos totales que duró la prueba. En cada filmación se registró el tipo de reacción frente al estímulo sonoro como: “0” si no había movimiento corporal o de la cabeza, y “1” si había movimiento de la cabeza con o sin postura erguida, y/o salto. Al finalizar la prueba, y como parte de la respuesta de escape, se evaluó la capacidad de las aves para levantar vuelo y alejarse cuando una persona se aproximaba al dispositivo. Se registró como respuesta positiva (“1”) si el ave levantaba vuelo a la percha o a los barrotes de la jaula, y no permanecía en el piso. Se registró respuesta negativa de escape (“0”), cuando no se observó reacción de los individuos frente a las personas: no volaron y no se desplazaron a un lugar alejado de la persona.



**Figura 5.3.** Esquema de la jaula experimental donde se realizaron las pruebas de respuesta al predador y de escape.

### 5.2.7. Toma de muestras

Luego de la eutanasia, se colectó sangre mediante punción cardíaca utilizando una aguja 25 G en una jeringa de 1 mL heparinizada. Dos alícuotas de 10  $\mu$ L fueron diluidos 1:200 en la solución de Natt Herrick para realizar el recuento de eritrocitos. Para la determinación de hemoglobina, otras dos alícuotas de 10  $\mu$ L de sangre fueron diluidas 1:200 en la solución de Drabkin que contiene ferrocianuro y cianuro potásicos (Biopur, Rosario, Argentina). Con parte de la sangre llenaron dos capilares heparinizados para estimar el hematocrito. Finalmente, se realizaron dos frotis por ave para realizar el recuento total y diferencial de leucocitos, de micronúcleos, células binucleadas y el grado de policromasia. Cada frotis se dejó secar al aire libre, se fijó con metanol y se tiñó con la solución de Wright-Giemsa (solución comercial Biopack®) (Clark, 2009). La sangre restante se centrifugó a 10.000g por 5 minutos y el plasma fue separado y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis. Se pesó el hígado para calcular el índice hepatosomático (IHS) como el peso del hígado/peso corporal, determinado al final de la exposición. En base a la observación de las gónadas se registró el sexo de los individuos y se tomaron muestras de cerebro, hígado, riñón y músculo, que fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis bioquímico.

### **5.2.8. Parámetros hematológicos**

El recuento de eritrocitos (RE), hematocrito, hemoglobina, y sus índices derivados, el recuento total y diferencial de leucocitos, y el grado de policromasia, se realizaron de acuerdo a la metodología detallada en el Capítulo 2 de esta tesis.

### **5.2.9. Genotoxicidad**

La determinación de la frecuencia de micronúcleos (MN) y de células binucleadas (BN), se realizó de acuerdo a la metodología detallada en la sección 4.2.9 de esta tesis (Capítulo 3).

### **5.2.10. Actividad enzimática**

Las actividades enzimáticas de las colinesterasas (ChE), la catalasa (CAT) y la glutatión-S-transferasa (GST) fueron determinadas en hígado, músculo, cerebro, riñón y plasma; siguiendo los protocolos de Brodeur *et al.* (2011, 2012, 2017), como fue detallado en el Capítulo 2 de esta tesis.

### **5.2.11. Análisis estadístico**

El efecto del tratamiento y el tiempo sobre el consumo de semillas, el peso y las variables de comportamiento en la jaula, se analizaron mediante modelos lineales generales y mixtos con medidas repetidas (GLMM). Las variables explicativas incluyeron el *tratamiento* y el *tiempo* de exposición (días o semanas), y su interacción *tratamiento\*tiempo*. Todos los modelos incluyeron la identidad individual como efecto aleatorio de modo de contemplar las medidas repetidas sobre el mismo individuo en el tiempo. Cuando hubo diferencias significativas entre los tratamientos se realizó una prueba de contraste de Holm-Sidack. El análisis mediante GLMM fue realizado con el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2008). La sobrevivencia de las aves tratadas se analizó mediante el análisis de supervivencia de Kaplan- Meyer y la comparación entre los tratamientos se realizó mediante una prueba de Mantel-Cox. Las variables categóricas obtenidas de las pruebas comportamentales de respuesta al predador

y de escape fueron analizadas mediante una prueba exacta de Fisher. Los parámetros hematológicos, de genotoxicidad y enzimáticos fueron comparados mediante una ANOVA de una vía luego de controlar que se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedacea de los datos. Algunos parámetros fueron transformados para que cumplieran con los supuestos de la siguiente manera: raíz cuadrada ( $x$ ) (MN),  $1/x$  (ChE en hígado),  $\cos x$  (HCT, ChE en plasma), y  $\ln(x)$  (CAT y ChE en riñón); y analizados mediante un ANOVA de una vía. El índice hepato somático se evaluó mediante una ANOVA de dos vías comparando entre tratamientos y por sexo. En ambos análisis de ANOVA, cuando hubo diferencias significativas entre los tratamientos se realizó una prueba de contraste de Holm-Sidack. Para evaluar si existía una relación entre la dosis y la respuesta de los parámetros comportamentales, hematológicos, bioquímicos, y genotóxicos, se realizó una correlación de Pearson con la dosis promedio de IMI ingerida durante el periodo de exposición. En los análisis de correlación se utilizaron los datos combinados de las aves de todos los tratamientos, incluidos los del grupo control. El valor de significancia fue  $p < 0,05$  en todos los casos. Todos los análisis estadísticos excepto los GLMM fueron realizados con el software estadístico GraphPad Prism Version 5.03.

### **5.3. RESULTADOS**

#### **5.3.1. Concentración de IMI en las semillas**

En la Tabla 5.2 se presentan las concentraciones analíticas de IMI en las semillas (promedio  $\pm$  E.E.) correspondientes a cada lote semanal ( $N=2$  por tratamiento). Las concentraciones promedio de IMI presentes en las semillas a lo largo de las 5 semanas de exposición fueron de 0,0531 y 0,514 g IMI/ kg de semillas para el tratamiento 1 y 2, respectivamente. Debido a que la concentración analítica del T1 corresponde al 70,7% de la concentración nominal de 0,075 g IMI/kg, se utilizó la concentración analítica promedio para los análisis posteriores. Para los cálculos correspondientes al T2, se utilizó la concentración nominal de 0,45 g IMI/kg ya que la diferencia entre la concentración nominal y analítica es de 14,2 %, y se encuentra dentro del rango de variación aceptado (menor al 20%), de acuerdo con los protocolos internacionales (USEPA, 2012).

**Tabla 5.2.** Concentración analítica (promedio  $\pm$  E.E.) de IMI en las semillas tratadas (N=2).

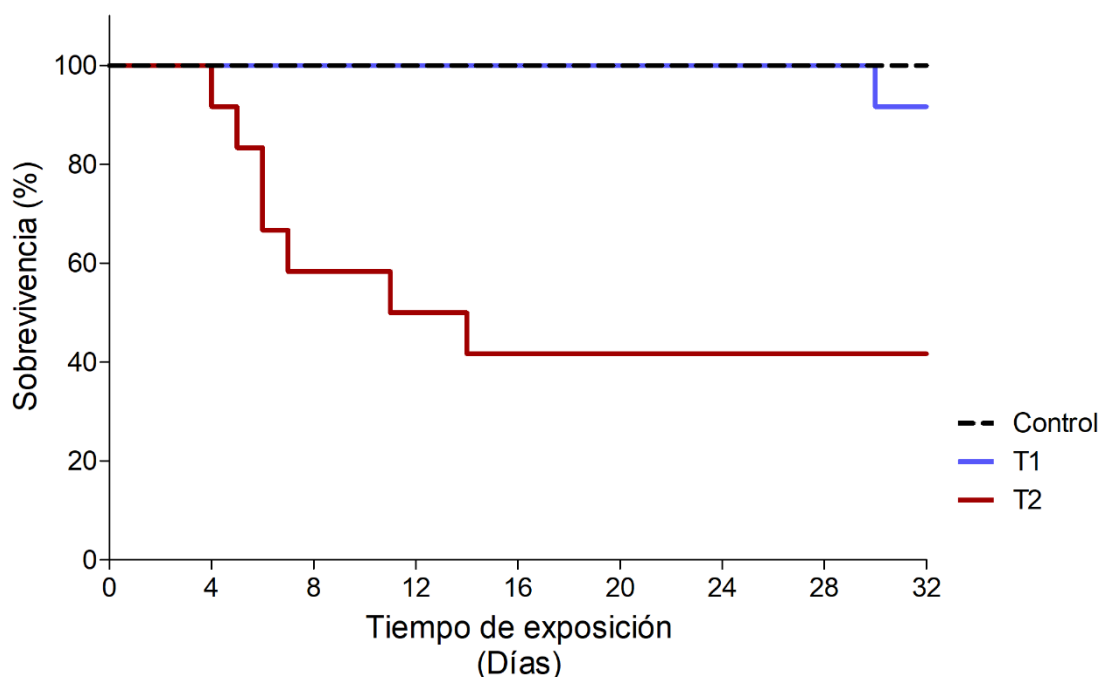
	T1	T2
<i>Concentración nominal</i>	0,075	0,45
<i>Concentración analítica</i>		
Semana 1	0,0622 $\pm$ 0,019	0,494 $\pm$ 0,040
Semana 2	0,0288 $\pm$ 0,0047	0,462 $\pm$ 0,037
Semana 3	0,0447 $\pm$ 0,0067	0,546 $\pm$ 0,0053
Semana 4	0,0766 $\pm$ 0,016	0,554 $\pm$ 0,030
<i>Valor promedio</i>	0,053 $\pm$ 0,0084	0,514 $\pm$ 0,019

### 5.3.2. Sobrevivencia de los tordos alimentados con semillas tratadas

En total se evaluaron 17 hembras y 20 machos, que resultaron divididos equitativamente entre los tratamientos (la proporción de hembras fue 46%, 50% y 42% en los grupos Control, T1 y T2, respectivamente). El peso promedio de las aves (promedio  $\pm$  D.E) antes de comenzar el experimento fue de 39,38  $\pm$  3,024 g, y no se observaron diferencias significativas en el peso inicial entre los grupos, ni entre machos y hembras (datos no ilustrados). Tampoco se observaron diferencias significativas entre sexos o tratamientos en el índice hepatosomático que se determinó al final del experimento (datos no ilustrados).

Ninguna de las aves del grupo control falleció durante el experimento (Figura 5.4). Por su parte, la sobrevivencia de las aves del grupo T1 no es significativamente distinta a la de las aves del grupo control con 91,6%. Sin embargo, las aves expuestas a T2 presentaron una mortalidad significativa; solamente 41,6% de las aves sobreviviendo los 32 días de exposición (Figura 4.4). En total, murieron ocho individuos expuestos a semillas tratadas con IMI: uno del grupo T1 y siete del grupo T2. El individuo del grupo T1 murió luego de 30 días de exposición. De los siete individuos del grupo T2, cinco murieron antes de cumplirse la semana de exposición, mientras que los otros 2 individuos murieron antes de cumplirse los 15 días de exposición. Como el individuo del grupo T1 murió solamente dos días antes de finalizar el experimento, fue considerado en los análisis

de consumo, peso corporal y comportamiento junto con los individuos que sobrevivieron durante todo el periodo de exposición.



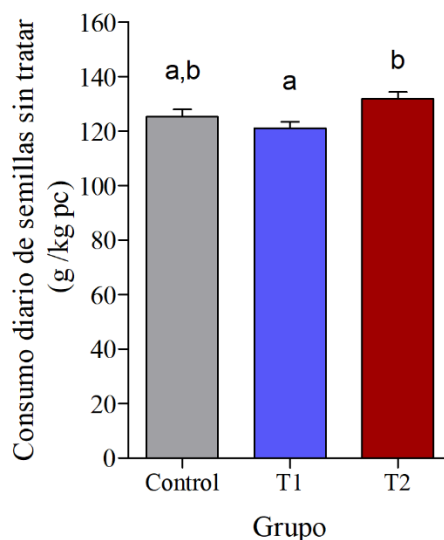
**Figura 5.4.** Supervivencia de *Agelaioides badius* expuesto a semillas tratadas con IMI durante 32 días. T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45g IMI/kg sem.

### 5.3.3. Consumo diario de semillas y dosis ingeridas

#### *Consumo de semillas sin tratar en el periodo previo al experimento*

La Figura 5.5 presenta el consumo de semillas sin tratar de las aves pertenecientes a cada uno de los tres grupos experimentales durante los nueve días previos al inicio del tratamiento. No se observaron diferencias significativas entre el consumo de las aves pertenecientes a los grupos que fueron asignado a T1 y T2 y las aves que conformaron el grupo control, pero el consumo de las aves asignadas a T2 fue significativamente mayor al de las aves asignadas a T1. El consumo diario de semillas sin tratar (promedio  $\pm$  E.E.) fue de  $125,3 \pm 4,12$  g;  $121,1 \pm 2,51$  g y  $131,8 \pm 4,31$  g semillas/kg pc para los grupos control, T1 y T2 respectivamente.





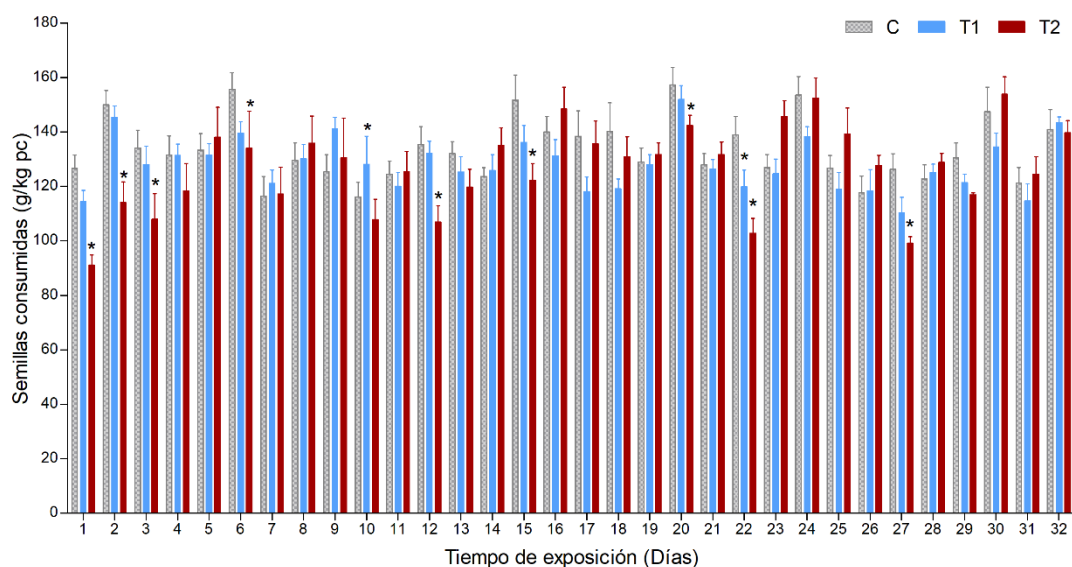
**Figura 5.5.** Consumo diario promedio de semillas sin tratar de las aves asignadas a los tres grupos experimentales estimado durante 9 días previos al inicio del tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### *Consumo de semillas tratadas con IMI*

El consumo diario de semillas tratadas (promedio  $\pm$  E.E.), incluyendo el de los individuos que murieron durante la exposición, fue de  $133,3 \pm 3,98$ ;  $127,0 \pm 3,07$  y  $105,7 \pm 7,35$  g semillas/ kg pc para los grupos control, T1 y T2 respectivamente (datos no ilustrados). Estos valores corresponden, respectivamente, al 106,4; 104,9; y 80,2 % del consumo de semillas sin tratar, calculado para cada grupo (control, T1 y T2) durante el periodo previo al experimento (ver la sección anterior). El incremento en el consumo del grupo control durante el experimento fue significativo respecto al consumo observado previo al inicio del ensayo. Por el contrario, el grupo T2 disminuyó significativamente su consumo durante el periodo de exposición a las semillas tratadas, mientras que el consumo de los individuos del grupo T1 no varió significativamente entre los dos periodos.

El consumo diario promedio de semillas tratadas de los tres grupos experimentales se presenta en la Figura 5.6. En el caso del grupo T2, se ilustra solamente el consumo de los individuos que sobrevivieron los 32 días de exposición a las semillas tratadas. Se puede ver que el consumo de semillas de los individuos del grupo T1 fue comparable al del grupo control. Por su parte, las aves del grupo T2 consumieron

significativamente menos semillas tratadas durante los primeros 3 días de exposición respecto al resto de los grupos. Sin embargo, el consumo de semillas de T2 volvió luego a aumentar hasta equiparar el consumo del grupo control en el día 5 (Figura 5.6). A partir del día cinco y hasta el final del experimento, las aves del grupo T2 presentaron oscilaciones en el consumo; algunos días consumiendo cantidades de semillas similares a los otros grupos, y otros días consumiendo significativamente menos semillas (Figura 5.6). Los días 6, 10, 12, 15, 20, 22 y 27 de exposición a las semillas tratadas, el consumo del grupo T2 fue significativamente menor al del grupo control.



**Figura 5.6.** Consumo diario de semillas tratadas con IMI por individuos de *Agelaioides badius* durante 32 días. \* Indica diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ). C: Control; T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45g IMI/kg sem. El grafico no incluye los datos de las aves del grupo T2 que fallecieron durante la exposición a IMI.

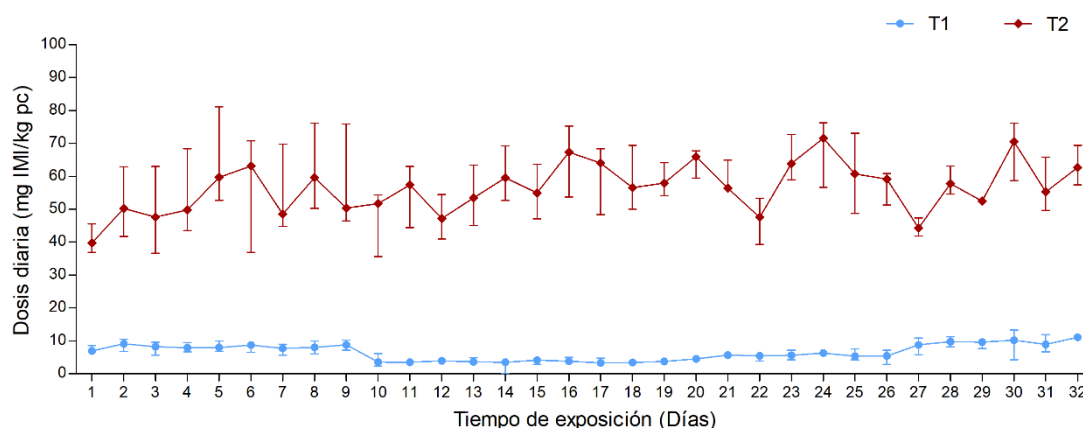
Con respecto a las aves del grupo T2, aquellos que murieron antes de los 5 días de exposición ( $n = 5$ ) presentaron un consumo diario de semillas significativamente menor al de las aves del mismo grupo que sobrevivieron los 32 días de exposición y al de las aves del grupo control (promedio  $\pm$  E.E.):  $75,2 \pm 5,88$ ,  $127,0 \pm 1,71$ , y  $133,3 \pm 3,98$  g/kg pc, respectivamente. En comparación, los individuos del grupo T2, que murieron pasados los 10 días de exposición ( $n = 2$ ) consumieron una cantidad diaria de semillas similar a la de las aves del mismo grupo que sobrevivieron los 32 días de exposición y a

las aves del grupo control (promedio  $\pm$  E.E.):  $120,7 \pm 2,15$ ,  $127,0 \pm 1,71$ , y  $133,3 \pm 3,98$  g/kg pc, respectivamente (datos no ilustrados).

### 5.3.4. Dosis Diaria ingerida

En la Figura 4.7 se presenta la dosis diaria de IMI ingerida por las aves de los grupos experimentales T1 y T2. En el caso de las aves expuestas a T2, se considera aquí solamente el consumo de las aves que sobrevivieron los 32 días de exposición. Las dosis diarias de IMI ingeridas (promedio  $\pm$  E.E.) fueron de  $6,36 \pm 0,167$  mg IMI/kg pc para el grupo T1 y  $52,67 \pm 3,77$  mg IMI/kg pc para el grupo T2. Estas dosis diarias corresponden, respectivamente, al 11,1 % y 92,9% de la DL<sub>50</sub> que es 57,11 mg IMI/kg pc y que fue estimada en el Capítulo 1 de esta tesis.

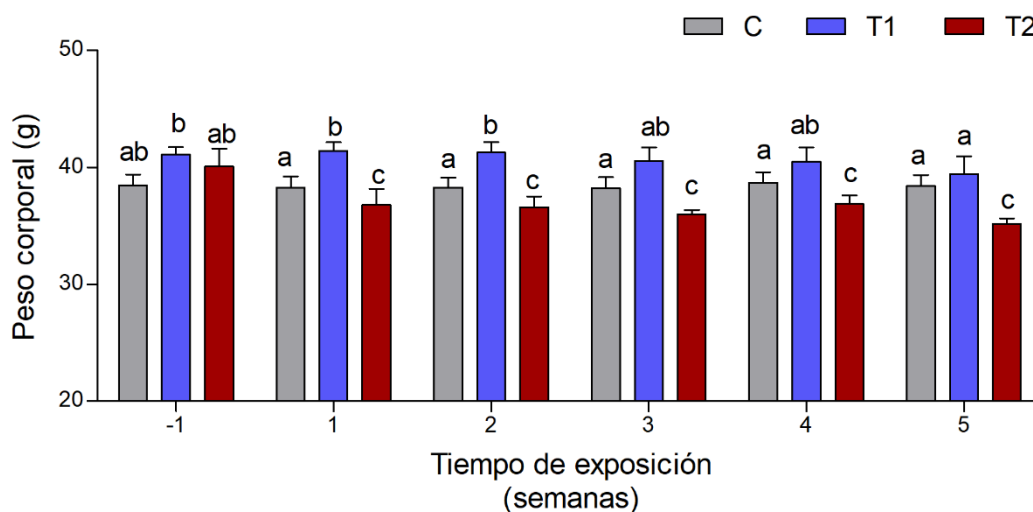
Es importante destacar que solo el 41,7% de las aves sometidas a T2 sobrevivieron los 32 días de exposición. Considerando los individuos de T2 que murieron, existió un 41,7% de los individuos que fallecieron entre los días 3 y 5 de exposición, luego de ingerir diariamente el 58,2% de la DL<sub>50</sub> (33,25 mg IMI/kg pc). El 16,6% restante de los individuos falleció pasados los 10 días de exposición luego de ingerir diariamente el 103,4% de la DL<sub>50</sub> (59,04 mg IMI/kg pc).



**Figura 5.7.** Dosis diaria de IMI ingerida por individuos de *Agelaioides badius* expuestos durante 32 días a semillas tratadas. T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45g IMI/kg sem. El grafico no incluye los datos de las aves del grupo T2 que fallecieron durante la exposición a IMI.

### 5.3.5. Variación del peso corporal

En la Figura 5.8, se presenta el peso corporal previo al tratamiento y el peso corporal medido semanalmente durante el periodo de exposición. No se observaron cambios significativos del peso de los individuos del grupo control en el tiempo. Los individuos del grupo T1 comenzaron el experimento con un peso corporal mayor al de los otros dos grupos, a partir de la tercera semana de exposición, esa diferencia se perdió. El peso de los individuos del grupo T1 disminuyó la quinta semana, respecto a las semanas 1 y 2. En cuanto a las aves expuestas a la dosis más alta (T2) estas disminuyeron su peso significativamente durante la primera semana. Sin embargo, a partir de la segunda semana de tratamiento y hasta el final del experimento, el peso corporal de las aves expuestas a T2 se mantuvo constante al 90% del peso inicial, significativamente más bajo que el peso de las aves del grupo control y de T1 (Figura 5.8). Por su parte, los individuos del grupo T2 que murieron durante el experimento habían disminuidos su peso en promedio un 22% respecto a su peso inicial al momento de su muerte (datos no ilustrados).



**Figura 5.8.** Peso corporal de *Agelaioides badius* expuestos a semillas tratadas con distintas concentraciones de IMI. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). C: control, T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45g IMI/kg sem. El grafico no incluye los datos de las aves del grupo T2 que fallecieron durante la exposición a IMI.

### 5.3.6. Comportamiento

#### *Comparación de los tiempos de permanencia en la percha, el piso y el comedor*

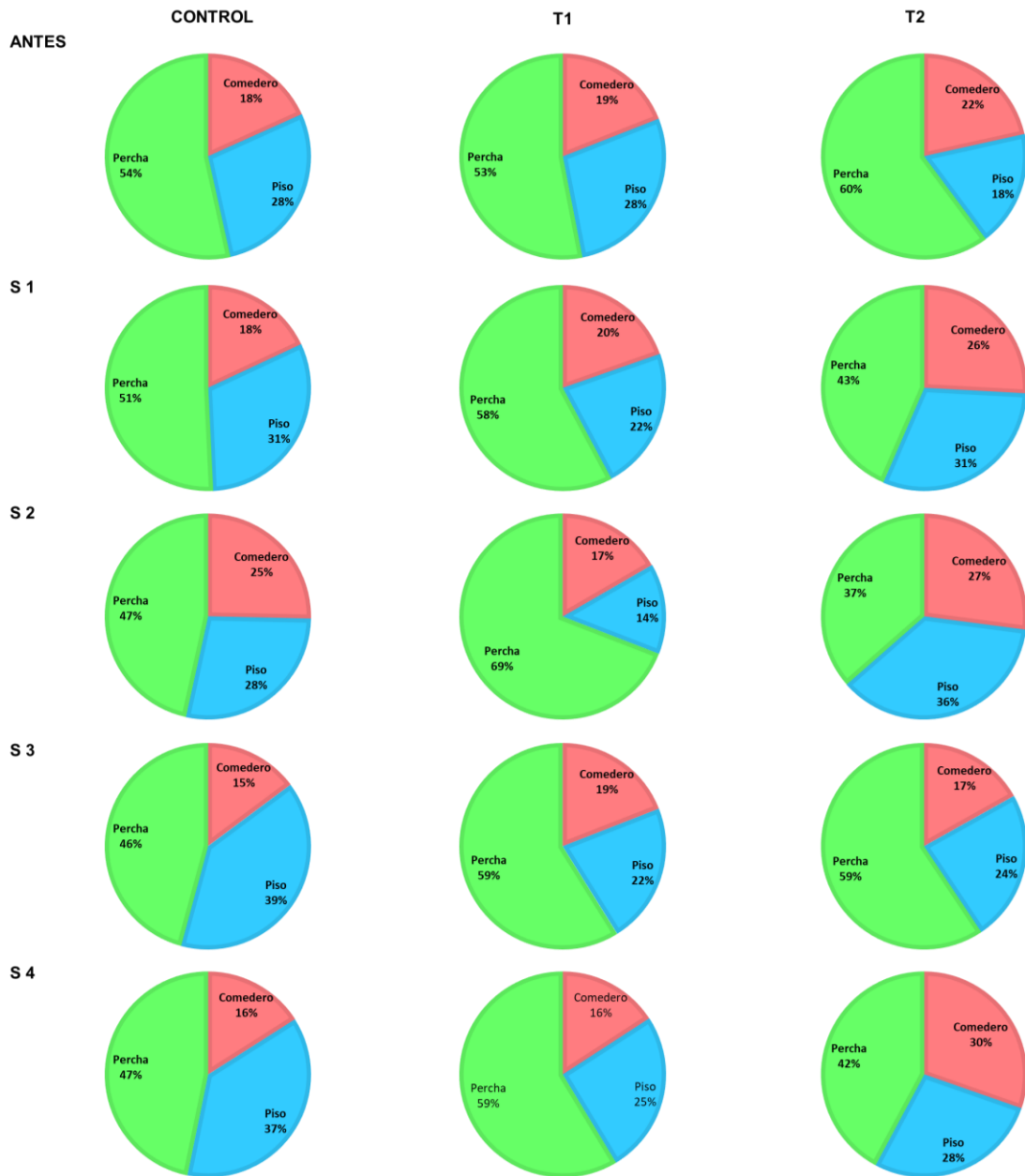
En la Figura 5.9 se presenta al análisis del comportamiento de las aves de cada tratamiento: antes de la exposición, y semanalmente durante las cuatro primeras semanas de exposición a las semillas tratadas con IMI. De manera complementaria, en la Figura 5.10, se ilustra la comparación de los porcentajes de tiempo que las aves de cada tratamiento permanecieron en el piso, en la percha o en el comedero. Como las filmaciones se realizaron a partir del sexto día de exposición a las semillas tratadas, en los análisis se incorporaron los datos de los dos individuos del grupo T2 que murieron luego del décimo día de exposición a las semillas tratadas.

Previo a la exposición a las semillas tratadas, se observó en los tres grupos experimentales que la mayor proporción del tiempo (entre 53 y 60% del tiempo) se encontraron ubicados en la percha, y el resto del tiempo repartidos entre el piso (entre 18 y 28% del tiempo) y el comedero (entre 18 y 22% del tiempo). De la misma manera, los individuos del grupo control permanecieron durante todo el experimento la mayor proporción del tiempo en la percha, y el resto del tiempo repartido en el piso y en el comedero.

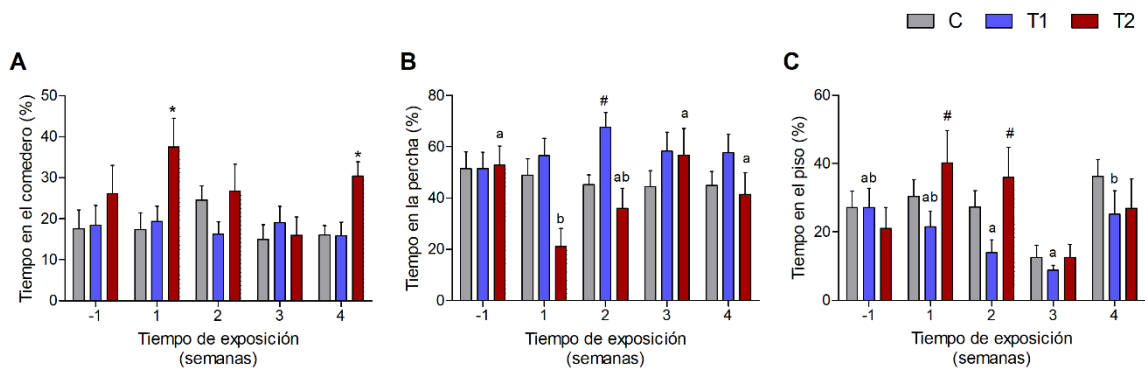
Los individuos del grupo T1 ocuparon la mayor proporción del tiempo en la percha, que siempre fue mayor al 50% del tiempo total, quedando el resto dividido entre tiempo en el comedero y el piso (Figura 5.9). La segunda semana del experimento, se registró el mayor tiempo de permanencia en la percha (69%), que fue significativamente mayor al tiempo registrado antes de la exposición a las semillas tratadas (Figura 5.10 B). La cuarta semana se observó un incremento significativo en el tiempo que las aves permanecieron en el piso respecto a las semanas 2 y 3.

Al igual que los otros 2 grupos experimentales, los individuos del grupo T2 permanecieron la mayoría del tiempo en la percha durante todo el experimento (Figura 5.9). Sin embargo, respecto al periodo previo a la exposición a las semillas tratadas, se observó una disminución significativa en la proporción del tiempo de permanencia en la percha la primera semana (Figura 5.10 B), que fue acompañado por un incremento significativo de la proporción de tiempo en el piso (Figura 5.10 C). Esta tendencia se mantuvo, además durante la segunda semana (Figura 5.10). Además, el tiempo que las

aves del grupo T2 permanecieron en el comedero fue mayor al observado en el resto de los grupos, y significativamente superior al grupo control las semanas 1 y 4 (Figura 5.10 A).



**Figura 5.9.** Comportamiento del tordo músico (*Agelaioides badius*) en la semana previa y durante la exposición a semillas tratadas con IMI. T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45g IMI/kg sem. S: semana.



**Figura 5.10.** Comportamiento de los individuos de *Agelaioides badius* en la semana previa y durante el periodo de exposición a semillas tratadas con IMI. A) proporción de tiempo en el comedero, B) proporción de tiempo en la percha, C) proporción de tiempo en el piso. C: control, T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45 g IMI/kg sem. \* indica diferencias significativas respecto al grupo control, # indica diferencias significativas dentro de cada tratamiento respecto a la semana previa a la exposición. Las letras indican diferencias significativas entre semanas dentro de cada tratamiento.

Combinando los resultados de todos los grupos experimentales, se pudo detectar una correlación positiva significativa entre la dosis de IMI ingerida por las aves y el tiempo que estas pasaban en el comedero en las semanas 1 y 4. Se observó, además, una correlación negativa significativa entre la dosis de IMI ingerida y el tiempo pasado en la percha durante la primera semana (Tabla 5.4).

**Tabla 5.4.** Correlación de Pearson entre las variables comportamentales del tordo músico (*Agelaioides badius*) evaluadas semanalmente, y la dosis diaria promedio de IMI ingerida a través del consumo de semillas tratadas durante 32 días. En *itálica* se indican las correlaciones significativas.

Dosis		Piso (%)	Comedero (%)	Percha (%)
<i>Semana 1</i>				
Dosis	<i>r</i>	0,269	<i>0,487</i>	<i>-0,486</i>
	<i>p</i>	0,137	<i>0,00474</i>	<i>0,00479</i>
	N	32	32	32
<i>Semana 2</i>				
Dosis	<i>r</i>	0,282	0,166	-0,319
	<i>p</i>	0,124	0,372	0,0802
	N	31	31	31
<i>Semana 3</i>				
Dosis	<i>r</i>	-0,153	-0,0228	0,156
	<i>p</i>	0,420	0,905	0,410
	N	30	30	30
<i>Semana 4</i>				
Dosis	<i>r</i>	-0,118	<i>0,474</i>	-0,120
	<i>p</i>	0,535	<i>0,00812</i>	0,527
	N	30	30	30

#### *Caracterización del nivel de movilidad cuando en la percha y en el piso*

Para sumar información sobre el comportamiento de las aves tratadas con IMI, se clasificó su movilidad como normal o reducida, para los periodos que pasaron en el piso o en la percha (Figura 5.11). En la percha, la movilidad normal se caracterizó por la postura erguida, el acicalamiento activo de las plumas, el canto, el desplazamiento a lo largo de la percha o picoteo de la misma, alternancia de intervalos cortos entre el piso y la percha, o entre la percha y los barrotes de la jaula (Figura 5.11 A). La movilidad reducida en la percha se caracterizó principalmente por la falta de postura erguida, como



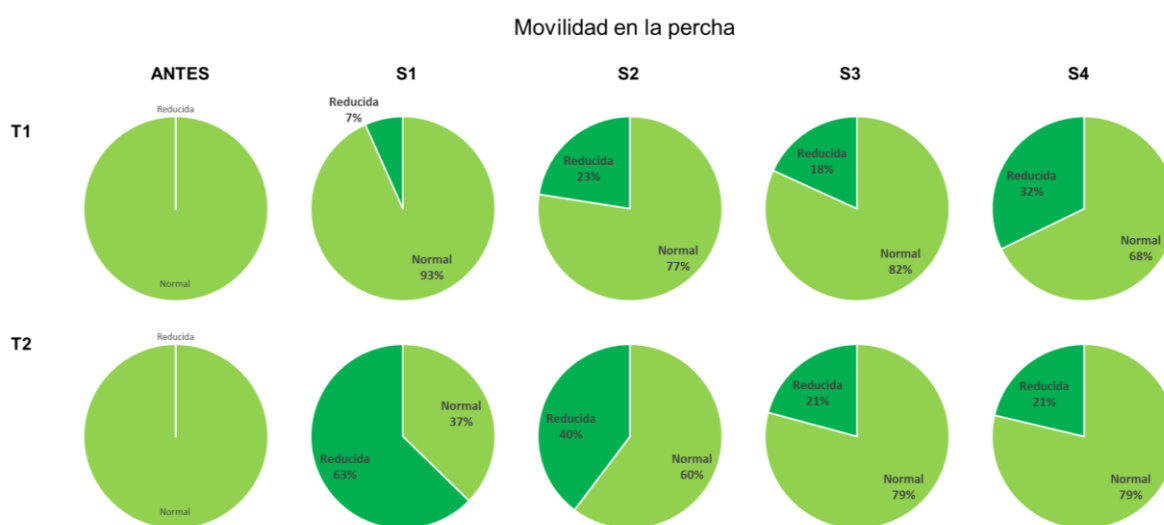
si el abdomen estuviera apoyado contra la percha, falta de acicalamiento o movimiento en la percha, y pérdida de equilibrio (Figura 5.11 B). En el piso, la movilidad normal se caracterizó por la postura erguida, el desplazamiento activo sobre el piso de la jaula, y el picoteo de los barrotes o del papel en la base de la jaula y el acicalamiento de las plumas (Figura 5.11 C). La movilidad reducida se registró cuando se observó a los tordos quietos o con poco desplazamiento en el piso, con falta de postura erguida: como si tocaran el piso con el abdomen, el pecho inflado y en ocasiones con los ojos entrecerrados (Figura 5.11 D).



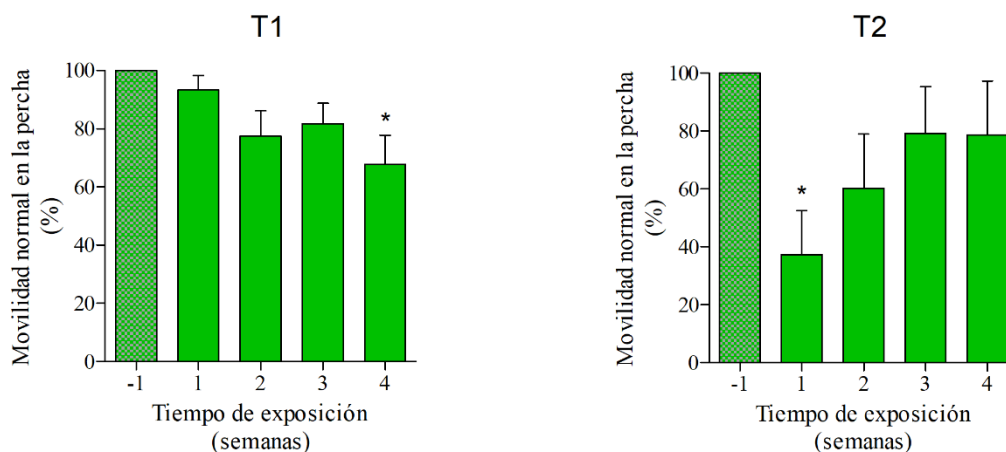
**Figura 5.11.** Aspecto general de las los tordos músicos durante el experimento. A: aspecto normal de las aves en la percha. B: aspecto en la percha de las aves expuestas a semillas tratadas. C: aspecto normal de las aves en el piso. D: aspecto en el piso de las aves expuestas a semillas tratadas.

Las Figuras 5.12 y 5.13 ilustran la movilidad de las aves de los tres grupos experimentales durante el tiempo que permanecieron en la percha y su comparación respecto a lo observado durante el periodo previo al experimento, respectivamente. En los análisis se consideraron los individuos del grupo T2 que murieron pasados los 10 días de exposición a las semillas tratadas.

El nivel de actividad en la percha del grupo control se mantuvo estable durante todo el experimento (datos no ilustrados), y lo mismo sucedió en el periodo pretratamiento para los grupos T1 y T2. Los individuos del grupo T1 presentaron una reducción gradual de la movilidad en el tiempo, los valores de movilidad alcanzaron niveles significativamente inferiores al periodo previo al experimento en la semana 4 de exposición a IMI (Figura 5.13, T1). De manera similar, los individuos del grupo T2 también presentaron una reducción de su movilidad en la percha, pero en este caso, la dinámica temporal fue al revés: el efecto fue muy claro la primera semana y se fue gradualmente atenuando.



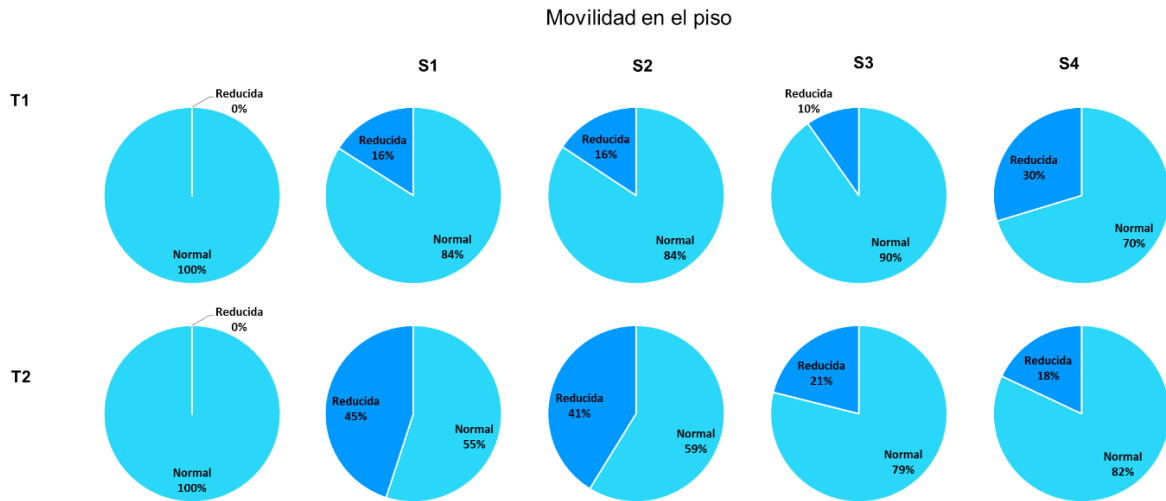
**Figura 5.12.** Movilidad en la percha del tordo músico (*Agelaioides badius*) durante la exposición a semillas tratadas con distintas concentraciones de IMI. T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45g IMI/kg sem. S: semana.



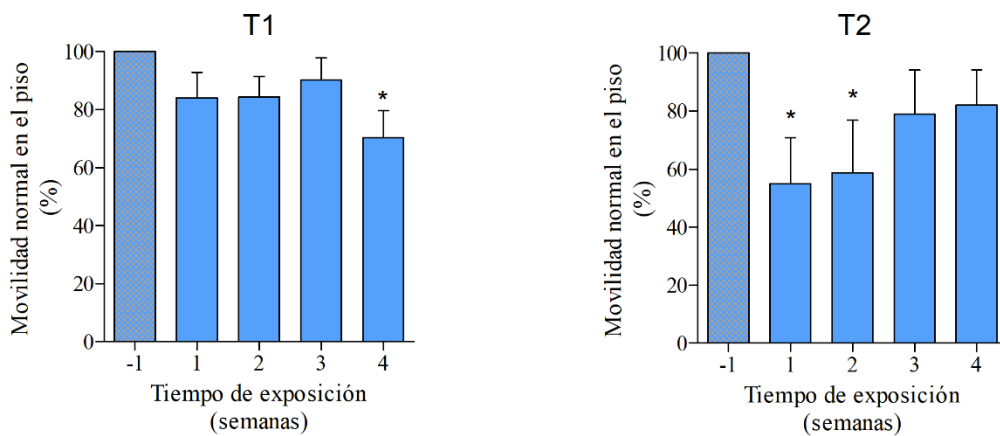
**Figura 5.13.** Movilidad de los individuos de *Agelaioides badius* en la percha durante el periodo de exposición a semillas tratadas con IMI. T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45g IMI/kg sem. \* indica diferencias significativas respecto a la semana previa a la exposición.

En las Figuras 5.14 y 5.15 se ilustra la movilidad de las aves durante el tiempo que permanecieron en el piso y la comparación de este valor semanal con el periodo previo al experimento, respectivamente. En los análisis se consideraron los individuos del grupo T2 que murieron pasados los 10 días de exposición a las semillas tratadas.

Los individuos del grupo control presentaron 100% de movilidad normal durante todo el experimento. Como se había observado con respecto a la movilidad en la percha, los individuos del grupo T1 presentaron una reducción gradual de su movilidad en el piso respecto al periodo previo al experimento (Figura 5.14) que fue máxima la semana 4, y significativamente menor respecto al periodo pretratamiento (Figura 5.15, T1). Por su parte los individuos del grupo T2 también disminuyeron significativamente su movilidad en el piso durante las dos primeras semanas de exposición a las semillas tratadas pero su movilidad se fue gradualmente recuperando y, hacia el final del experimento, los tordos presentaron movilidad normal más del 80% del tiempo (Figura 5.14).



**Figura 5.14.** Movilidad en el piso del tordo músico (*Agelaioides badius*) durante la exposición a semillas tratadas con distintas concentraciones de IMI. T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45g IMI/kg sem. S: semana.

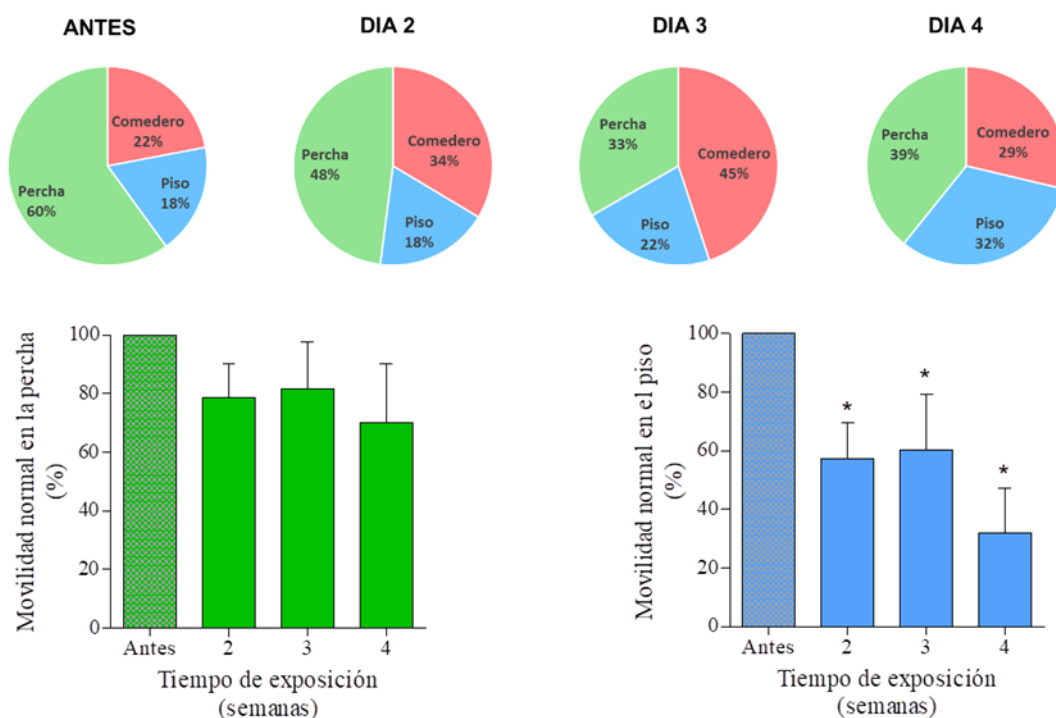


**Figura 5.15.** Movilidad de los individuos de *Agelaioides badius* en el piso durante el periodo de exposición a semillas tratadas con IMI. T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45g IMI/kg sem. \* indica diferencias significativas respecto a la semana previa a la exposición.

### *Efectos tempranos sobre el comportamiento en el grupo T2*

A partir de las 24 horas, los individuos del grupo T2 presentaron severos signos de intoxicación como plumas erizadas y ojos entrecerrados, quietud, falta de equilibrio y en ocasiones se los observó caerse de la percha y presentar dificultad para reincorporarse. Como los estudios comportamentales estaban programados a partir del sexto día de exposición a las semillas tratadas (semana 1), se realizaron filmaciones extras para evaluar los efectos tempranos del IMI sobre el comportamiento. Los tordos del grupo T2 fueron filmados los días 2, 3 y 4 de exposición a las semillas tratadas. En la Figura 5.16 se presentan, para cada día, la distribución del tiempo de las aves entre los distintos sectores de la jaula y la movilidad de las aves en el piso y en la percha. En los análisis se incluyó a los individuos que murieron durante el experimento, aunque no se consideraron los datos de comportamiento relevados en el día en que murieron las aves.

En general se observó una tendencia hacia la disminución del tiempo que las aves permanecían en la percha. A su vez, los tordos incrementaron el tiempo que permanecían en el comedero, y en menor medida en el piso. Sin embargo, las diferencias en el comportamiento no fueron significativas estadísticamente respecto al periodo pretratamiento. Respecto a la movilidad, en el piso se observó una reducción de la movilidad de las aves significativa respecto al periodo pretratamiento. En la percha la variabilidad entre los individuos fue muy alta, y aunque no existieron diferencias significativas respecto a la semana pretratamiento, se observó una tendencia hacia la disminución de la movilidad con el tiempo, que se corresponde con los resultados obtenidos a partir de la primera semana de exposición presentados en las Figuras 5.9, 5.12 y 5.14. Como la presencia en la percha disminuyó, es probable que los individuos más afectados se encontraran en el suelo en vez de la percha, lo que explica que los efectos sean más claros en esta ubicación.



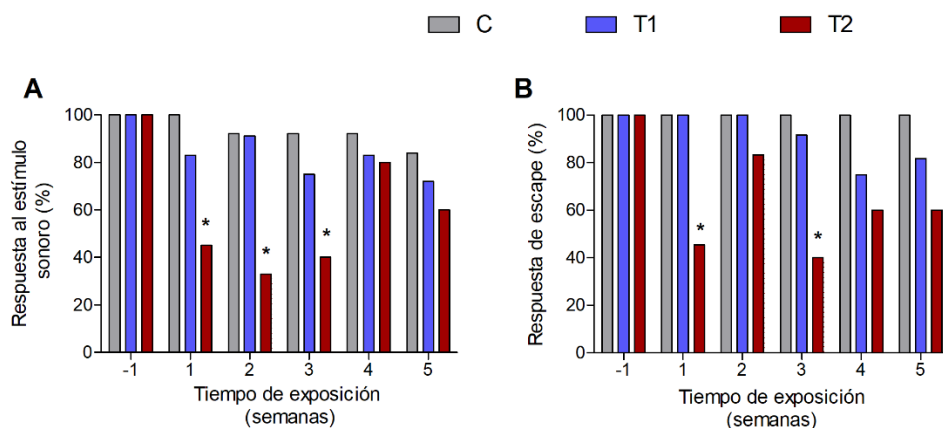
**Figura 5.16.** Comportamiento y movilidad, de los tordos músico (*Agelaioides badius*) del grupo T2 los días 2, 3 y 4 de exposición a semillas tratadas con IMI. T2: 0,45 g IMI/ kg sem. \*indica diferencias significativas respecto a la semana previa a la exposición.

### 5.3.7. Prueba de respuesta al predador y escape

La Figura 5.16 A representa el porcentaje de respuesta de los tordos al canto de un predador natural. Antes del inicio del experimento, el total de los individuos reaccionó al estímulo sonoro levantando la cabeza y/o irguiendo la postura en dirección al sonido y en ocasiones saltando de manera abrupta. Las primeras tres semanas de exposición los individuos del grupo T2 disminuyeron la respuesta de alerta ante un potencial predador, respecto al resto de los tratamientos. En los análisis se consideraron los individuos del grupo T2 que murieron, excepto los que murieron el día en el que se realizó la prueba. No se observaron diferencias significativas en la respuesta en los individuos del grupo control y T1.

La Figura 5.16 B representa de manera similar la respuesta de escape como la capacidad de los tordos de volar y alejarse cuando una persona se aproximaba. En este caso se observó una disminución de la respuesta de escape significativa de los tordos del

grupo T2 las semanas 1 y 3. Los individuos del grupo control y T1, no presentaron diferencias significativas en la respuesta de escape entre el periodo previo y posterior a la exposición a las semillas tratadas.



**Figura 5.16.** Respuesta de *Agelaioides badius* expuesto a semillas tratadas con IMI, a distintos estímulos. A) respuesta de alerta al estímulo sonoro que simula a un predador natural. B) respuesta de escape y capacidad de percharse ante la aproximación de una persona a la jaula. \* indica diferencias significativas respecto a la semana previa a la exposición. C: control, T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45g IMI/kg sem.

### 5.3.8. Parámetros hematológicos

En las Tabla 5.5 se enlistan los parámetros hematológicos evaluados. Ninguno de los parámetros analizados presentó diferencias significativas entre los tratamientos, y solo se observó una correlación positiva significativa del porcentaje de monocitos con la dosis diaria promedio (Tabla 5.6).

**Tabla 5.5.** Efecto del tratamiento de semillas con IMI sobre parámetros hematológicos (promedio  $\pm$  E.E.) de *Agelaioides badius*. RE= recuento de eritrocitos; HTC= hematocrito; Hb= hemoglobina; VCM= volumen corpuscular medio; HCM= hemoglobina corpuscular media; CHCM= concentración de hemoglobina corpuscular media. T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45g IMI/kg sem.

	Control	T1	T2
<i>RE</i> ( $10^{12}/L$ )	3,80 $\pm$ 0,21	3,90 $\pm$ 0,21	3,61 $\pm$ 0,32
<i>HTC</i> (%)	48,8 $\pm$ 2,04	49,4 $\pm$ 2,72	45,6 $\pm$ 2,79
<i>Hb</i> (g/dL)	16,9 $\pm$ 0,83	15,9 $\pm$ 1,38	14,4 $\pm$ 0,33
<i>VCM</i> (fL)	13,5 $\pm$ 0,57	12,6 $\pm$ 0,64	13,1 $\pm$ 1,59
<i>HCM</i> (pg)	45,3 $\pm$ 2,06	41,2 $\pm$ 3,17	41,1 $\pm$ 3,51
<i>CHCM</i> (g/dL)	33,6 $\pm$ 0,80	32,5 $\pm$ 1,48	31,9 $\pm$ 1,35
<i>Recuento de leucocitos</i> (‰)	2,53 $\pm$ 0,39	2,17 $\pm$ 0,22	1,50 $\pm$ 0,22
<i>Heterófilos</i> (%)	32,2 $\pm$ 6,48	43,0 $\pm$ 6,19	45,7 $\pm$ 7,33
<i>Linfocitos</i> (%)	64,8 $\pm$ 6,33	54,9 $\pm$ 6,07	51,3 $\pm$ 7,32
<i>Eosinófilos</i> (%)	2,19 $\pm$ 0,61	1,29 $\pm$ 0,26	1,48 $\pm$ 0,56
<i>Basófilos</i>	0,76 $\pm$ 0,63	0,54 $\pm$ 0,27	1,09 $\pm$ 0,71
<i>Monocitos</i> (%)	0,041 $\pm$ 0,041	0,31 $\pm$ 0,17	0,39 $\pm$ 0,29
<i>Policromasia</i> (%)	12,9 $\pm$ 1,58	12,6 $\pm$ 1,61	11,1 $\pm$ 0,78



**Tabla 5.6.** Correlación de Pearson obtenida entre los parámetros hematológicos e índices eritrocitarios del tordo músico (*Agelaioides badius*) y la dosis diaria promedio de IMI ingerida a través del consumo de semillas tratadas por 32 días. RE= recuento de eritrocitos; HTC= hematocrito; Hb= hemoglobina; VCM= volumen corpuscular medio; HCM= hemoglobina corpuscular media; CHCM= concentración de hemoglobina corpuscular media.

Parámetros hematológicos vs Dosis diaria promedio	<i>r</i>	<i>p</i>	N
<i>RE</i>	-0,142	0,481	27
<i>HTC</i>	-0,176	0,36	29
<i>Hb</i>	-0,264	0,183	27
<i>VCM</i>	-0,0023	0,991	27
<i>HCM</i>	-0,124	0,538	27
<i>HCMC</i>	-0,144	0,473	27
<i>Recuento de leucocitos</i>	-0,262	0,178	28
<i>Heterófilos</i>	0,0807	0,683	28
<i>Linfocitos</i>	-0,113	0,566	28
<i>Eosinófilos</i>	0,317	0,100	28
<i>Basófilos</i>	-0,0333	0,867	28
<i>Monocitos</i>	0,412	0,0293	28
<i>Policromasia</i>	-0,129	0,512	28

### 5.3.9. Genotoxicidad

La Tabla 5.7 muestra los valores obtenidos con respecto a los parámetros de genotoxicidad. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, y no se observó correlación significativa entre los parámetros de genotoxicidad y la dosis diaria promedio de IMI (Tabla 5.8).

**Tabla 5.7.** Efecto del tratamiento de semillas con IMI sobre parámetros de genotoxicidad (promedio  $\pm$  E.E.) de *Agelaioides badius*. T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45g IMI/kg sem.

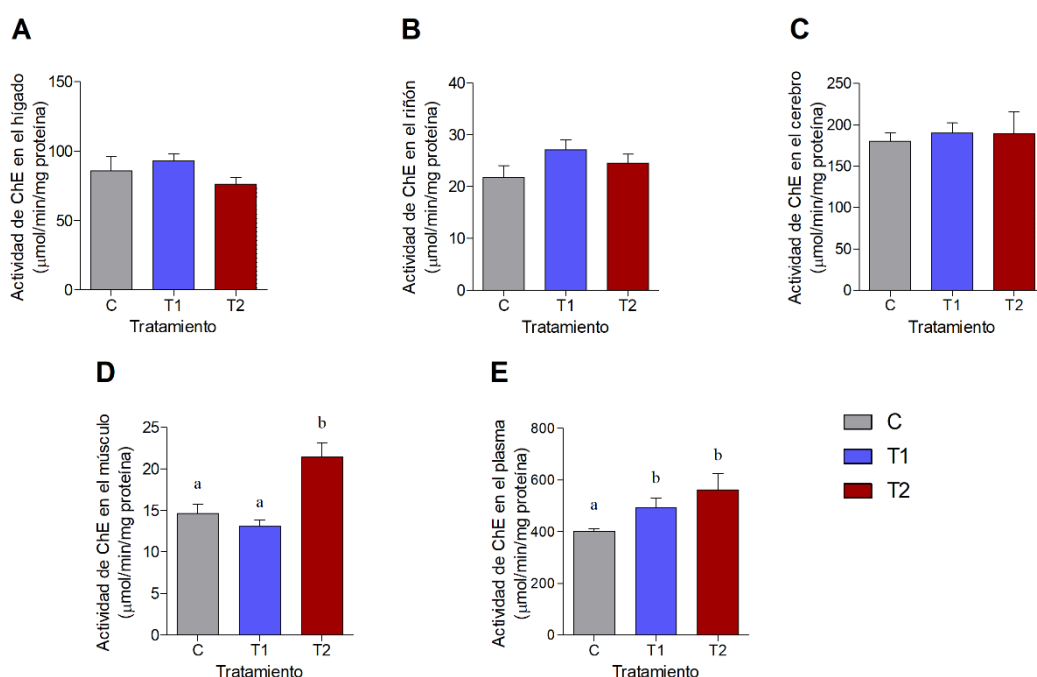
	Control	T1	T2
<i>Células binucleadas (%)</i>	1,92 $\pm$ 1,19	2,55 $\pm$ 1,97	1,40 $\pm$ 0,763
<i>Micronúcleos (%)</i>	0,488 $\pm$ 0,16	1,092 $\pm$ 0,28	0,84 $\pm$ 0,75

**Tabla 5.8.** Correlación de Pearson obtenida entre los parámetros de genotoxicidad del tordo músico (*Agelaioides badius*) y la dosis diaria promedio de IMI ingerida a través del consumo de semillas tratadas por 32días.

Parámetros de genotoxicidad vs Dosis diaria promedio	<i>r</i>	<i>p</i>	N
<i>Células binucleadas</i>	-0,154	0,434	28
<i>Micronúcleos</i>	0,0368	0,853	28

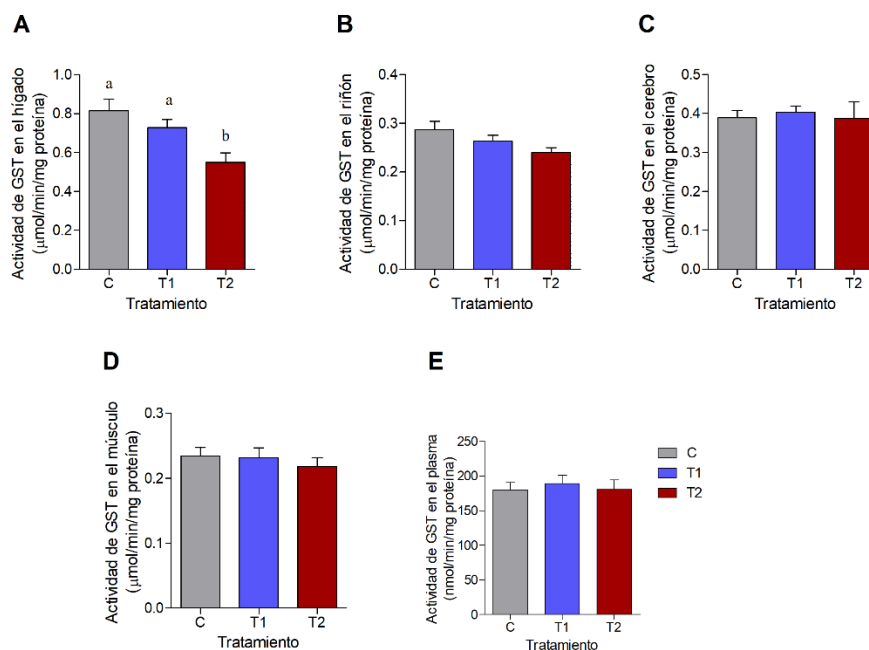
### 5.3.10. Actividad enzimática

En la Figura 4.17 se ilustra la actividad de las ChE medida en diferentes tejidos y en el plasma. La actividad de las ChE se encontró aumentada en el músculo de los individuos tratados del grupo T2; mientras que, en el plasma, en ambos tratamientos con IMI se observó un incremento significativo de la actividad enzimática. La actividad de la ChE en el músculo y en el plasma presentó correlación positiva significativa con la dosis diaria promedio de IMI (Tabla 9).



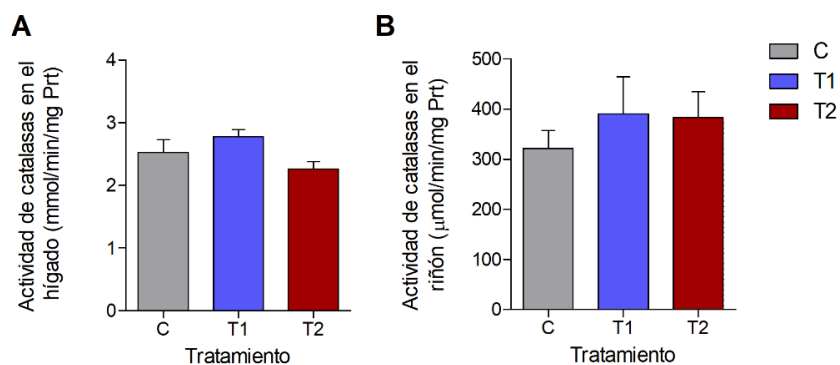
**Figura 5.17.** Actividad de las enzimas ChE en distintos tejidos y en el plasma (promedio  $\pm$  E.E) del toro músico (*Agelaioides badius*) alimentados con semillas tratadas con IMI durante 32 días. A) hígado; B) riñón; C) cerebro; D) músculo; E) plasma. C: control, T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45g IMI/kg sem. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En la Figura 5.18 se presenta la actividad de la enzima GST en los tejidos colectados y en el plasma. La actividad de la enzima GST se encontró disminuida en el hígado de los toros del grupo T2 respecto al resto de los tratamientos (Fig. 5.14A). Al mismo tiempo se observó una correlación negativa significativa con la dosis diaria promedio de IMI (Tabla 5.9). En el resto de los tejidos y plasma, no se observaron diferencias significativas de la actividad de GST entre los tratamientos, o correlación con la dosis.



**Figura 5.18.** Actividad de la enzima GST en el plasma y en distintos tejidos (promedio  $\pm$  E.E) del toro músico (*Agelaioides badius*) alimentados con semillas tratadas con IMI durante 32 días. A) hígado; B) riñón; C) cerebro; D) músculo; E) plasma. C: control, T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45g IMI/kg sem. Las letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los gráficos que no incluyen letras no presentan diferencias significativas entre los tratamientos.

La actividad de la enzima CAT se midió en el hígado y en el riñón (Figura 5.19). No se observaron diferencias significativas en la actividad de la CAT en ninguno de los tejidos, entre los tratamientos, ni correlación con la dosis diaria promedio de IMI (Tabla 5.9).



**Figura 5.19.** Actividad de la enzima CAT en tejidos (promedio  $\pm$  E.E) en A) hígado y B) riñón, del toro músico (*Agelaioides badius*) alimentados con semillas tratadas con IMI durante 32 días. C: control, T1: 0,053 g IMI/kg sem., T2: 0,45 g IMI/kg sem.

**Tabla 5.9.** Correlación de Pearson obtenida entre la actividad enzimática en el plasma y distintos tejidos del tordo músico (*Agelaioides badius*), y la dosis diaria promedio de IMI ingerida a través del consumo de semillas tratadas por 32 días.

	Dosis diaria promedio		
	<i>r</i>	<i>p</i>	N
Actividad de ChE			
<i>Hígado</i>	-0,0943	0,633	28
<i>Cerebro</i>	-0,173	0,37	29
<i>Riñón</i>	0,0056	0,977	29
<i>Músculo</i>	0,613	0,0004	29
<i>Plasma</i>	0,476	0,0091	29
Actividad de GST			
<i>Hígado</i>	-0,455	0,0131	29
<i>Cerebro</i>	-0,222	0,247	29
<i>Riñón</i>	-0,206	0,283	29
<i>Músculo pecho</i>	-0,313	0,098	29
<i>Plasma</i>	-0,0041	0,983	29
Actividad de CAT			
<i>Hígado</i>	-0,263	0,167	29
<i>Riñón</i>	0,011	0,961	23

### 5.3.11. NOAEL y LOAEL de los efectos observados

La dosis diaria promedio más baja que causó alteraciones en las respuestas de los individuos respecto a los grupos control fue determinada como LOAEL (*low observed adverse effect level*), mientras que la dosis más baja a la cual no se observaron diferencias respecto al grupo control se determinó como NOAEL (*no observed adverse effect level*).

**Tabla 5.10.** Dosis diaria de IMI a la que no se observaron efectos adversos (NOAEL) y a la que se observaron efectos adversos (LOAEL) en *Agelaioides badius* expuestos a semillas tratadas. T1: 6,79 mg IMI/kg pc/día estimado a partir del tratamiento de semillas 0,053 mg IMI/kg sem.; T2: 49,6 mg IMI/kg pc/día estimado a partir del tratamiento de semillas de 0,45 mg IMI/kg sem.

Efecto	NOAEL	LOAEL
↓ <i>Consumo diario</i>	T1	T2
↓ <i>Peso corporal</i>	T1	T2
↑ <i>Tiempo en el comedero</i>	T1	T2
↓ <i>Movilidad en la percha</i>		T1
↓ <i>Movilidad en el piso</i>		T1
↓ <i>Respuesta al predador</i>	T1	T2
↓ <i>Respuesta de escape</i>	T1	T2
↑ <i>ChE músculo</i>	T1	T2
↑ <i>ChE plasma</i>		T1
↓ <i>GST hígado</i>	T1	T2

En la Tabla 5.10 se resumen los efectos del IMI en los parámetros evaluados en los tordos músico expuestos a semillas tratadas durante 32 días. Dentro de los parámetros comportamentales evaluados, el más sensibles fue la movilidad en el piso y en la percha. Se observó una disminución en la movilidad de las aves en los dos tratamientos: mientras las aves del grupo de T2 se observaron afectadas dentro de las primeras dos semanas de exposición a las semillas tratadas, el efecto en los individuos del grupo T1 fue más marcado las últimas semanas de exposición. La actividad de las ChE en el plasma fue el parámetro enzimático analizado más sensible y se observó un aumento de la actividad con la dosis de IMI. Para la movilidad y la actividad de las ChE se determinó el LOAEL como la concentración diaria correspondiente al T1: 6,79 mg IMI/kg pc/día.

Para las variables como el consumo diario, la disminución del peso corporal, el tiempo en el comedero, las respuestas al predador y de escape, así como los niveles de actividad de Che en el músculo y de GST en el hígado, se estableció la dosis del T1 como el NOAEL y la dosis del T2 como LOAEC (49,6 mg IMI/kg pc/ día). Se observó una disminución del consumo diario, el peso corporal, la respuesta ante un predador y de escape, y de la actividad de la enzima GST en el hígado. Por otro lado, la dosis del T2 generó un aumento del tiempo que pasaron las aves en el comedero, y lo mismo sucedió con la actividad enzimática de la ChE en el músculo.

#### **5.4. DISCUSION**

En este trabajo se demostró que el consumo prolongado de semillas tratadas con el 15% de las concentraciones de IMI comúnmente utilizadas para el tratamiento de las semillas de los principales cultivos de la región pampeana causó la mortalidad del 60% las aves, y las que sobrevivieron presentaron alteraciones en los parámetros bioenergéticos, comportamentales y bioquímicos. La exposición a semillas tratadas con el 1,8% de la concentración regular de IMI, causó la mortalidad del 8,3% de las aves, y las que sobrevivieron presentaron alteraciones comportamentales y en los parámetros bioquímicos.

La principal mortalidad ocurrió en el grupo T2, y los individuos que murieron ingirieron diariamente el 78% de la DL50 (57,11 mg IMI/kg pc). La mortalidad obtenida en este estudio fue 30% mayor a la obtenida en el capítulo 3 de esta tesis, a pesar de que las aves recibieron las semillas tratadas con las mismas concentraciones de IMI. La diferencia en la mortalidad entre ambos estudios se corresponde con la dosis diaria de IMI ingerida, que fue mayor en este estudio (80,2 vs 59% de la DL50). Estas diferencias en las dosis ingeridas se deben al hecho de que las aves este estudio presentaron, de manera general y en todos los grupos experimentales, un consumo diario de semillas entre el 7 y 15% mayor al de las aves que recibían semillas con un tratamiento similar en el capítulo 3 (15, 16 y 7% para los grupos control T1 y T2 respectivamente). Considerando que las aves fueron extraídas del ambiente, es probable que la diferencia observada en el consumo se deba a la variabilidad del grupo experimental y a su nivel de aclimatación al cautiverio. Las aves utilizadas en este trabajo tuvieron periodo de aclimatación más largo,



respecto a las aves utilizadas previamente, a pesar de que las aves de ambos ensayos pasado por un periodo de aclimatación.

Respecto al consumo de semillas tratadas, las aves del grupo T2 disminuyeron su consumo significativamente los tres primeros días de exposición. Como fue reportado previamente, la ingesta de IMI provoca malestar digestivo y disminuye el de apetito, y en consecuencia las aves reducen su consumo (Avery et al., 1993; Eng et al., 2017). En general todos los grupos presentaron oscilaciones en el consumo diario, sin embargo, en los tordos expuestos a la dosis más alta, las oscilaciones fueron más pronunciadas y su consumo varió entre el 46 y 170% respecto al consumo promedio del grupo. Lo que podría estar sucediendo es que, ante el malestar generado por el IMI, los tordos disminuyen su consumo de alimento (Avery et al., 1993; Lopez-Antia et al., 2014, 2015). En consecuencia, se reduciría o detendría temporalmente la cantidad de IMI que ingresa al organismo, facilitando la eliminación del IMI circulante que ocurre entre las 12 y las 48 horas (capítulo 2 de esta tesis, Roy *et al.*, 2020; Bean *et al.*, 2019). La eliminación parcial del IMI, genera una mejora temporal en las aves (Addy-Orduna et al., 2019; Franzen-Klein et al., 2020), haciendo que los tordos se recuperaran y volvieran a ingerir alimento, y por ende IMI, esta vez en mayor cantidad para compensar el ayuno parcial. De hecho, en todos los días de máximo consumo de semillas, las aves del grupo T2 ingirieron una dosis de IMI igual o mayor a la DL50 (determinada en el Capítulo 1). En el ambiente, el aumento del consumo de semillas tratadas post ayuno implica un riesgo de mortalidad para las aves. Incluso en el mejor de los casos, la ingesta de una dosis subletal volvería a causar malestar y repetir el ciclo. Es importante destacar, que en el capítulo 3 de esta tesis se obtuvieron resultados similares respecto al consumo de T2. Se observó una disminución en el consumo los primeros tres días, y a partir del cuarto día se observaron las mismas oscilaciones con picos de consumo los días 4 y 7. Como el tiempo de exposición fue solo de siete días, no se pudo evaluar las recuperaciones parciales en el consumo, que si se observaron en este trabajo. Cabe mencionar que las aves expuestas a la dosis más baja de IMI, no presentaron diferencias significativas en el consumo respecto al grupo control, lo que significa que el consumo diario no se ve afectado si las semillas son tratadas con concentraciones por debajo de 0,053g IMI/ kg sem.

En este estudio, el uso de concentraciones inferiores a las comúnmente utilizadas en la práctica para el tratamiento de semillas de cultivo, permitió simular un escenario en el cual solo el 1,8 o 15% de las semillas consumidas estarían tratadas, el resto del consumo

consistiendo, teóricamente, de semillas sin tratar. El diseño experimental de este trabajo permitió así evaluar los efectos de la ingesta de una dosis subletal de IMI simulando una situación real, con la ventaja de poder estimar precisamente la dosis diaria ingerida por cada individuo, y relacionarla con los efectos subletales. Efectivamente, se dificulta muchísimo obtener valores precisos de ingestión de IMI cuando se ofrecen al mismo momento semillas tratadas y sin tratar. El hecho de que las aves del grupo T1 siempre comieron la misma cantidad de semillas que el grupo control, y que las aves del grupo T2 ingirieron una cantidad considerable de semillas luego de los ayunos parciales (y en conjunto con los resultados obtenidos en los Capítulos 1 y 3 de esta tesis), refuerzan la hipótesis de que los tordos músicos no presentan aversión innata por las semillas tratadas con IMI. En el ambiente, la falta de aversión inicial incrementa el riesgo de intoxicación, ya que las aves no son capaces de distinguir las semillas tratadas de las sin tratar (Lopez-Antia et al., 2014). El riesgo es aún mayor si se considera que, luego de una disminución en la ingesta de alimento, las aves tienden a compensar el ayuno parcial incrementando el consumo y en consecuencia incrementando la dosis de IMI ingerida. En este contexto sería interesante realizar experimentos en los que los tordos músicos puedan elegir entre semillas tratadas y sin tratar, para complementar la información obtenida hasta el momento.

La primera semana de exposición, las aves del grupo T2 disminuyeron su peso corporal y, luego de este periodo el peso se mantuvo constante. Posiblemente, la pérdida de peso inicial del grupo T2 sea debida a la disminución en la ingesta de semillas ocurrida los primeros días del ensayo. La pérdida de peso corporal en las aves tratadas con IMI fue observada en el tordo músico (Capítulo 3), y reportada para otras especies, asociándola a la disminución en el consumo de alimento (Lopez-Antia et al., 2014; Addy-Orduna et al., 2019; Eng et al., 2019; Franzen-Klein et al., 2020). La imposibilidad de recuperar el peso perdido podría deberse al gasto metabólico de eliminar y compensar los efectos del IMI en el organismo, como propone Eng et al., 2019 para el gorrion corona blanca. Si bien la variación del peso en los individuos del grupo T1 no fueron tan pronunciadas como las del grupo T2, las aves del grupo T1 disminuyeron su peso significativamente la última semana de exposición respecto a las dos primeras semanas de exposición. En las aves, el peso corporal está asociado a sus reservas energéticas (Labocha y Hayes, 2012), y la imposibilidad de recuperarlo podría implicar la imposibilidad de regenerar sus reservas energéticas con consecuencias negativas sobre las poblaciones, por ejemplo retrasando

las paradas durante la migración (Eng et al., 2019), o afectando su reproducción, ya que las aves deben invertir grandes cantidades de energía durante ese período (Williams y Ternan, 1999).

Las aves del grupo T1 y T2 distribuyeron su tiempo de manera diferente en los distintos sectores de la jaula que implicaron comportamientos específicos, en comparación al periodo pretratamiento y a los individuos del grupo control. Los individuos del grupo T1 tendieron a permanecer mayor tiempo en la percha y hacia el final del experimento incrementaron su tiempo en el piso. A su vez, se observó una disminución gradual de la movilidad en la percha y en el piso, que fue estadísticamente significativa la última semana de exposición. Por el contrario, los individuos del grupo T2 disminuyeron su tiempo en la percha e incrementaron el tiempo en el piso y en el comedero las primeras dos semanas de exposición, y la movilidad de las aves se observó reducida las primeras dos semanas tanto en la percha como en el piso. La exposición a IMI tuvo como principal efecto la disminución de la movilidad, que cuando fue significativa, coincidió con un incremento del tiempo de permanencia de las aves en el piso, en ambos tratamientos. La disminución de la movilidad está directamente relacionada con los efectos reportados del IMI sobre el sistema nervioso como pérdida de equilibrio o movimientos descoordinados, y disminución tonicidad muscular (Addy-Orduna et al., 2019; Eng et al., 2017; Franzen-Klein et al., 2020). La incorporación del análisis de movilidad en este estudio, respecto al Capítulo 3, permitió detectar efectos comportamentales a dosis muy bajas. Hasta el momento no se había documentado la movilidad de las aves expuestas a un periodo de tiempo prolongado al IMI. Las aves del grupo T1 presentaron disminución de la movilidad a partir de la cuarta semana de exposición, mientras las aves del grupo T2 lo hicieron al inicio de la exposición. La recuperación de la movilidad en los individuos del grupo T2 a partir de la tercera semana pudo deberse a la variabilidad individual en el comportamiento, sumado a la reducción del grupo experimental debido a las mortalidades ocurridas durante el experimento, que dejó a los individuos más resistentes. La disminución de la movilidad a partir de la cuarta semana, indica que la ingesta de bajas dosis de IMI genera efectos tardíos en las aves. Dado que a dosis bajas las aves no rechazan ni disminuyen su consumo, la aparición de alteraciones comportamentales tardías tiene implicancias ecológicas importantes ya que puede alterar procesos biológicos como la migración y la supervivencia, entre otros.

Respecto al tiempo que las aves permanecieron en el comedero, en este trabajo se observaron resultados similares a los obtenidos en el Capítulo 3 de esta tesis, las aves del grupo T2 permanecieron mayor tiempo en el comedero las primera y última semana, y ello no implicó un incremento en la cantidad de alimento ingerida. Los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan la hipótesis propuesta previamente, de que la exposición al IMI puede afectar la eficiencia de alimentación de los tordos al aumentar el tiempo que las aves necesitaron para ingerir la misma cantidad de semillas que el resto de los tratamientos. Las alteraciones que el IMI genera sobre el sistema nervioso y en la placa neuromotora podría afectar la capacidad de las aves de manipular las semillas (Tomizawa y Casida, 2005; Simon-Delso *et al.*, 2015). En base a estos resultados, sería interesante realizar un estudio más detallado de la manipulación e ingestión de alimentos.

Hasta el momento este es el primer trabajo en demostrar que la ingesta de IMI disminuye la reacción de las aves ante la presencia de un potencial predador, así como la respuesta de escape. En el ambiente, las aves se encuentran expuestas la mayor parte del tiempo a los predadores. La vigilancia durante la alimentación en las aves gregarias como el tordo músico implican alzamientos de la cabeza a intervalos regulares en alerta ante la posible presencia de un predador (Devereux 2006). En las pruebas realizadas en este estudio, todos los individuos antes de la exposición a IMI reaccionaron ante el estímulo sonoro, ya fuera levantando solo la cabeza en dirección al sonido, irguiéndose o incluso saltando abruptamente en busca el origen del sonido. En los tordos expuestos a las concentraciones más altas de IMI, se observó a partir de la primera semana y hasta la tercera, una disminución en el porcentaje de individuos que reaccionaban al estímulo. Lo mismo se observó en la prueba de escape, ante la aproximación de una persona, las aves tratadas con las dosis más altas de IMI fueron incapaces de volar alejándose de la persona, demostrando una incapacidad física para alcanzar el refugio, una reacción instintiva. La falta de reacción ante el estímulo así como la incapacidad escaparse, probablemente sea debido a los efectos del IMI que provoca la inhibición del sistema nervioso autónomo, y podrían explicar los resultados observados en las aves (Tomizawa y Casida, 2005; Simon-Delso *et al.*, 2015).

Respecto a los valores hematológicos, se observó una correlación positiva en el número de monocitos respecto a la concentración de IMI. Los resultados obtenidos concuerdan con otros estudios, donde distintos parámetros inmunológicos se encontraron alterados por la exposición a IMI (Siddiqui *et al.* (2007), Balani *et al.*, (2011) Lopez-A

2013), indicando un efecto sobre la respuesta inmunológica. Sin embargo, el resto de los parámetros hematológicos evaluados no presentó alteraciones debidas a la exposición a IMI. Los parámetros de genotoxicidad evaluados tampoco resultaron afectados por la exposición a IMI, al igual que lo observado previamente (Capítulo 3), por lo que se puede concluir que la exposición al IMI no genera alteraciones en la frecuencia de MN o BNs en el tordo músico.

En el presente trabajo se encontró aumentada la actividad de las ChE en el músculo y en el plasma. En el músculo, solo los individuos del grupo T2 presentaron actividad elevada de ChEs, mientras que en el plasma, ambos grupos T1 y T2, presentaron actividad elevada respecto al control. Resultados similares fueron observados en plasma de paloma común expuesta al 7, 10 y 20% de su DL 50 (25-30 mg IMI/kg pc) durante 28 días, donde se observó un incremento de la actividad de las ChE que fue asociado a las alteraciones en el sistema de transmisión colinérgico (Abu Zeid, et al. 2019). En los experimentos realizados para esta tesis, los resultados respecto a la actividad de las ChE fueron variables. En el Capítulo 2 de esta tesis se observó una disminución en la actividad de las ChE en el músculo, y en el Capítulo 3 no se observaron diferencias entre los grupos experimentales. Sin embargo, considerando el conjunto de los resultados obtenidos, la alteración en la actividad de las ChEs refuerza la evidencia de que el IMI afecta el sistema nervioso, mediante la alteración de la actividad de las colinesterasas (Abu Zeid *et al.*, 2019; Kapoor *et al.*, 2014; Lonare *et al.*, 2014; Vohra *et al.*, 2014, Wang 2017; Annabi *et al.*, 2015).

La actividad de la enzima GST se encontró disminuida en el hígado en las aves del grupo T2, y se observó una correlación negativa significativa con la dosis de IMI, aunque la diferencia no fue significativa en el grupo T1. Considerando que la actividad de la enzima GST es variable (Drobne *et al.*, 2008), los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con los resultados obtenidos en los capítulos anteriores de esta tesis, donde la actividad de la GST se encontró alterada en músculo y plasma. Como ha sido reportado previamente para otras especies de aves, la alteración de la enzima GST podría ser un indicador daño oxidativo, aunque también podría deberse a su participación en la biotransformación de alguno de los productos de la degradación del IMI en el organismo (Revisado por Wang *et al.*, 2018).

Finalmente, con los resultados obtenidos se determinaron cuáles eran los parámetros más sensibles al efecto del IMI, mediante la determinación del NOAEL y LOAEL. Los parámetros más sensibles fueron la disminución de la movilidad, y la actividad de la colinesterasa en el plasma y el LOAEL se determinó en 6,79 mg IMI/ kg pc. El segundo grupo de parámetros cuya LOAEL se determinó en 49,6 mg IMI/ kg pc fueron: el consumo diario, el peso corporal, el tiempo de permanencia en el comedero y las actividades enzimáticas de ChE en músculo y GST en hígado.

Dado que las aves pueden encontrarse expuestas a repetidas exposiciones a semillas tratadas en los ambientes agrícolas, este estudio simuló un escenario donde las semillas tratadas con dosis reales representan una fuente de alimento para las aves. El consumo equivalente al 15% de la dieta como semillas tratadas causó la mortalidad de más del 60% de las aves (T2). Además, se registraron efectos subletales asociados a los requerimientos bioenergéticos como el consumo de semillas y el peso corporal que podrían comprometer la supervivencia y reproducción de las especies con hábitos similares a los del tordo músico. La aparición de efectos comportamentales tardíos, como la disminución de la movilidad en las aves del tratamiento más bajo, resaltan la importancia de los estudios prolongados en el tiempo, e implica la reconsideración de las dosis utilizadas como referencia a las cuales no se han observado efectos, especialmente cuando son utilizadas en los procesos regulatorios. Hasta el momento es la primera vez que se registran efectos comportamentales asociados a la eficiencia de alimentación y a la respuesta ante un peligro.

En este trabajo se demostró que si un tordo consume al menos el 1,8% de la dieta como semillas tratadas desencadena efectos subletales comportamentales y bioquímicos, y hasta puede alcanzar la muerte. La falta de aversión a las semillas tratadas y la aparición de efectos retardados a dosis bajas implica un riesgo para las de aves, ya que procesos biológicos esenciales como la reproducción, la migración o la supervivencia podrían verse alterados.

En los Capítulos previos de esta tesis se demostró que existe riesgo de toxicidad aguda y mortalidad para las aves, con consumos de tipo “feeding bout”, que implican eventos puntuales de alimentación. La observación de efectos que ocurrieron con el consumo continuo de dosis subletales (T1), indica que el IMI posee riesgo de toxicidad

crónica, principalmente a través de alteraciones comportamentales y de la capacidad de respuesta que podrían resultar perjudiciales para las poblaciones de aves.

## 6. DISCUSIÓN GENERAL

La Argentina es uno de los principales países exportadores de granos del mundo, en consecuencia, aproximadamente el 20% del territorio nacional está destinado a las actividades agrícolas (MAGyP, 2020). Desde la implementación de la soja transgénica en la década del 90, la siembra de cultivos genéticamente modificados ocupa la mayor parte de la superficie sembrada (Rainaud, 2019). A su vez, la implementación de los cultivos transgénicos trajo aparejado el uso de herbicidas, insecticidas y funguicidas, que mejoran el rendimiento (ArgenBio, 2020). Particularmente, la región pampeana es una de las áreas más productivas de la Argentina, y una de las más modificadas por las actividades agrícolas (Brown *et al.*, 2006; Viglizzo and Jobbaghy, 2012).

Uno de los grupos de insecticidas más utilizados en la agricultura son los neonicotinoides. El principal uso de los neonicotinoides es en el tratamiento de semillas, una práctica extensamente utilizada en la región pampeana y otras partes del mundo. Esta práctica representa un riesgo para las aves, y otros animales, ya que el consumo de semillas tratadas permite la ingestión de grandes cantidades de principio activo tóxico, con consecuencias perjudiciales (Mineau y Palmer, 2013). Además, al ser los agroecosistemas ambientes altamente disturbados, los eventos de siembra representan una fuente de alimento para las aves que lo habitan, lo que aumenta la probabilidad de que se alimenten de semillas tratadas (Benton *et al.*, 2003; Stanton *et al.*, 2018).

El trabajo realizado en esta tesis generó información de importancia para comprender el efecto perjudicial que tiene el uso del neonicotinoide imidacloprid (IMI) utilizado como curasemillas sobre la salud de las aves silvestres de la región pampeana. Los resultados obtenidos surgieron de estudios realizados con el tordo músico (*Agelaioides badius*), expuesto a diferentes concentraciones de imidacloprid durante distintos periodos de tiempo, lo que permitió simular escenarios como los que pueden encontrarse las aves que habitan en los agroecosistemas.

En el primer capítulo de esta tesis se demostró que el tratamiento de semillas con las concentraciones de IMI aprobadas para los principales cultivos extensivos de la región pampeana (SENASA, 2020), presenta un riesgo de letalidad para las aves pequeñas que habitan los agroecosistemas. Todas las líneas de evidencia analizadas: dosis letal media, consumo de semillas tratadas, porcentaje de la dieta consumido como semillas tratadas,



eventos de mortalidad, y disponibilidad de semillas en los lotes de cultivos, fueron consistentes y concluyeron que los tordos músico, se encuentran expuestos a un riesgo de intoxicación aguda y de mortalidad. Al ser una ave nativa, el uso del tordo músico como modelo experimental añadió realismo ambiental a los ensayos de laboratorio, y de alguna forma, los efectos del IMI pueden ser considerados como representativos de las aves pequeñas que habitan las zonas agrícolas de la región pampeana (Luttik *et al.*, 2011). Además, al ser el tordo una especie paseriforme, su uso aportó información toxicológica representativa sobre un grupo taxonómico que es considerado más sensible al efecto de los plaguicidas debido a su alto gasto metabólico (Mineau *et al.*, 1996b; Nagy, 2005). Esto implica que, en el ambiente, las aves paseriformes deben permanecer la mayor parte del tiempo alimentándose para suplir la demanda energética, y ese comportamiento aumenta la probabilidad de que las aves como el tordo músico, ingieran las semillas tratadas. Por otro lado, en los lotes de cultivo, las aves suelen encontrarse expuestas a diferentes ítems alimentarios, lo que dificulta que puedan distinguir y evitar las semillas tratadas (Lopez-Antia *et al.*, 2014). En conjunto, los resultados obtenidos en este capítulo refuerzan la evidencia sobre el riesgo que posee el IMI para las aves, en distintas partes del mundo (Mineau y Palmer, 2013; Lopez-Antia *et al.*, 2016; Addy-Orduna *et al.*, 2019; Eng *et al.*, 2019).

En el Capítulo 2, se observó que luego de una única ingesta oral, el IMI es rápidamente absorbido (i.e. antes de las 4 horas), y eliminado (i.e. a las 48 horas), y la presencia de IMI se detectó en todos los órganos evaluados (plasma, hígado y riñón). En paralelo, los tordos manifestaron signos comportamentales de intoxicación, y presentaron alteraciones en los parámetros bioquímicos y hematológicos analizados, a partir de las 4 horas desde la administración de la dosis, y que perduraron luego de la eliminación del IMI del organismo (i.e. a las 48 horas); entre ellos las actividades de las enzimas GST y ChE en varios de los órganos analizados. En el ambiente, las concentraciones testeadas de IMI podrían ser fácilmente ingeridas por las aves al consumir unas pocas semillas tratadas (Capítulo 1). La persistencia de efectos luego de la eliminación del IMI del organismo podría comprometer la supervivencia de las aves (Eng *et al.*, 2019). El entendimiento de los efectos subletales del IMI es de vital importancia a la hora de identificar y diagnosticar casos tempranos de intoxicación en el campo. A partir de este trabajo, se propone la determinación del IMI en el plasma como un biomarcador de exposición, que indica exposición reciente (antes de las 48 horas), o repetida a una fuente

de IMI. Además, la detección en el plasma presenta la ventaja de que es posible de realizar sin sacrificar el animal, algo que es prioritario para los estudios a campo y los trabajos con especies amenazadas (Fair *et al.*, 2010). En este trabajo, además, se establecieron protocolos experimentales que permitieron realizar determinaciones químicas utilizando volúmenes pequeños de sangre (20  $\mu$ L) algo que es muy valioso cuando se trabaja con aves pequeñas (<50g), como es el caso del tordo músico y otras especies paseriformes.

En los últimos dos capítulos de esta tesis, se alimentó a los tordos músicos con semillas tratadas con IMI, con concentraciones que representan respectivamente al 2 y 15% de una concentración promedio utilizada en el tratamiento de semillas, por un periodo de 7 y 32 días en los Capítulos 3 y 4, respectivamente. En ambos estudios, el uso de concentraciones de IMI inferiores a las comúnmente utilizadas en el tratamiento de semillas, permitió simular un escenario en el que solo el 2 o 15% de las semillas consumidas estarían tratadas, el resto del consumo consistiendo, teóricamente, de semillas sin tratar. El diseño experimental de este trabajo permitió así evaluar los efectos de la ingesta de una dosis subletal de IMI, con la ventaja de poder estimar precisamente la dosis diaria ingerida por cada individuo, y relacionarla con los efectos subletales.

En ambos tratamientos se observó mortalidad, principalmente en el tratamiento más alto (Capítulo 3 y 4). Entre las aves expuestas a la dosis más alta, la mortalidad ocurrió entre los 3 y 15 días, y a los 30 días en el tratamiento con la dosis más baja. Se ha documentado que las semillas tratadas pueden permanecer por más de 14 días en la superficie de los lotes de cultivo (Lennon *et al.*, 2020a), y que el ingrediente activo permanece hasta 30 días en las semillas antes de degradarse (Roy *et al.*, 2019), lo que indica que el consumo prolongado de semillas tratadas es un escenario posible en los campos de cultivo.

El estudio del consumo diario permitió conocer que los tordos presentan oscilaciones diarias en la cantidad de alimento ingerida (Capítulo 3 y 4). Los individuos expuestos al tratamiento más alto disminuyeron su consumo los primeros tres días, probablemente debido al malestar que genera el IMI luego de su ingesta, como ha sido reportado en otras especies (Avery *et al.*, 1993; Lopez-Antia *et al.*, 2015b). Además, en las aves del tratamiento más alto, se observaron oscilaciones pronunciadas en la cantidad diaria de alimento ingerido, que podrían deberse a que durante los periodos de menor consumo, el IMI es eliminado parcialmente (Capítulo 2 de esta tesis, Bean *et al.* 2019;

Roy *et al.* 2020). La eliminación del IMI resultaría en una mejora temporal de las aves (Addy-Orduna *et al.*, 2019; Franzen-Klein *et al.*, 2020), que incrementarían su consumo para compensar el ayuno parcial. En conjunto, estos resultados demostraron que las aves no evitan ingerir las semillas tratadas, y que el riesgo es mayor, si se considera que luego de una disminución en la ingesta de alimento, las aves tienden a compensar el ayuno parcial incrementando la dosis de IMI ingerida, que como se observó puede ser equivalente a la dosis necesaria para alcanzar la mortalidad (Capítulo 1).

Las aves expuestas a las semillas tratadas disminuyeron su peso corporal (Capítulo 3 y 4). Las aves del tratamiento más alto disminuyeron su peso la primera semana y luego se mantuvo constante. Por otro lado, las aves del tratamiento más bajo presentaron una tendencia hacia la pérdida de peso hacia el final del experimento, que podría estar indicando un efecto tardío del IMI a dosis bajas (Capítulo 4). Posiblemente, la pérdida de peso de las aves del tratamiento más alto sea debida a la disminución en la ingesta de semillas ocurrida los primeros días, como ha sido reportado en otras especies (Addy-Orduna *et al.*, 2019; Eng *et al.*, 2019; Franzen-Klein *et al.*, 2020; Lopez-Antia *et al.*, 2014). Por otro lado, la imposibilidad de recuperar el peso perdido podría deberse al gasto metabólico de eliminar y compensar los efectos del IMI en el organismo (Eng *et al.*, 2019). En las aves, el peso corporal está asociado a sus reservas energéticas (Labocha and Hayes, 2012). La imposibilidad de recuperar el peso podría implicar que las aves no puedan regenerar sus reservas energéticas con consecuencias negativas sobre las poblaciones, por ejemplo, retrasando las paradas durante la migración (Eng *et al.*, 2019), o afectando su reproducción (Williams and Ternan, 1999).

El consumo de semillas tratadas afectó negativamente el comportamiento de las aves. El seguimiento en el tiempo, y el estudio detallado del comportamiento de las aves en la jaula, permitió identificar efectos a dosis muy bajas (Capítulos 3 y 4). Principalmente, se observó en ambos tratamientos que las aves disminuyeron su movilidad, que coincidió con un incremento del tiempo de permanencia en el piso. En el tratamiento más alto, los efectos se manifestaron al inicio de la exposición, mientras que a dosis más bajas los efectos se observaron la cuarta semana, lo que indica un efecto tardío del IMI. Por otro lado, se observó una mayor permanencia del tiempo en el comedero de las aves de la dosis más alta, sin que ello implicara un incremento en la cantidad de alimento ingerida, lo que sugiere que el IMI podría afectar la manipulación de las semillas disminuyendo la eficacia de alimentación (Capítulos 3 y 4). En conjunto, las alteraciones

comportamentales observadas tienen implicancias ecológicas importantes: la aparición de efectos tardíos y la disminución de la movilidad, junto con la alimentación ineficiente, podrían resultar en alteraciones de los procesos biológicos como la supervivencia y la reproducción, entre otros.

De manera complementaria, en el Capítulo 4 se diseñaron pruebas comportamentales de respuesta a un predador y de escape. Hasta el momento este es el primer trabajo en demostrar que la ingesta de IMI disminuye la reacción de las aves ante la presencia de un potencial predador, así como la respuesta de escape, observada en las aves del tratamiento más alto. En el ambiente, las aves se encuentran expuestas la mayor parte del tiempo a los predadores, y la vigilancia y la respuesta de escape son esenciales para su supervivencia (Devereux *et al.*, 2006).

Tanto en los Capítulos 3 y 4 se detectaron alteraciones enzimáticas en las aves alimentadas con las semillas tratadas. La alteración en la actividad de las ChEs refuerza la evidencia de que el IMI afecta el sistema nervioso, mediante la alteración de la actividad de las colinesterasas (Abu Zeid *et al.*, 2019; Kapoor *et al.*, 2014; Lonare *et al.*, 2014; Vohra *et al.*, 2014, Wang 2017; Annabi *et al.*, 2015). Por otro lado, la actividad de la GST se encontró alterada en músculo y plasma. Como ha sido reportado previamente para otras especies de aves, la alteración de la enzima GST podría ser un indicador de daño oxidativo, aunque también podría deberse a su participación en la biotransformación de alguno de los productos de la degradación del IMI en el organismo (Revisado Wang *et al.* 2018). En conjunto con los resultados obtenidos en el Capítulo 2, ambas enzimas podrían ser consideradas como biomarcadores inespecíficos de efecto, y su uso debería ser complementado con otros parámetros indicadores de la salud de las aves.

## **CONSIDERACIONES FINALES**

La Región pampeana es habitada por al menos 300 especies de aves (Brown *et al.*, 2006), de las cuales casi 60 son especies paseriformes que habitan comúnmente los agroecosistemas (Giacomo and Casenave, 2010; Goijman *et al.*, 2015; Frutos *et al.*, 2016). En la zona núcleo, el clima templado y los suelos de la Región Pampeana de la Argentina permiten la siembra de al menos dos cultivos diferentes cada año (MAGyP, 2020), lo que implica que las aves podrían enfrentar el riesgo de mortalidad dos veces al año.

Los resultados obtenidos en esta tesis aportan información valiosa sobre los efectos que tiene un plaguicida de uso vigente sobre las aves nativas passeriformes de la región pampeana. Debe ser considerado que junto con las muertes causadas por la toxicidad del IMI, las aves silvestres también se encontrarían en peligro debido a los efectos subletales que genera. La reducción en la capacidad de buscar un refugio, o de escapar de un predador, sumadas a una condición corporal empobrecida, podría afectar la supervivencia de las aves en condiciones ambientales extremas, retrasando la migración, o afectando la reproducción. Además es importante mencionar que los predadores de las pequeñas aves también podrían verse afectados, considerando que se detectó IMI en la sangre de pichones de búho real (Taliensky-Chamudis *et al.*, 2017).

Con el objetivo de poder realizar diagnósticos de exposición a IMI en el campo, en este trabajo se desarrollaron protocolos para poder identificar biomarcadores de exposición y efecto, priorizando el uso de muestras no letales. El tamaño de las aves como el tordo músico, limita la cantidad de muestras que se pueden obtener sin dañar al individuo. En ese sentido, sería recomendable desarrollar a futuro biomarcadores más sensibles, priorizando las muestras no letales como sangre, heces, fluidos reproductivos, y plumas, y así poder cumplir mejor con los estándares de conservación y bienestar animal.

A partir del trabajo realizado, surge la necesidad de contar con información sobre el uso de plaguicidas en Argentina: información relacionada al uso por zona, tipo de cultivo o incluso si suele utilizarse en conjunto con otros compuestos que podrían generar nuevos efectos, o potenciar los observados (efectos aditivos y sinérgicos). De la misma manera, contar con un monitoreo de mortandades de aves, permitiría realizar evaluaciones de riesgo más precisas y predictivas, y facilitar la toma de decisiones por los organismos reguladores.

La falta de testeos en aves nativas es una debilidad del proceso regulatorio. Este trabajo de tesis aporta información sobre el efecto del IMI en las aves, a la vez que aporta protocolos experimentales, la implementación del tordo músico como modelo experimental, y propone biomarcadores que pueden ser utilizados para la detección de la exposición al imidacloprid en el campo. Los resultados de esta tesis refuerzan, con evidencias científicas, que el tratamiento de semillas es una práctica poco sostenible que puede perjudicar seriamente las poblaciones de aves. Al ser una práctica de uso

profiláctico, se recomienda suspender su uso o limitarse a casos extremos. Es fundamental que la información generada en este trabajo sea considerada por parte de los organismos gubernamentales de control para evitar mayores consecuencias en las poblaciones de aves que habitan los agroecosistemas.

## BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Abu Zeid, E.H., Alam, R.T.M., Ali, S.A., Hendawi, M.Y., 2019. Dose-related impacts of imidacloprid oral intoxication on brain and liver of rock pigeon (*Columba livia domestica*), residues analysis in different organs. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 167, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.121>
- Addy-Orduna, L.M., Brodeur, J.C., Mateo, R., 2019. Oral acute toxicity of imidacloprid, thiamethoxam and clothianidin in eared doves: A contribution for the risk assessment of neonicotinoids in birds. *Sci. Total Environ.* 650, 1216–1223. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.112>
- Addy-Orduna, L.M., Zaccagnini, M.E., Canavelli, S.B., Mineau, P., 2011. Formulated beta-cyfluthrin shows wide divergence in toxicity among bird species. *J. Toxicol.* 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/803451>
- Alimba, C.G., Bakare, A.A., 2016. In vivo micronucleus test in the assessment of cytogenotoxicity of landfill leachates in three animal models from various ecological habitats. *Ecotoxicology* 25, 310–319. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1589-3>
- Alonso, L.L., Demetrio, P.M., Agustina Etchegoyen, M., Marino, D.J., 2018. Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Sci. Total Environ.* 645, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.134>
- Anderson, J.C., Dubetz, C., Palace, V.P., 2015. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: A literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Sci. Total Environ.* 505, 409–422. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.090>
- Annabi, A., Dhouib, I.B., Lamine, A.J., Golli, N. El, Gharbi, N., Fazâa, S. El, Lasram, M.M., 2015. Recovery by N -acetylcysteine from subchronic exposure to Imidacloprid-induced hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis tissues injury in male rats. *Toxicol. Mech. Methods* 25, 524–531. <https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1045663>
- ArgenBio, 2020. Características de los cultivos transgénicos adoptados en Argentina

(19-04-2020) [WWW Document]. URL <http://www.argenbio.org/cultivos-transgenicos/12548-caracteristicas-de-los-cultivos-transgenicos-adoptados-en-argentina> (accessed 11.27.20).

Avery, M.L., Decker, D.G., Fischer, D.L., 1994. Cage and flight pen evaluation of avian repellency and hazard associated with imidacloprid-treated rice seed. *Crop Prot.* 13, 535–540. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(94\)90107-4](https://doi.org/10.1016/0261-2194(94)90107-4)

Avery, M.L., Decker, D.G., Fischer, D.L., Stafford, T.R., 1993. Responses of Captive Blackbirds to a New Insecticidal Seed Treatment. *J. Wildl. Manage.* 57, 652–656.

Badgajar, P.C., Jain, S.K., Singh, A., Punia, J.S., Gupta, R.P., Chandratre, G.A., 2013. Immunotoxic effects of imidacloprid following 28 days of oral exposure in BALB/c mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 35, 408–418. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.01.012>

Bal, R., Naziroğlu, M., Türk, G., Yilmaz, Ö., Kuloğlu, T., Etem, E., Baydas, G., 2012. Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochem. Funct.* 30, 492–499. <https://doi.org/10.1002/cbf.2826>

Balani, T., Agrawal, S., Thaker, A.M., 2011. Hematological and biochemical changes due to short-term oral administration of imidacloprid. *Toxicol. Int.* 18, 2–4. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.75843>

Balfour, N.J., Carreck, N.L., Blanchard, H.E., Ratnieks, F.L.W., 2016. Size matters: Significant negative relationship between mature plant mass and residual neonicotinoid levels in seed-treated oilseed rape and maize crops. *Agric. Ecosyst. Environ.* 215, 85–88. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.09.020>

Banasiak, U., 2000. Imidacloprid (206), Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA). Kleinmachnow, Germany.

Barbera, P., Benítez, J., 2016. Sorgo forrajero para pastoreo. EEA INTA Mercedes 2013 a 2016., Serie Técnica No 53. INTA Ediciones. Buenos Aires, Argentina.

Barnosky, A.D., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, G.O.U., Swartz, B., Quental, T.B., Marshall, C., McGuire, J.L., Lindsey, E.L., Maguire, K.C., Mersey, B., Ferrer,



- E.A., 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471, 51–57. <https://doi.org/10.1038/nature09678>
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M.S., Nauen, R., 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>
- Baugh, A.T., Schaper, S. V., Hau, M., Cockrem, J.F., de Goede, P., Oers, K. van, 2012. Corticosterone responses differ between lines of great tits (*Parus major*) selected for divergent personalities. *Gen. Comp. Endocrinol.* 175, 488–494. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.12.012>
- Bean, T.G., Gross, M.S., Karouna-Renier, N.K., Henry, P.F.P., Schultz, S.L., Hladik, M.L., Kuivila, K.M., Rattner, B.A., 2019. Toxicokinetics of Imidacloprid-Coated Wheat Seeds in Japanese Quail (*Coturnix japonica*) and an Evaluation of Hazard. *Environ. Sci. Technol.* 53, 3888–3897. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b07062>
- Beltzer, A.H., 1988. Biología Alimentaria del Tordo Mulato *Molothrus Badius Badius* (Aves: Icteridae) en el Valle Aluvial del Río Paraná Medio, Argentina. *Naruta Neotrop.* 2, 113–121. <https://doi.org/https://doi.org/10.14409/natura.v2i19.3556>
- Benton, T.G., Vickery, J.A., Wilson, J.D., 2003. Farmland biodiversity: Is habitat heterogeneity the key? *Trends Ecol. Evol.* 18, 182–188. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00011-9)
- Berny, P., Buronfosse, F., Videmann, B., Buronfosse, T., 1999. Evaluation of the toxicity of imidacloprid in wild birds. A new high performance thin layer chromatography (HPTLC) method for the analysis of liver and crop samples in suspected poisoning cases. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 22, 1547–1559. <https://doi.org/10.1081/JLC-100101750>
- BirdLife International, 2021. Greyish Baywing (*Agelaioides badius*) [WWW Document]. Species factsheet. URL <http://datazone.birdlife.org/species/factsheet/greyish-baywing-agelaioides-badius> (accessed 2.3.21).
- BirdLife International, 2020. Greyish Baywing (*Agelaioides badius*) [WWW Document]. species factsheet. URL

<http://datazone.birdlife.org/species/factsheet/greyish-baywing-agelaioides-badius>  
(accessed 7.8.20).

- Bishop, C.A., Moran, A.J., Toshack, M.C., Elle, E., Maisonneuve, F., Elliott, J.E., 2018. Hummingbirds and bumble bees exposed to neonicotinoid and organophosphate insecticides in the Fraser Valley, British Columbia, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 2143–2152. <https://doi.org/10.1002/etc.4174>
- Bishop, C.A., Woundneh, M.B., Maisonneuve, F., Common, J., Elliott, J.E., Moran, A.J., 2020. Determination of neonicotinoids and butenolide residues in avian and insect pollinators and their ambient environment in Western Canada (2017, 2018). *Sci. Total Environ.* 737, 139386. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139386>
- Boasso, M., Castrillo, S., Dacunto, L., Ferraina, A., Franzoni, A., Gaitán, J., Gomez Taffarel, M.C., Moreno, A., Propato, T., 2019. Mapa Nacional de Cultivos. Campaña 2018/2019, INTA.
- Boatman, N.D., Brickle, N.W., Hart, J.D., Milsom, T.P., Morris, A.J., Murray, A.W.A., Murray, K.A., Robertson, P.A., 2004. Evidence for the indirect effects of pesticides on farmland birds. *Ibis (Lond. 1859)*. 146, 131–143. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2004.00347.x>
- Boatman, N.D., Parry, H.R., Bishop, J.D., Cuthbertson, A.G.S., 2007. Impacts of agricultural change on farmland biodiversity in the UK. *Issues Environ. Sci. Technol.* 25, 1–32. <https://doi.org/10.1039/9781847557650-00001>
- Bonansa, R.I., Amé, M.V., Wunderlin, D.A., 2013. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquía River basin (Argentina). *Chemosphere* 90, 1860–1869. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.007>
- Bonmatin, J.M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A., Noome, D.A., Simon-Delso, N., Tapparo, A., 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 35–67. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>
- Bonmatin, J.M., Marchand, P.A., Charvet, R., Moineau, I., Bengsch, E.R., Colin, M.E., 2005. Quantification of imidacloprid uptake in maize crops. *J. Agric. Food Chem.*

53, 5336–5341. <https://doi.org/10.1021/jf0479362>

- Bonmatin, J.M., Moineau, I., Charvet, R., Fleche, C., Colin, M.E., Bengsch, E.R., 2003. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Anal. Chem.* 75, 2027–2033. <https://doi.org/10.1021/ac020600b>
- Botha, C.J., Du Plessis, E.C., Coetser, H., Rosemann, M., 2018. Analytical confirmation of imidacloprid poisoning in granivorous Cape spurfowl (*Pternistis capensis*). *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 89, 1–5. <https://doi.org/10.4102/jsava.v89i0.1637>
- Botías, C., David, A., Horwood, J., Abdul-Sada, A., Nicholls, E., Hill, E., Goulson, D., 2015. Neonicotinoid Residues in Wildflowers, a Potential Route of Chronic Exposure for Bees. *Environ. Sci. Technol.* 49, 12731–12740. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03459>
- Bright, J.A., Morris, A.J., Winspear, R., 2008. A review of indirect effects of pesticides on birds and mitigating land-management practices. RSPB Research Report No. 28.
- Brodeur, J.C., Candiotti, J.V., Soloneski, S., Larramendy, M.L., Ronco, A.E., 2012. Evidence of Reduced Feeding and Oxidative Stress in Common Tree Frogs (*Hypsiboas pulchellus*) from an Agroecosystem Experiencing Severe Drought. *J. Herpetol.* 46, 72–78. <https://doi.org/10.1670/10-200>
- Brodeur, J.C., Poliserpi, M.B., 2017. Chapter 14. South American Cowbirds as Avian Models for Environmental Toxicity Testing. pp. 289–306. <https://doi.org/10.1039/9781788010573-00289>
- Brodeur, J.C., Sanchez, M., Castro, L., Rojas, D.E., Cristos, D., Damonte, M.J., Poliserpi, M.B., D’Andrea, M.F., Andriulo, A.E., 2017. Accumulation of current-use pesticides, cholinesterase inhibition and reduced body condition in juvenile one-sided livebearer fish (*Jenynsia multidentata*) from the agricultural Pampa region of Argentina. *Chemosphere* 185, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.129>
- Brodeur, J.C., Suarez, R.P., Natale, G.S., Ronco, A.E., Elena Zaccagnini, M., 2011. Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1370–1380.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.024>

Brown, A., Martinez Ortiz, U., Acerbi, M., Corcuera, J., 2006. La situación ambiental Argentina 2005. Fundación Vida Silvestre, Buenos Aires.

Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)

Burns, F., Eaton, M.A., Barlow, K.E., Beckmann, B.C., Breerton, T., Brooks, D.R., Brown, P.M.J., Al Fulaij, N., Gent, T., Henderson, I., Noble, D.G., Parsons, M., Powney, G.D., Roy, H.E., Stroh, P., Walker, K., Wilkinson, J.W., Wotton, S.R., Gregory, R.D., 2016. Agricultural management and climatic change are the major drivers of biodiversity change in the UK. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151595>

Byholm, P., Mäkeläinen, S., Santangeli, A., Goulson, D., 2018. First evidence of neonicotinoid residues in a long-distance migratory raptor, the European honey buzzard (*Pernis apivorus*). *Sci. Total Environ.* 639, 929–933. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.185>

Calamari, N.C., Canavelli, S.B., Cerezo, A., Dardanelli, S., Bernardos, J.N., Zaccagnini, M.E., 2018. Variations in pest bird density in Argentinean agroecosystems in relation to land use and/or cover, vegetation productivity and climate. *Wildl. Res.* 45, 668–678. <https://doi.org/10.1071/WR17167>

Campbell, Terry W., 2015. *Exotic Animal Hematology and Cytology: Fourth Edition*, Exotic Animal Hematology and Cytology: Fourth Edition. <https://doi.org/10.1002/9781118993705>

Campbell, Terry W, 2015. *Exotic Animal Hematology and Cytology*, Fourth. ed.

Carere, C., Caramaschi, D., Fawcett, T.W., 2010. Covariation between personalities and individual differences in coping with stress: Converging evidence and hypotheses. *Curr. Zool.* 56, 728–740. <https://doi.org/10.1093/czoolo/56.6.728>

Carson, R., 1962. *Silent Spring*.

Castro Berman, M., Marino, D.J.G., Quiroga, M.V., Zagarese, H., 2018. Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and

- Patagonian regions of Argentina. *Chemosphere* 200, 513–522.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.103>
- Çavaş, T., Könen, S., 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22, 263–268.  
<https://doi.org/10.1093/mutage/gem012>
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Barnosky, A.D., García, A., Pringle, R.M., Palmer, T.M., 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Sci. Adv.* 1, 9–13. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1400253>
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Dirzo, R., 2017. Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E6089–E6096.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1704949114>
- Cencig, G., Angeloni, L., Rosetti, L., Varisco, I., 2017. Evaluación de cultivares de girasol en San Justo, Santa Fe. Campaña 2016/2017, Información técnica de cultivos de verano, Campaña 2017-2018. Publicación Miscelánea N°135. INTA Ediciones. Buenos Aires, Argentina.
- Chagnon, M., Kreuzweiser, D., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Van Der Sluijs, J.P., 2015. Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 119–134.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3277-x>
- Chain-Guadarrama, A., Martínez-Salinas, A., Aristizábal, N., Ricketts, T.H., 2019. Ecosystem services by birds and bees to coffee in a changing climate: A review of coffee berry borer control and pollination. *Agric. Ecosyst. Environ.*  
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.04.011>
- Cheng, L.-C., Murugaiyah, V., Chan, K.-L., 2019. Development, Validation, and Application of HPLC Method for Quantification of Antihyperuricemic Compounds from *Lippia nodiflora* in Rat Plasma. *Planta Medica Int. Open* 6, e28–e35.  
<https://doi.org/10.1055/a-0955-9505>
- Chiron, F., Chargé, R., Julliard, R., Jiguet, F., Muratet, A., 2014. Pesticide doses,

- landscape structure and their relative effects on farmland birds. *Agric. Ecosyst. Environ.* 185, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.12.013>
- Clark, P., Boardman, W., S., R., 2009. *Atlas of Clinical Avian Hematology*. Wiley Blackwell.
- Corcellas, C., Andreu, A., Máñez, M., Sergio, F., Hiraldo, F., Eljarrat, E., Barceló, D., 2017. Pyrethroid insecticides in wild bird eggs from a World Heritage Listed Park: A case study in Doñana National Park (Spain). *Environ. Pollut.* 228, 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.035>
- Crocker, D., Hart, A.D.M., Gurney, J., McCoy, C., 2002. PROJECT PN0908: Methods for estimating daily food intake of birds and mammals, DEFRA Department for Environment, Food & Rural Affairs.
- Cumming, G.S., Maciejewski, K., 2017. Reconciling community ecology and ecosystem services: Cultural services and benefits from birds in South African National Parks. *Ecosyst. Serv.* 28, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2017.02.018>
- Darder, M.L., Caprile, A.C., Milesi Delaye, L., 2016. Contaminación en agroecosistemas, estudio de caso de la cuenca del Arroyo Pergamino. *Gest. Ambient.* 10, 57–61.
- de Faria, D.B.G., Montalvão, M.F., Chagas, T.Q., Araújo, A.P.C., Souza, J.M. d., Mendes, B.O., Rodrigues, A.S.L., Malafaia, G., 2018. Behavioral changes in Japanese quails exposed to predicted environmentally relevant abamectin concentrations. *Sci. Total Environ.* 636, 1553–1564. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.293>
- De Gerónimo, E., Aparicio, V.C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., Costa, J.L., 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere* 107, 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.039>
- De Mársico, M.C., Mahler, B., Reboreda, J.C., 2010. Reproductive success and nestling growth of the Baywing parasitized by screaming and shiny cowbirds. *Wilson J. Ornithol.* 122, 417–431. <https://doi.org/10.1676/09-140.1>

- de Snoo, G.R., Luttik, R., 2004. Availability of pesticide-treated seed on arable fields. *Pest Manag. Sci.* 60, 501–506. <https://doi.org/10.1002/ps.824>
- Defensor del Pueblo de la Provincia de Buenos Aires, Universidad Nacional de La Plata, 2015. Relevamiento de la utilización de agroquímicos en la Provincia de Buenos Aires. Mapa de situación e incidencia sobre la salud., Gobierno de la provincia de buenos Aires. La Plata, Buenos Aires.
- Del Barco, O.D., Beltzer, A.H., 2005. Ecología Alimentaria del Tordo Músico, *Agelaioides Badius* (Aves: Icteridae) en el Valle de Inundación del Río Paraná. *Fabrib.* <https://doi.org/10.14409/fabrib.v9i1.760>
- Devereux, C.L., Whittingham, M.J., Fernández-Juricic, E., Vickery, J.A., Krebs, J.R., 2006. Predator detection and avoidance by starlings under differing scenarios of predation risk. *Behav. Ecol.* 17, 303–309. <https://doi.org/10.1093/beheco/arj032>
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2008. *InfoStat*.
- Diaz, L.A., Flores, F.S., Contigiani, M.S., 2011. Viremia profiles and host competence index for West Nile virus (Flavivirus, Flaviviridae) in three autochthonous birds species from Argentina. *J. Ornithol.* 152, 21–25. <https://doi.org/10.1007/s10336-010-0538-4>
- Dingemanse, N.J., De Goede, P., 2004. The relation between dominance and exploratory behavior is context-dependent in wild great tits. *Behav. Ecol.* 15, 1023–1030. <https://doi.org/10.1093/beheco/arh115>
- Donald, P.F., Green, R.E., Heath, M.F., 2001. Agricultural intensification and the collapse of Europe's farmland bird populations. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 268, 25–29. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1325>
- Donald, P.F., Sanderson, F.J., Burfield, I.J., van Bommel, F.P.J., 2006. Further evidence of continent-wide impacts of agricultural intensification on European farmland birds, 1990-2000. *Agric. Ecosyst. Environ.* 116, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.02.007>
- Drobne, D., Blazic, M., Van Gestel, C., Les, V., Jemec, A., Trebs, P., 2008. Toxicity of

- imidacloprid to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* ( Isopoda , Crustacea ) 71, 1326–1334. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.042>
- Dudley, N., Alexander, S., 2017. Agriculture and biodiversity: a review. *Biodiversity* 18, 45–49. <https://doi.org/10.1080/14888386.2017.1351892>
- Dunbar, M.R., Gregg, M.A., Crawford, J.A., Giordano, M.R., Tornquist, S.J., 2005. Normal Hematologic and Biochemical Values for Pre-laying Greater Sage Grouse (*Centrocercus urophasianus*) and Their Influence on Chick Survival. *J. Zoo Wildl. Med.* 36, 422–429. <https://doi.org/10.1638/04-065.1>
- Durkin, P.R., 2015. Imidacloprid: Human Health and Ecological Risk Assessment Corrected FINAL REPORT. SERA TR 05-43-24-03a 2015, 270.
- Edwards, P.J., Leopold, A., Beavers, J.B., Springer, T.A., Chapman, P., Maynard, S.K., Hubbard, P., 2017. More for less: Analysis of the performance of avian acute oral guideline OECD 223 from empirical data. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 13, 906–914. <https://doi.org/10.1002/ieam.1930>
- EFSA, 2009. Guidance Document on Risk Assessment for Birds & Mammals on request from EFSA. *EFSA J.* 7 (12), 139. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1438>
- Egerer, M.H., Fricke, E.C., Rogers, H.S., 2018. Seed dispersal as an ecosystem service: frugivore loss leads to decline of a socially valued plant, *Capsicum frutescens*. *Ecol. Appl.* 28, 655–667. <https://doi.org/10.1002/eap.1667>
- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., Nauen, R., 2008. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manag. Sci.* 64, 1099–1105. <https://doi.org/10.1002/ps.1616>
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Eng, M.L., Stutchbury, B.J.M., Morrissey, C.A., 2019. A neonicotinoid insecticide reduces fueling and delays migration in songbirds. *Science* (80-. ). 365, 1177–1180. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9419>
- Eng, M.L., Stutchbury, B.J.M., Morrissey, C.A., 2017. Imidacloprid and chlorpyrifos



- insecticides impair migratory ability in a seed-eating songbird. *Sci. Rep.* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15446-x>
- Enrico, J.M., Gentili, O., Sanmarti, N., 2019. Ensayos Comparativos de Rendimiento de variedades de soja, Campaña 2018- 19 EEA INTA Oliveros y AER Casilda, INTA. Buenos Aires, Argentina.
- Etchegoyen, M., Ronco, A., Almada, P., Abelando, M., Marino, D., 2017. Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. *Environ. Monit. Assess.* 189, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-5773-1>
- Fair, J.M., Paul, E., Jones, J., 2010. Guidelines to the Use of Wild Birds in Research, Third. ed, Ornithological Council. Washington, D.C.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 455, 81–95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Peng, P., Zeng, E.Y., 2005. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.10.005>
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Zhao, L., Peng, P., 2004. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. *Chemosphere* 56, 457–463. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.02.010>
- Fernández-Vizcaíno, E., Fernández de Mera, I.G., Mougeot, F., Mateo, R., Ortiz-Santaliestra, M.E., 2020. Multi-level analysis of exposure to triazole fungicides through treated seed ingestion in the red-legged partridge. *Environ. Res.* 189, 109928. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109928>
- Ferretti, A., Maggini, I., Lupi, S., Cardinale, M., Fusani, L., 2019. The amount of available food affects diurnal locomotor activity in migratory songbirds during stopover. *Sci. Rep.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55404-3>
- Ferreira, L., Murgio, M., 2019. Evaluación de cultivares de trigo en Inta Manfredi- Campaña 2019, INTA. Buenos Aires, Argentina.
- Finney, D.J., 1964. A statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge

University Press, London.

- Fiorini, V.D., Tuero, D.T., Reboreda, J.C., 2009. Host behaviour and nest-site characteristics affect the likelihood of brood parasitism by shiny cowbirds on chalk-browed mockingbirds. *Behaviour* 146, 1387–1403.  
<https://doi.org/10.1163/156853909X433338>
- Flores, F., Vallone, P., Conde, B., Ferreira, L., Rosetti, L., Lozano Coronel, A., 2019. Ensayos comparativos de rendimiento de maíz en diferentes ambientes productivos. Campaña 2017 / 2018, Maíz. Actualización 2019. Informe de Actualización Técnico en línea N° 14. ISSN 2469-2042, INTA Ediciones. Buenos Aires, Argentina.
- Foley, J.A., DeFries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R., Chapin, F.S., Coe, M.T., Daily, G.C., Gibbs, H.K., Helkowski, J.H., Holloway, T., Howard, E.A., Kucharik, C.J., Monfreda, C., Patz, J.A., Prentice, I.C., Ramankutty, N., Snyder, P.K., 2005. Global consequences of land use. *Science* (80-. ). 309, 570–574. <https://doi.org/10.1126/science.1111772>
- Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauman, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., Johnston, M., Mueller, N.D., O’Connell, C., Ray, D.K., West, P.C., Balzer, C., Bennett, E.M., Carpenter, S.R., Hill, J., Monfreda, C., Polasky, S., Rockström, J., Sheehan, J., Siebert, S., Tilman, D., Zaks, D.P.M., 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478, 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10452>
- Fraga, R.M., 1991. The Social System of a Communal Breeder, the Bay-winged Cowbird *Molothrus badius*. *Ethology* 89, 195–210. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1991.tb00304.x>
- Franzen-Klein, D., Jankowski, M., Roy, C.L., Nguyen-Phuc, H., Chen, D., Neuman-Lee, L., Redig, P., Ponder, J., 2020. Evaluation of neurobehavioral abnormalities and immunotoxicity in response to oral imidacloprid exposure in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*). *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* 83, 45–65. <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1723154>
- Frutos, A.E., Reales, C.F., Lorenzón, R.E., Ronchi-Virgolini, A.L., 2016. Spatial variation in bird assemblages are linked to environmental heterogeneity in

- agricultural landscapes in the province of Entre Ríos, Argentina. *Avian Biol. Res.* 9, 273–281. <https://doi.org/10.3184/175815516X14725499175863>
- Furley, T.H., Brodeur, J., Silva de Assis, H.C., Carriquiriborde, P., Chagas, K.R., Corrales, J., Denadai, M., Fuchs, J., Mascarenhas, R., Miglioranza, K.S., Miguez Caramés, D.M., Navas, J.M., Nugegoda, D., Planes, E., Rodriguez-Jorquera, I.A., Orozco-Medina, M., Boxall, A.B., Rudd, M.A., Brooks, B.W., 2018. Toward sustainable environmental quality: Identifying priority research questions for Latin America. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 14, 344–357. <https://doi.org/10.1002/ieam.2023>
- Gaston, K.J., Cox, D.T.C., Canavelli, S.B., García, D., Hughes, B., Maas, B., Martínez, D., Ogada, D., Inger, R., 2018. Population Abundance and Ecosystem Service Provision: The Case of Birds. *Bioscience*. <https://doi.org/10.1093/biosci/biy005>
- Ge, W., Yan, S., Wang, Jinhua, Zhu, L., Chen, A., Wang, Jun, 2015. Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Imidacloprid in Zebrafish ( *Danio rerio* ) Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Imidacloprid in Zebrafish ( *Danio rerio* ).
- Geiger, F., Bengtsson, J., Berendse, F., Weisser, W.W., Emmerson, M., Morales, M.B., Ceryngier, P., Liira, J., Tschardtke, T., Winqvist, C., Eggers, S., Bommarco, R., Pärt, T., Bretagnolle, V., Plantegenest, M., Clement, L.W., Dennis, C., Palmer, C., Oñate, J.J., Guerrero, I., Hawro, V., Aavik, T., Thies, C., Flohre, A., Hänke, S., Fischer, C., Goedhart, P.W., Inchausti, P., 2010. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic Appl. Ecol.* 11, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2009.12.001>
- Giacomo, A.S. Di, Casenave, J.L. de, 2010. Use and Importance of Crop and Field-Margin Habitats for Birds in A Neotropical Agricultural Ecosystem. *Condor* 112, 283–293. <https://doi.org/10.1525/cond.2010.090039>
- Gibbons, D., Morrissey, C.A., Mineau, P., 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 103–118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>
- Gibbons, D.W., Bohan, D.A., Rothery, P., Stuart, R.C., Haughton, A.J., Scott, R.J., Wilson, J.D., Perry, J.N., Clark, S.J., Dawson, R.J., Firbank, L.G., 2006. Weed

- seed resources for birds in fields with contrasting conventional and genetically modified herbicide-tolerant crops. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 273, 1921–1928. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3522>
- Glomski, C.A., Pica, A., 2016. *The avian erythrocyte: its phylogenetic odyssey*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Gobeli, A., Crossley, D., Johnson, J., Reyna, K., 2017. The effects of neonicotinoid exposure on embryonic development and organ mass in northern bobwhite quail (*Colinus virginianus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 195, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.02.001>
- Goijman, A.P., Conroy, M.J., Bernardos, J.N., Zaccagnini, M.E., 2015. Multi-season regional analysis of multi-species occupancy: Implications for bird conservation in agricultural lands in east-central Argentina. *PLoS One* 10, e0130874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130874>
- Goldstein, M.I., Lacher, T.E., Woodbridge, B., Bechard, M.J., Canavelli, S.B., Zaccagnini, M.E., Cobb, G.P., Scollon, E.J., Tribolet, R., Hooper, M.J., 1999a. Monocrotophos-induced mass mortality of Swainson's hawks in Argentina, 1995–96. *Ecotoxicology* 8, 201–214. <https://doi.org/10.1023/A:1026496331396>
- Goldstein, M.I., Lacher, T.E., Zaccagnini, M.E., Parker, M.L., Hooper, M.J., 1999b. Monitoring and assessment of Swainson's hawks in Argentina following restrictions on monocrotophos use, 1996–97. *Ecotoxicology* 8, 215–224. <https://doi.org/10.1023/A:1026448415467>
- Goulson, D., 2014. Ecology: Pesticides linked to bird declines. *Nature* 511, 295–296. <https://doi.org/10.1038/nature13642>
- Goulson, D., 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* 50, 977–987. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>
- Goymann, W., Trappschuh, M., Jensen, W., Schwabl, I., 2006. Low ambient temperature increases food intake and dropping production, leading to incorrect estimates of hormone metabolite concentrations in European stonechats. *Horm. Behav.* 49, 644–653. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.12.006>

- Grau, R., 1994. Bird Toxicity Oral/Canary Bird (*Serinus canarius*): Summary Report: Lab Project Number: 106610: VK-300., Unpublished study prepared by Bayer AG. 2 p. MRID 43310403.
- Grau, R., 1988. Acute Oral LD50 of NTN 33893 to Japanese Quail: Lab Project Number: VW-123: E2930082-4:106608, Unpublished study prepared by Bayer AG. 43 p. MRID 43310401.
- Graves, E.E., Jelks, K.A., Foley, J.E., Filigenzi, M.S., Poppenga, R.H., Ernest, H.B., Melnicoe, R., Tell, L.A., 2019. Analysis of insecticide exposure in California hummingbirds using liquid chromatography-mass spectrometry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 15458–15466. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04903-x>
- Greatti, M., Barbattini, R., Stravisi, A., Sabatini, A.G., Rossi, S., 2006. Presence of the a.i. imidacloprid on vegetation near corn fields sown with Gaucho® dressed seeds. *Bull. Insectology* 59, 99–103.
- Grilli, M.G., Bildstein, K.L., Lambertucci, S.A., 2019. Nature’s clean-up crew: Quantifying ecosystem services offered by a migratory avian scavenger on a continental scale. *Ecosyst. Serv.* 39, 100990. <https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2019.100990>
- Gupta, M., Singh, S.P., Pankaj, N.K., 2017. Ameliorative effect of *Spirulina platensis* and *Erythrina variegata* on oxidative stress in imidacloprid intoxicated white leghorn cockerels. *Toxicol. Int.* 24, 171–177. <https://doi.org/10.22506/ti/2017/v24/i2/162420>
- H, J.L., Nira, J., Rosebrough, A., Lewis and Randall, F., 1992. Lowry’s handbook of right-to-know emergency planning. *J. Hazard. Mater.* 30, 361–362. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- Hallmann, C.A., Foppen, R.P.B., Van Turnhout, C.A.M., De Kroon, H., Jongejans, E., 2014. Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature* 511, 341–343. <https://doi.org/10.1038/nature13531>
- Hancock, G.A., 1996. NTN 33893 Technical: An acute oral LD50 with mallards., Bayer Corp. 32 pp.

- Hao, C., Eng, M.L., Sun, F., Morrissey, C.A., 2018. Part-per-trillion LC-MS/MS determination of neonicotinoids in small volumes of songbird plasma. *Sci. Total Environ.* 644, 1080–1087. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.317>
- Hart, J.D., Milsom, T.P., Fisher, G., Wilkins, V., Moreby, S.J., Murray, A.W.A., Robertson, P.A., 2006. The relationship between yellowhammer breeding performance, arthropod abundance and insecticide applications on arable farmland. *J. Appl. Ecol.* 43, 81–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2005.01103.x>
- Hladik, M.L., Kolpin, D.W., Kuivila, K.M., 2014. Widespread occurrence of neonicotinoid insecticides in streams in a high corn and soybean producing region, USA. *Environ. Pollut.* 193, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.06.033>
- Humann-Guillemint, S., Binkowski, Ł.J., Jenni, L., Hilke, G., Glauser, G., Helfenstein, F., 2019a. A nation-wide survey of neonicotinoid insecticides in agricultural land with implications for agri-environment schemes. *J. Appl. Ecol.* 56, 1502–1514. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13392>
- Humann-Guillemint, S., Clément, S., Desprat, J., Binkowski, Ł.J., Glauser, G., Helfenstein, F., 2019b. A large-scale survey of house sparrows feathers reveals ubiquitous presence of neonicotinoids in farmlands. *Sci. Total Environ.* 660, 1091–1097. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.068>
- Hussain, R., Mahmood, F., Khan, M.Z., Khan, A., Muhammad, F., 2011. Pathological and genotoxic effects of atrazine in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Ecotoxicology* 20, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0515-y>
- Hussein, M., Singh, V., 2016. Effect on chick embryos development after exposure to neonicotinoid insecticide imidacloprid. *J. Anat. Soc. India* 65, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.jasi.2017.01.012>
- Inger, R., Gregory, R., Duffy, J.P., Stott, I., Voříšek, P., Gaston, K.J., 2015. Common European birds are declining rapidly while less abundant species' numbers are rising. *Ecol. Lett.* 18, 28–36. <https://doi.org/10.1111/ele.12387>
- INTA, 2011. Siembra Directa. Actualización Técnica N° 58. Inst. Nac. Tecnol. Agropecu. 28.

- Iturburu, F.G., Zömis, M., Panzeri, A.M., Crupkin, A.C., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Menone, M.L., 2017. Uptake, distribution in different tissues, and genotoxicity of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 699–708. <https://doi.org/10.1002/etc.3574>
- Jaramillo, A., Burke, P., 1999. *New world blackbirds : The Icterids*. Princeton University Press.
- Jeschke, P., Nauen, R., 2008a. Neonicotinoids - From zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag. Sci.* 64, 1084–1098. <https://doi.org/10.1002/ps.1631>
- Jeschke, P., Nauen, R., 2008b. Neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry 1098, 1084–1098. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert, A., 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2897–2908. <https://doi.org/10.1021/jf101303g>
- Jiao, W., Xiao, Y., Qian, X., Tong, M., Hu, Y., Hou, R., Hua, R., 2016. Optimized combination of dilution and refined QuEChERS to overcome matrix effects of six types of tea for determination eight neonicotinoid insecticides by ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 210, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.097>
- Kammon, A.M., Biar, R.S., Banga, H.S., Sodhi, S., 2010. Patho-biochemical studies on hepatotoxicity and nephrotoxicity on exposure to chlorpyrifos and imidacloprid in layer chickens. *Vet. Arh.* 80, 663–672.
- Kapoor, U., Srivastava, M.K., Trivedi, P., Garg, V., Srivastava, L.P., 2014. Disposition and acute toxicity of imidacloprid in female rats after single exposure. *Food Chem. Toxicol.* 68, 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.019>
- Kataria, S.K., Chhillar, A.K., Kumar, A., Tomar, M., Malik, V., 2016. Cytogenetic and hematological alterations induced by acute oral exposure of imidacloprid in female mice. *Drug Chem. Toxicol.* 39, 59–65. <https://doi.org/10.3109/01480545.2015.1026972>
- Khan, A., Ahmad, L., Khan, M.Z., 2012. Hemato-biochemical changes induced by

- pyrethroid insecticides in avian, fish and mammalian species. *Int. J. Agric. Biol.* 14, 834–842.
- Krause, E.T., Naguib, M., 2014. Effects of parental and own early developmental conditions on the phenotype in zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Evol. Ecol.* 28, 263–275. <https://doi.org/10.1007/s10682-013-9674-7>
- Krebs, J.R., Wilson, J.D., Bradbury, R.B., Siriwardena, G.M., 1999. The second silent spring? *Nature* 400, 611–612. <https://doi.org/10.1038/23127>
- Krupke, C.H., Hunt, G.J., Eitzer, B.D., Andino, G., Given, K., 2012. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029268>
- Kwon, Y.K., Wee, S.H., Kim, J.H., 2004. Pesticide poisoning events in wild birds in Korea from 1998 to 2002. *J. Wildl. Dis.* 40, 737–740. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.737>
- Labocha, M.K., Hayes, J.P., 2012. Morphometric indices of body condition in birds: A review. *J. Ornithol.* 153, 1–22. <https://doi.org/10.1007/s10336-011-0706-1>
- Lane, R., 1991. Basic techniques in pet avian clinical pathology. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 21, 1157–1179. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(91\)50130-3](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(91)50130-3)
- Lennon, R.J., Peach, W.J., Dunn, J.C., Shore, R.F., Pereira, M.G., Sleep, D., Dodd, S., Wheatley, C.J., Arnold, K.E., Brown, C.D., 2020a. From seeds to plasma: Confirmed exposure of multiple farmland bird species to clothianidin during sowing of winter cereals. *Sci. Total Environ.* 723, 138056. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138056>
- Lennon, R.J., Shore, R.F., Pereira, M.G., Peach, W.J., Dunn, J.C., Arnold, K.E., Brown, C.D., 2020b. High prevalence of the neonicotinoid clothianidin in liver and plasma samples collected from gamebirds during autumn sowing. *Sci. Total Environ.* 742, 140493. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140493>
- Li, Y., Miao, R., Khanna, M., 2020. Neonicotinoids and decline in bird biodiversity in the United States. *Nat. Sustain.* 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41893-020-0582-x>



- Limay-Rios, V., Forero, L.G., Xue, Y., Smith, J., Baute, T., Schaafsma, A., 2016. Neonicotinoid insecticide residues in soil dust and associated parent soil in fields with a history of seed treatment use on crops in southwestern Ontario. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 303–310. <https://doi.org/10.1002/etc.3257>
- Lonare, M., Kumar, M., Raut, S., Badgajar, P., Doltade, S., Telang, A., 2014. Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: A protective effect of curcumin. *Neurochem. Int.* 78, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.09.004>
- Lopez-Antia, A., Feliu, J., Camarero, P.R., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mateo, R., 2016. Risk assessment of pesticide seed treatment for farmland birds using refined field data. *J. Appl. Ecol.* 53, 1373–1381. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12668>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mateo, R., 2014. Experimental approaches to test pesticide-treated seed avoidance by birds under a simulated diversification of food sources. *Sci. Total Environ.* 496, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.031>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Mateo, R., 2015a. Imidacloprid-treated seed ingestion has lethal effect on adult partridges and reduces both breeding investment and offspring immunity. *Environ. Res.* 136, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.023>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Mateo, R., 2015b. Imidacloprid-treated seed ingestion has lethal effect on adult partridges and reduces both breeding investment and offspring immunity. *Environ. Res.* 136, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.023>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Mateo, R., 2013. Experimental exposure of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. *Ecotoxicology* 22, 125–138. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1009-x>
- Lovette, I.J., Fitzpatrick, J.W., 2016. Cornell Lab of Ornithology's handbook of bird biology., THIRD EDIT. ed. Wiley.
- Lowther, P.E., 2010. Grayish Baywing - Introduction | Neotropical Birds Online

- [WWW Document]. Neotrop. Birds Online (T. S. Schulenberg, Ed. URL <https://neotropical.birds.cornell.edu/Species-Account/nb/species/bawcow4/overview>)
- Lupi, L., Miglioranza, K.S.B., Aparicio, V.C., Marino, D., Bedmar, F., Wunderlin, D.A., 2015. Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Sci. Total Environ.* 536, 687–694. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.090>
- Luttik, R., Hart, A., Roelofs, W., Craig, P., Mineau, P., 2011. Variation in the level of protection afforded to birds and crustaceans exposed to different pesticides under standard risk assessment procedures. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 459–465. <https://doi.org/10.1002/ieam.183>
- Macchi, L., Decarre, J., Gojman, A.P., Mastrangelo, M., Blendinger, P.G., Gavier-Pizarro, G.I., Murray, F., Piquer-Rodriguez, M., Semper-Pascual, A., Kuemmerle, T., 2020. Trade-offs between biodiversity and agriculture are moving targets in dynamic landscapes. *J. Appl. Ecol.* 57, 2054–2063. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13699>
- MacDonald, A.M., Jardine, C.M., Thomas, P.J., Nemeth, N.M., 2018. Neonicotinoid detection in wild turkeys (*Meleagris gallopavo silvestris*) in Ontario, Canada. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 16254–16260. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2093-0>
- MAGyP, 2020. Estimaciones agrícolas [WWW Document]. URL <https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/> (accessed 8.1.20).
- Mahendiran, M., Azeez, P.A., 2018. Ecosystem Services of Birds: A Review of Market and Non-market Values. *Entomol. Ornithol. Herpetol. Curr. Res.* 07, 209. <https://doi.org/10.4172/2161-0983.1000209>
- Maldonado, K., van Dongen, W.F.D., Vásquez, R., Sabat, P., 2012. Geographic variation in the association between exploratory behavior and physiology in rufous-collared sparrows. *Physiol. Biochem. Zool.* 85, 618–624. <https://doi.org/10.1086/667406>
- Matsuda, K., Ihara, M., Sattelle, D.B., 2020. Neonicotinoid Insecticides: Molecular

- Targets, Resistance, and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 60, 241–255.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021747>
- Mendez, D.G., Otero, A., Menarvino, B., Spagnolo, J., 2014. Tiempo de sembrar Alfalfa: ¡la calidad importa!, INTA. Buenos Aires, Argentina.
- Milligan, M.C., Johnson, M.D., Garfinkel, M., Smith, C.J., Njoroge, P., 2016. Quantifying pest control services by birds and ants in Kenyan coffee farms. *Biol. Conserv.* 194, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.11.028>
- Millot, F., Berny, P., Decors, A., Bro, E., 2015. Little field evidence of direct acute and short-term effects of current pesticides on the grey partridge. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 117, 41–61. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.017>
- Millot, F., Decors, A., Mastain, O., Quintaine, T., Berny, P., Vey, D., Lasseur, R., Bro, E., 2017. Field evidence of bird poisonings by imidacloprid-treated seeds: a review of incidents reported by the French SAGIR network from 1995 to 2014. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 5469–5485. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8272-y>
- Mineau, P., Balcomb, R., Bennett, R., Dobson, S., Fry, M., Jaber, M., Leopold, A., Munk, R., Ringer, B., Rispin, A., Sileo, L., Solecki, R., Thompson, H., OECD, 1996a. Report of the SETAC/OECD Workshop on Avian Toxicity Testing. *OECD Environ. Heal. Saf. Publ. Ser. Test. Assess.*, OECD Series on Testing and Assessment 44–62. <https://doi.org/10.1787/9789264077980-en>
- Mineau, P., Collins, B.T., Baril, A., 1996b. On the use of scaling factors to improve interspecies extrapolation of acute toxicity in birds. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 24, 24–29. <https://doi.org/10.1006/rtph.1996.0061>
- Mineau, P., Palmer, C., 2013. The Impact of the Nation’s Most Widely Used Insecticides on Birds, American Bird Conservancy.  
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Mineau, P., Whiteside, M., 2013. Pesticide Acute Toxicity Is a Better Correlate of U.S. Grassland Bird Declines than Agricultural Intensification. *PLoS One* 8, e57457.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057457>
- Mishra, I., Batra, T., Prabhat, A., Agarwal, N., Bhardwaj, S.K., Kumar, V., 2020.

- Developmental effects of daily food availability times on song behaviour and neuronal plasticity of song-control system in male zebra finches. *Behav. Brain Res.* 382, 112497. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112497>
- Mohanty, B., Pandey, S.P., Tsutsui, K., 2017. Thyroid disrupting pesticides impair the hypothalamic-pituitary-testicular axis of a wildlife bird, *Amandava amandava*. *Reprod. Toxicol.* 71, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.04.006>
- Moreby, S.J., Southway, S.E., 1999. Influence of autumn applied herbicides on summer and autumn food available to birds in winter wheat fields in southern England. *Agric. Ecosyst. Environ.* 72, 285–297. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00007-9)
- Moreyra, F., Giménez, F., López, J.R., Tranier, E., Ortellado, M.R., Krüger, H., Mayo, A., Labarthe, F., 2014. *Verdeos de Invierno*, ISBN 978-987-521-567-2. INTA Ediciones. Buenos Aires, Argentina.
- Morris, A.J., Wilson, J.D., Whittingham, M.J., Bradbury, R.B., 2005. Indirect effects of pesticides on breeding yellowhammer (*Emberiza citrinella*). *Agric. Ecosyst. Environ.* 106, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.07.016>
- Morrissey, C.A., Mineau, P., Devries, J.H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M.C., Liber, K., 2015. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environ. Int.* 74, 291–303. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.024>
- Moyers, S.C., Adelman, J.S., Farine, D.R., Moore, I.T., Hawley, D.M., 2018. Exploratory behavior is linked to stress physiology and social network centrality in free-living house finches (*Haemorrhous mexicanus*). *Horm. Behav.* 102, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.05.005>
- Naguib, M., Nemitz, A., 2007. Living with the past: Nutritional stress in juvenile males has immediate effects on their plumage ornaments and on adult attractiveness in zebra finches. *PLoS One* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000901>
- Nagy, K.A., 2005. Field metabolic rate and body size. *J. Exp. Biol.* 208, 1621–1625. <https://doi.org/10.1242/jeb.01553>

- Narosky, T., Yzurieta, D., 2010. *Aves de Argentina y Uruguay: Guía de Identificación.*, Total. ed. Vázquez Mazzini Editores, Buenos Aires.
- Nassar, A.M.K., 2016. Acetylcholinesterase: A universal toxicity biomarker. *J.Agric.&Env.Sci.Dam.Univ.,Egypt* 15.
- Newman, M.C., 2015. *Fundamentals of Ecotoxicology The Science of Pollution*, CRC Press/Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Newton, I., 2004a. The recent declines of farmland bird population. *Ibis (Lond. 1859)*. 146, 579–600.
- Newton, I., 2004b. The recent declines of farmland bird populations in Britain: An appraisal of causal factors and conservation actions. *Ibis (Lond. 1859)*. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2004.00375.x>
- Newton, I., Wyllie, I., 1992. Recovery of a Sparrowhawk Population in Relation to Declining Pesticide Contamination. *J. Appl. Ecol.* 29, 476. <https://doi.org/10.2307/2404515>
- Newton, I., Wyllie, I., Asher, A., 1992. Mortality from the pesticides aldrin and dieldrin in British Sparrowhawks and Kestrels. *Ecotoxicology* 1, 31–44. <https://doi.org/10.1007/BF00702654>
- OECD, 2016. *GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Test No. 223: Avian Acute Oral Toxicity Test*, Environmental Health and Safety Publications Organisation for Economic Co-operation and Development. <https://doi.org/10.1787/9789264090897-en>
- OECD, 2010. Report of the Test Method Validation of the Avian Acute Oral Toxicity Test (OECD Test Guideline 223), Series on Testing and Assessment, No.131.Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology, June 7, 2010. [www.oecd.org/env/ehs/testing/seriesontestingandassessmentecotoxicitytesting.htm](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/seriesontestingandassessmentecotoxicitytesting.htm).
- Oosterheld, M., 2008. Impacto de la agricultura sobre los ecosistemas. *Fundamentos ecológicos y problemas más relevantes. Ecol. Austral* 18, 337–346.

- Olayemi, O., Jagun, A., 2014. Micronucleus as a Biomarker of Genotoxicity in Village Weaver Bird (*Ploceus cucullatus*). *World s Vet. J.* 6, 48.  
<https://doi.org/10.5455/wvj.20141045>
- Olea, P.P., Sánchez-Barbudo, I.S., Viñuela, J., Barja, I., Mateo-Tomás, P., Piñeiro, A., Mateo, R., Purroy, F.J., 2009. Lack of scientific evidence and precautionary principle in massive release of rodenticides threatens biodiversity: Old lessons need new reflections. *Environ. Conserv.*  
<https://doi.org/10.1017/S0376892909005323>
- Ortiz-Santaliestra, M.E., Alcaide, V., Camarero, P.R., Mateo, R., Mougeot, F., 2020. Egg Overspray with Herbicides and Fungicides Reduces Survival of Red-Legged Partridge Chicks. *Environ. Sci. Technol.* 54, 12402–12411.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04203>
- Pandey, S.P., Mohanty, B., 2015. The neonicotinoid pesticide imidacloprid and the dithiocarbamate fungicide mancozeb disrupt the pituitary-thyroid axis of a wildlife bird. *Chemosphere* 122, 227–234.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.11.061>
- Pandey, S.P., Tsutsui, K., Mohanty, B., 2017. Endocrine disrupting pesticides impair the neuroendocrine regulation of reproductive behaviors and secondary sexual characters of red munia (*Amandava amandava*). *Physiol. Behav.* 173, 15–22.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.030>
- Pennington, T., Reiff, J.M., Theiss, K., Entling, M.H., Hoffmann, C., 2018. Reduced fungicide applications improve insect pest control in grapevine. *BioControl* 63, 687–695. <https://doi.org/10.1007/s10526-018-9896-2>
- Pérez-Iglesias, J.M., Ruiz de Arcaute, C., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G.S., Larramendy, M.L., 2014. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 120–126.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.002>
- Pérez, D.J., Iturburu, F.G., Calderon, G., Oyesqui, L.A.E., De Gerónimo, E., Aparicio, V.C., 2021. Ecological risk assessment of current-use pesticides and biocides in

- soils, sediments and surface water of a mixed land-use basin of the Pampas region, Argentina. *Chemosphere* 263, 128061.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128061>
- Peruzzo, P.J., Porta, A.A., Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* 156, 61–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015>
- Pisa, L., Goulson, D., Yang, E.C., Gibbons, D., Sánchez-Bayo, F., Mitchell, E., Aebi, A., van der Sluijs, J., MacQuarrie, C.J.K., Giorio, C., Long, E.Y., McField, M., Bijleveld van Lexmond, M., Bonmatin, J.M., 2017. An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 2: impacts on organisms and ecosystems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–49.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-0341-3>
- Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Mcfield, M., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Van Der Sluijs, J.P., Van Dyck, H., Wiemers, M., 2014. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 68–102.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3471-x>
- Pistone, J., Heatley, J.J., Campbell, T.A., Voelker, G., 2017. Assessing Passeriformes health in South Texas via select venous analytes. *Comp. Biochem. Physiol. Part - B Biochem. Mol. Biol.* 210, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.06.002>
- Pitarque, M., Creus, A., Marcos, R., Hughes, J.A., Anderson, D., 1999. Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 440, 195–204.  
[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00026-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00026-1)
- Poliserpi, M.B., Cristos, D.S., Brodeur, J.C., 2021. Imidacloprid seed coating poses a risk of acute toxicity to small farmland birds: A weight-of-evidence analysis using data from the grayish baywing *Agelaioides badius*. *Sci. Total Environ.* 763, 142957. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142957>

- Porter, R.D., Wiemeyer, S.N., 1969. Dieldrin and DDT: Effects on sparrow hawk eggshells and reproduction. *Science* (80-. ). 165, 199–200.  
<https://doi.org/10.1126/science.165.3889.199>
- Powers, R.P., Jetz, W., 2019. Global habitat loss and extinction risk of terrestrial vertebrates under future land-use-change scenarios. *Nat. Clim. Chang.* 9, 323–329.  
<https://doi.org/10.1038/s41558-019-0406-z>
- Primost, J.E., Marino, D.J.G., Aparicio, V.C., Costa, J.L., Carriquiriborde, P., 2017. Glyphosate and AMPA, “pseudo-persistent” pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environ. Pollut.* 229, 771–779.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.006>
- Prosser, P., 2001. PROJECT PN0907: POTENTIAL EXPOSURE OF BIRDS TO TREATED SEED., Central Science Laboratory. United kingdom.
- Prosser, P.J., Hart, A.D.M., Langton, S.D., McKay, H. V., Cooke, A.S., 2006. Estimating the rate of poisoning by insecticide-treated seeds in a bird population. *Ecotoxicology* 15, 657–664. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0103-3>
- Queiroz Baesse, C., Tolentino, V.C. de M., Silva, A.M. da, Silva, A. de A., Ferreira, G.Â., Paniago, L.P.M., Nepomuceno, J.C., Melo, C. de, 2015. Micronucleus as biomarker of genotoxicity in birds from Brazilian Cerrado. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 115, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.024>
- Quero, A.A.M., Ferré, D.M., Zarco, A., Cuervo, P.F., Gorla, N.B.M., 2016. Erythrocyte micronucleus cytome assay of 17 wild bird species from the central Monte desert, Argentina. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 25224–25231.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-7638-5>
- Radolinski, J., Wu, J., Xia, K., Stewart, R., 2018. Transport of a neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, from artificial seed coatings. *Sci. Total Environ.* 618, 561–568.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.031>
- Rainaudó, M., 2019. Informe de evolución de Siembra Directa en Argentina, campaña 2018/2019, Aapresid.



- Ralph, C.J., Geupel, G.R., Pyle, P., Martin, T.E., DeSante, D.F., 1993. Handbook of Field Methods for Monitoring Landbirds. Director 144, 1–41.
- Rawi, S.M., Al-Logmani, A.S., Hamza, R.Z., 2019. Neurological alterations induced by formulated imidacloprid toxicity in Japanese quails. *Metab. Brain Dis.* 34, 443–450. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0377-1>
- Reindl, A.R., Falkowska, L., Grajewska, A., 2015. Chlorinated herbicides in fish, birds and mammals in the Baltic Sea. *Water. Air. Soil Pollut.* 226, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2536-x>
- Robin, S.U.R., Stork, A., Sur, R., Stork, A., 2003. Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bull. Insectology* 56, 35–40.
- Rogers, K.H., McMillin, S., Olstad, K.J., Poppenga, R.H., 2019. Imidacloprid Poisoning of Songbirds Following a Drench Application of Trees in a Residential Neighborhood in California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 38, 1724–1727. <https://doi.org/10.1002/etc.4473>
- Ronco, A.E., Marino, D.J.G., Abelando, M., Almada, P., Apartin, C.D., 2016. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ. Monit. Assess.* 188, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5467-0>
- Rosenberg, K. V., Dokter, A.M., Blancher, P.J., Sauer, J.R., Smith, A.C., Smith, P.A., Stanton, J.C., Panjabi, A., Helft, L., Parr, M., Marra, P.P., 2019. Decline of the North American avifauna. *Science* (80-. ). 366, 120–124. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1313>
- Roy, C.L., Chen, D., Ponder, J., Jankowski, M., 2016. Neonicotinoids on the landscape: evaluating avian exposure to treated seeds in agricultural landscapes.
- Roy, C.L., Coy, P.L., Chen, D., Ponder, J., Jankowski, M., 2019. Multi-scale availability of neonicotinoid-treated seed for wildlife in an agricultural landscape during spring planting. *Sci. Total Environ.* 682, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.010>
- Roy, C.L., Jankowski, M., Ponder, J., Chen, D., 2020a. SUPPLEMENTARY Sub-lethal

and Lethal Methods to Detect Recent Imidacloprid Exposure in Birds with Application to Field Studies.

Roy, C.L., Jankowski, M.D., Ponder, J., Chen, D., 2020b. Sublethal and Lethal Methods to Detect Recent Imidacloprid Exposure in Birds with Application to Field Studies. *Environ. Toxicol. Chem.* 39, 1355–1366. <https://doi.org/10.1002/etc.4721>

Ruiz De Arcaute, C., Pérez-Iglesias, J.M., Nikoloff, N., Natale, G.S., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2014. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecol. Indic.* 45, 632–639. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.05.034>

Ruuskanen, S., Rainio, M.J., Uusitalo, M., Saikkonen, K., Helander, M., 2020. Effects of parental exposure to glyphosate-based herbicides on embryonic development and oxidative status: a long-term experiment in a bird model. *Sci. Rep.* 10, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63365-1>

Samour, J., Silvanose, C., 2016. Clinical and Laboratory Diagnostic Examination. *Avian Med.* 73–178. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7234-3832-8.00006-7>

Sasidhar, B.N., Anand, K.A., Gopala, R.A., Amaravathi, P., Hemanth, I., 2014. Chronic experimental feedong of imidacloprid induced oxidative stress and amelioration with vitamin C & *Withania somnifera* in layer birds, *International Journal of Science, Environment and Technology*.

Satorre, E.H., 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Cienc. hoy* 15, 24–31.

Scanes, C.G., 2014. *Sturkie's Avian Physiology: Sixth Edition*, *Sturkie's Avian Physiology: Sixth Edition*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-02488-X>

Schaafsma, A., Limay-Rios, V., Baute, T., Smith, J., Xue, Y., 2015. Neonicotinoid insecticide residues in surface water and soil associated with commercial maize (corn) fields in Southwestern Ontario. *PLoS One* 10, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118139>

Şekercioglu, Ç.H., Mendenhall, C.D., Oviedo-Brenes, F., Horns, J.J., Ehrlich, P.R.,

- Daily, G.C., 2019. Long-term declines in bird populations in tropical agricultural countryside. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 9903–9912.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1802732116>
- SENASA, 2020. Productos inscriptos\_principio activo\_enero\_2020 [WWW Document]. URL <https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/productosveterinarios-fitosanitarios-y-fertilizantes/registro-nacional-de-terapeutica-vegetal>
- SENASA, 2012. Resolución 302/2012-ANEXO I Clasificación toxicológica según riesgos y valores de dl 50 aguda de productos formulados.
- SENASA, 1999. Manual de Procedimientos, Criterios y Alcances para el Registro de Productos Fitosanitarios en la República Argentina. Resolución 350/99 1.  
<https://doi.org/10.5860/choice.41-2927.14>.
- Sgolastra, F., Medrzycki, P., Bortolotti, L., Maini, S., Porrini, C., Simon-Delso, N., Bosch, J., 2020. Bees and pesticide regulation: Lessons from the neonicotinoid experience. *Biol. Conserv.* 241, 108356.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108356>
- Sharaf, S., Khan, A., Khan, M.Z., Aslam, F., Saleemi, M.K., Mahmood, F., Khan, A., Khan, M.Z., Sharaf, S., Gul, S.T., Saleemi, M.K., 2010. Clinico-hematological and micronuclear changes induced by cypermethrin in broiler chicks: Their attenuation with vitamin E and selenium. *Exp. Toxicol. Pathol.* 62, 333–341.  
<https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.05.002>
- Sica, Y. V., Quintana, R.D., Bernardos, J.N., Calamari, N.C., Gavier-Pizarro, G.I., 2020. Wetland Bird Response to Habitat Composition and Configuration at Multiple Spatial Scales. *Wetlands* 1–13. <https://doi.org/10.1007/s13157-019-01215-1>
- Siddiqui, A., Choudhary, M., Goriya, H. V., Bhavsar, S.K., Thaker, A.M., 2007. Evaluation of immunotoxic effect of short-term administration of quinalphos and imidacloprid in white leghorn cockerels. *Toxicol. Int.* 14, 15–19.
- Siddiqui, M.A., 2004. Toxicological and Immunological Studies of Sub Acute Exposure of Cockerels to Imidacloprid and Quinalphos. M.V. Sc. Thesis. Anand, India:

Gujarat Agricultural University.

Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., Mcfield, M., Mineau, P., Mitchell, E.A., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van Der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R., Wiemers, M., 2015. Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5–34.

<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>

Singh, N.P., 1996. Microgel electrophoresis of DNA from Individual Cells. *Technol. Detect. DNA Damage Mutat.* 3–24. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0301-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0301-3_1)

Solecki, R., 2001. Toxicological evaluations IMIDACLOPRID. *IPCS Int. Program. Chem. Saf.*

Sotherton, N.W., Moreby, S.J., Langley, M.G., 1987. The effects of the foliar fungicide pyrazophos on beneficial arthropods in barley fields. *Ann. Appl. Biol.* 111, 75–87. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1987.tb01435.x>

Springer TA, 2009. SEquential DEsign Calculator - A tool for use with OECD TG 223: Avian acute oral toxicity test. User's guide and programme. *Environ. Heal. Saf. Publ.* 1–29.

Stanton, R.L., Morrissey, C.A., Clark, R.G., 2018. Analysis of trends and agricultural drivers of farmland bird declines in North America: A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 254, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.11.028>

Stoate, C., Boatman, N.D., Borralho, R.J., Carvalho, C.R., De Snoo, G.R., Eden, P., 2001. Ecological impacts of arable intensification in Europe. *J. Environ. Manage.* 63, 337–365. <https://doi.org/10.1006/jema.2001.0473>

Sur, R., Stork, A., 2003. Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants, in: *Bulletin of Insectology*. pp. 35–40.

Taliansky-Chamudis, A., Gómez-Ramírez, P., León-Ortega, M., García-Fernández, A.J., 2017. Validation of a QuEChERS method for analysis of neonicotinoids in

- small volumes of blood and assessment of exposure in Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*) nestlings. *Sci. Total Environ.* 595, 93–100.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.246>
- Tassin De Montaigu, C., Goulson, D., 2020. Identifying agricultural pesticides that may pose a risk for birds. *PeerJ* 8, e9526. <https://doi.org/10.7717/peerj.9526>
- Taylor, R.L., Maxwell, B.D., Boik, R.J., 2006. Indirect effects of herbicides on bird food resources and beneficial arthropods. *Agric. Ecosyst. Environ.* 116, 157–164.  
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.01.012>
- Tian, X., Yang, W., Wang, D., Zhao, Y., Yao, R., Ma, L., Ge, C., Li, X., Huang, Z., He, L., Jiao, W., Lin, A., 2018. Chronic brain toxicity response of juvenile Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*) to the neonicotinoid insecticides imidacloprid and nitenpyram. *Chemosphere* 210, 1006–1012.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.083>
- Toll, P., 1990. Technical NTN 33893: An Acute Oral LD with Bobwhite Quail: Lab Project Number: N3711702: 100059. Unpubl. study Prep. by Mobay Corp. MRID 42055308. 25 pp.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247–268.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>
- Tomizawa, M., Casida, J.E., Latli, B., Yamamoto, I., Casida, J.E., 1999. Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor, in: *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*. Springer International Publishing, pp. 271–292. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-67933-2>
- Turaga, U., Peper, S.T., Dunham, N.R., Kumar, N., Kistler, W., Almas, S., Presley, S.M., Kendall, R.J., 2016. A survey of neonicotinoid use and potential exposure to northern bobwhite (*Colinus virginianus*) and scaled quail (*Callipepla squamata*) in the Rolling Plains of Texas and Oklahoma. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1511–1515. <https://doi.org/10.1002/etc.3305>
- Ursino, C.A., De Mársico, M.C., Reboreda, J.C., Riehl, C., 2017. Kinship and genetic mating system of the Grayish Baywing (*Agelaioides badius*), a cooperatively

- breeding Neotropical blackbird. *Auk* 134, 410–420. <https://doi.org/10.1642/auk-16-188.1>
- Ursino, C.A., De Mársico, M.C., Sued, M., Farall, A., Reboreda, J.C., 2011. Brood parasitism disproportionately increases nest provisioning and helper recruitment in a cooperatively breeding bird. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 65, 2279–2286. <https://doi.org/10.1007/s00265-011-1238-7>
- USEPA, 2014. Guidance for Reviewing OCSPP 850.2100 Avian Oral Toxicity Studies Conducted with Passerine Birds.
- USEPA, 2012a. Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.2100: Avian Acute Oral Toxicity Test. *Off. Chem. Saf. Pollut. Prev.*
- USEPA, 2012b. Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.2200: Avian Dietary Toxicity Test. *Off. Chem. Saf. Pollut. Prev.*
- USEPA, 2012c. Ecological Effects Test OCSPP 850.2000: Background and Special Considerations- Tests with Terrestrial Wildlife. *Off. Chem. Saf. Pollut. Prev.*
- USEPA, 1982. Pesticide Assessment Guidelines Subdivision E Hazard Evaluation: Wildlife and Aquatic Organisms, EPA-540/9-82-024. Washington, D. C.
- USEPA, 1975. Methods for Acute Toxicity Tests With Fish, Macroinvertebrates, and Amphibians, EPA-600/3-75-009. Washington, D. C.
- Van Turnhout, C.A.M., Foppen, R.P.B., Leuven, R.S.E.W., Van Strien, A., Siepel, H., 2010. Life-history and ecological correlates of population change in Dutch breeding birds. *Biol. Conserv.* 143, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.09.023>
- Viana, D.S., Santamaría, L., Figuerola, J., 2016. Migratory Birds as Global Dispersal Vectors. *Trends Ecol. Evol.* <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.07.005>
- Vickery, J.A., Tallowin, J.R., Feber, R.E., Asteraki, E.J., Atkinson, P.W., Fuller, R.J., Brown, V.K., 2001. The management of lowland neutral grasslands in Britain: Effects of agricultural practices on birds and their food resources. *J. Appl. Ecol.* 38, 647–664. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00626.x>

- Viglizzo, E.F., Jobbaghy, E.G., 2012. Expansión de la frontera agropecuaria en Argentina y su impacto ecológico-ambiental. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Vohra, P., Khera, K.S., Sangha, G.K., 2014. Physiological, biochemical and histological alterations induced by administration of imidacloprid in female albino rats. *Pestic. Biochem. Physiol.* 110, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.02.007>
- Walker, C.H., 1983. Pesticides and birds - mechanisms of selective toxicity. *Agric. Ecosyst. Environ.* 9, 211–226. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(83\)90042-7](https://doi.org/10.1016/0167-8809(83)90042-7)
- Wang, X., Anadón, A., Wu, Q., Qiao, F., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M.-R., Yuan, Z., Martínez, M.-A., 2018. Mechanism of Neonicotinoid Toxicity: Impact on Oxidative Stress and Metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 58, 471–507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052429>
- Wenny, D.G., Devault, T.L., Johnson, M.D., Kelly, D., Sekercioglu, C.H., Tomback, D.F., Whelan, C.J., 2011. The Need to Quantify Ecosystem Services Provided By Birds. *Source Auk* 128, 1–14. <https://doi.org/10.1525/auk.2011.10248>
- Werner, J., Sfakianakis, N., Rendall, A.D., Griebeler, E.M., 2018. Energy intake functions and energy budgets of ectotherms and endotherms derived from their ontogenetic growth in body mass and timing of sexual maturation. *J. Theor. Biol.* 444, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.02.007>
- Whelan, C.J., Şekercioglu, Ç.H., Wenny, D.G., 2015. Why birds matter: from economic ornithology to ecosystem services. *J. Ornithol.* 156, 227–238. <https://doi.org/10.1007/s10336-015-1229-y>
- WHO, 2009. Recommended classification of pesticides by hazard, World Health Organization Chronicle.
- Williams, T.D., Ternan, S.P., 1999. Food intake, locomotor activity, and egg laying in zebra finches: Contributions to reproductive energy demand? *Physiol. Biochem. Zool.* 72, 19–27. <https://doi.org/10.1086/316639>
- Wolf, T., Niehaus-Rolf, C., Luepke, N.P., 2002. Some new methodological aspects of the hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN). *Mutat. Res. - Genet.*

Toxicol. Environ. Mutagen. 514, 59–76. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00317-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00317-5)

Wolfe, M.F., Kendall, R.J., 1998. Age-dependent toxicity of diazinon and terbufos in european starlings ( *Sturnus vulgaris* ) and red-winged blackbirds ( *Agelaius phoeniceus* ). Environ. Toxicol. Chem. 17, 1300–1312. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170715>

Wood, T.J., Goulson, D., 2017. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. Environ. Sci. Pollut. Res. 24, 17285–17325. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9240-x>

Wurster, D.H., Wurster, C.F., Strickland, W.N., 1965. Bird Mortality Following DDT Spray for Dutch Elm Disease. Ecology 46, 488–499. <https://doi.org/10.2307/1934880>

WWF, 2018. Living Planet Report 2018: Aiming Higher, WWF. Grooten, M. Almond, R.E.A.(Eds). Gland, Switzerland.

Yamamoto, I., Casida, J.E., 1999. Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor, in: Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-67933-2>

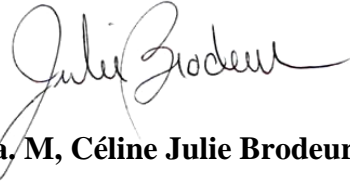
Zoeller, K.C., Gurney, G.G., Heydinger, J., Cumming, G.S., 2020. Defining cultural functional groups based on perceived traits assigned to birds. Ecosyst. Serv. 44, 101138. <https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2020.101138>

Zúñiga-González, G., Torres-Bugarín, O., Luna-Aguirre, J., González-Rodríguez, A., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B.C., Ventura-Aguilar, A.J., Ramos-Ibarra, M.L., Ramos-Mora, A., Ortíz, G.G., Gallegos-Arreola, M.P., 2000. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 467, 99–103. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00021-8)





**Lic. Poliserpi María Belén**



**Dra. M, Céline Julie Brodeur**