



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA NATURALEZA**

(ILACVN)

BIOTECNOLOGÍA

**EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AGUDA A LA ATRAZINA SOBRE PARÁMETROS
DE DESARROLLO E HISTOLOGÍA HEPÁTICA EN EMBRIONES DE *Gallus gallus*
DURANTE EL SÉPTIMO DÍA DE INCUBACIÓN**

Elvira Elizabeth Márquez Sánchez

Foz do Iguaçu

2025



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIENCIAS
DE LA VIDA Y
DE LA NATURALEZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGÍA

**EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AGUDA A LA ATRAZINA SOBRE PARÁMETROS
DE DESARROLLO E HISTOLOGÍA HEPÁTICA EN EMBRIONES DE *Gallus gallus*
DURANTE EL SÉPTIMO DÍA DE INCUBACIÓN**

Elvira Elizabeth Márquez Sánchez

Trabajo de conclusión de curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial a la obtención del título de Bacharel en Biotecnología de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana - UNILA

Orientación: Prof. Dra Carla Vermeulen
Carvalho Grade

Coorientação: Prof. Dr. Pablo Henrique Nunes

Foz do Iguaçu

2025

ELVIRA ELIZABETH MÁRQUEZ SÁNCHEZ

EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AGUDA A LA ATRAZINA SOBRE PARÁMETROS DE DESARROLLO E HISTOLOGÍA HEPÁTICA EN EMBRIONES DE *Gallus gallus* DURANTE EL SÉPTIMO DÍA DE INCUBACIÓN

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latino-Americana, como requisito parcial para la obtención del título de Bacharel en Biotecnología.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Carla Vermeulen Carvalho Grade
UNILA

Prof. Dr. Jean Francisco Vetorazzi
UNILA

Profa. Dra. Claudia Feijó Ortolani Machado
UFPR

Foz do Iguaçu, 17 de diciembre de 2025

CONDICIONES DE PRESENTACIÓN DE TRABAJOS ACADÉMICOS

Nombre completo del autor(a): Elvira Elizabeth Márquez Sánchez

Curso: Biotecnología

Tipo de Documento

- | | |
|------------------------|--------------------------------------|
| (.....) graduação | (.....) artigo |
| (.....) especialização | (X) trabalho de conclusão de curso |
| (.....) mestrado | (.....) monografia |
| (.....) doutorado | (.....) dissertação |
| (.....) tese | (.....) CD/DVD – obras audiovisuais |

Título del trabajo académico: **EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AGUDA A LA ATRAZINA SOBRE PARÁMETROS DE DESARROLLO E HISTOLOGÍA HEPÁTICA EN EMBRIONES DE *Gallus gallus* DURANTE EL SÉPTIMO DÍA DE INCUBACIÓN**

Nombre del orientador(a): Profa. Dra. Carla Vermeulen Carvalho Grade

Fecha de la Defensa: 17 de diciembre de 2025

Licencia no-exclusiva de Distribución

El referido autor(a):

a) Declara que el documento presentado es su obra original y que tiene derecho a conceder los derechos contenidos en esta licencia. Asimismo, declara que la presentación del documento no infringe, a su leal saber y entender, los derechos de ninguna otra persona o entidad.

b) Si el documento presentado contiene material cuyos derechos de autor no le corresponden, declara haber obtenido la autorización del titular de los derechos de autor para conceder a UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana los derechos exigidos por esta licencia, y que dicho material, cuyos derechos pertenecen a terceros, está claramente identificado y reconocido en el texto o contenido del documento presentado.

Si el documento presentado se basa en un trabajo financiado o apoyado por una institución distinta a la Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara haber cumplido con todas las obligaciones exigidas por el contrato o acuerdo correspondiente.

Como titular de los derechos sobre el contenido mencionado, el autor autoriza a la Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a poner a disposición la obra, de forma gratuita y de acuerdo a la licencia pública Creative Commons 3.0 Unported.

Foz do Iguaçu, 17 de diciembre de 2025.

Assinatura do Responsável

Dedico este trabajo a la disciplina y resiliencia hechas personas (**si, en ese orden**): mis padres, Alma Sánchez y Dagoberto Márquez. Quienes me brindaron apoyo, consejos y tranquilidad en los momentos más difíciles.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco inmensamente a la UNILA por permitirme acceder a una educación pública, gratuita y de calidad. A mi orientadora Profa. Dra. Carla Vermeulen Carvalho Grade, quien me ha guiado con paciencia, precisión y criterio en mi recorrido académico, iniciado con una aula de biología celular en la sala C210 y que ahora culmina con este trabajo de conclusión de curso. También a mi co-orientador, el prof. Dr. Pablo Nunes, cuyos conocimientos en histología fueron cruciales para el desarrollo de este trabajo.

A mis colegas del grupo de embriología del desarrollo, Rafaella Carvalho, Jhosselyn Estrella y especialmente a Emanoele Botelho (quien me acompañó innumerables sábados a hacer experimentos) por la ayuda en el laboratorio. El trabajo en equipo tornó la vivencia experimental más enriquecedora, muchísimas gracias por todo su apoyo. A los colegas del Hemonucleo: Arlimar, Bianca, Mariza, Nayane, Thayna y Vanesa por hacer más leve y gracioso el estagio y este último periodo universitario

A mis padres, Alma Sánchez y Dagoberto Márquez que nunca han escatimado esfuerzos para invertir en mi educación, que me han enseñado desde temprana edad el significado de la disciplina académica y el esfuerzo. Lo que empezó con un violín a mis 3 años de edad, interminables horas de repaso, clases de inglés, clases de chino, cursos de arqueología, orquesta, coro, viajes para hacer turismo histórico/científico, y sin duda las lecturas obligadas (por mi madre) sobre geología, historia, anatomía y cualquier libro que hubiera en las bibliotecas de mi casa, han moldeado mi carácter y curiosidad. A ustedes les debo el estar concluyendo esta etapa de mi vida.

A mis hermanos Iván y Maya, pilares fundamentales de mi estabilidad emocional aún en la distancia. En gran medida, ustedes dos son la inspiración para cumplir mis metas y luchar por mis sueños. Espero que nos vaya bonito en esta vida. A algunas personas de El Salvador: Michelle Lemus y Ana Martinez ustedes en algún momento de mi trayecto universitario me alentaron a seguir adelante.

A los amigos que la UNILA me permitió conocer. Voy a empezar por Aline, la piedra angular del grupo “galera”; Leo que con un comentario siempre nos hace reír; Ilenia, nuestra bióloga y pastelera de confianza; María, la mamá del grupo y una máquina incansable de organizar eventos; Luis, más que mi paisano, mi hermano; Fernando, el papá del grupo; Laura, la designer gráfica favorita; Wara, la primera persona que conocí en la

UNILA; Guilherme, el amigo que resuelve y quien me recomendó a los proveedores de huevos embrionados. Todos ustedes son maravillosos. Las risas, las salidas, los momentos difíciles, las interminables horas de estudio y el apoyo mutuo son cosas que llevaré en mi corazón.

También a mi mejor amiga del curso de biotecnología, Cinttia Vega. Fueron 5 años de locura, de estudio, de caminatas hasta tu casa en la hora de almuerzo para terminar comiendo pasta con pollo. Gracias por brindarme tu amistad y tu apoyo en los momentos en los que he necesitado. Sos de las personas que más admiro en este mundo. La universidad sin vos no hubiera sido lo mismo.

Finalmente agradezco a mi psicólogo Francisco Barriere quien me acompañó en gran parte de este trayecto, me mantuvo en la línea de la cordura y enfocado en las metas trazadas.

Los que contemplan la belleza del mundo encuentran reservas de fortaleza que los acompañarán durante toda la vida

Rachel Carson

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura 1- Fórmula estructural de la atrazina.....	20
Figura 2- Vía de degradación de la atrazina, con metabolitos primarios y secundarios en cuerpos hídricos.....	22
Figura 3- Vía metabólica de la ATZ en gallinas ponedora.....	28
Figura 4- Estructuras que componen el huevo de gallina	29
Figura 5- Origen de los hepatoblastos en etapas embrionarias.....	33
Figura 6- Microfotografías del hígado embrionario demostrando el trayecto de la hematopoyesis.....	34
Figura 7- Lesiones observadas en hígado de codorniz tratado con CPF.....	35
Figura 8- Abertura superior en la cáscara de huevo.....	39
Figura 9- Material histológico en bloques de parafina posterior a un proceso de deshidratación.....	42
Figura 10- Mortalidad embrionaria por grupo y dosis estudiada.....	45
Figura 11- Hemorragia observada en embriones por grupo y dosis estudiada.....	46
Figura 12- Malformación embrionaria por grupo y dosis estudiada.....	47
Figura 13- Media y desviación estándar de los pesos de los embriones encontrados vivos en las concentraciones de 200 µg/L y 2000 µg/L de tratamiento con atrazina y controles respectivos.....	48
Figura 14- Gráfico de probabilidad normal y homocedasticidad para la dosis de 2000 µg/L.....	48
Figura 15- Gráfico de probabilidad normal y homocedasticidad para la dosis de 200 µg/L.....	49
Figura 16- Mediana y rangos intercuartílicos de las fases embrionarias (HH) en las concentraciones de 200 µg/L y 2000 µg/L.....	49
Figura 17- Láminas histológicas de hígado de embrión de gallina (E7) realizadas con dos protocolos diferentes.....	50
Figura 18- Disrupciones histológicas en láminas histológicas de hígado de embrión de gallina (E7).....	51
Figura 19- Tinción histológica de hematoxilina-eosina.....	51
Figura 20- Comparación de los fijadores utilizados.....	52

Figura 21- Tinción histológica hematoxilina-eosina en láminas correspondientes a embriones fijados con paraformaldehído (4%).....	53
Figura 22- Comparación de la histoarquitectura hepática en embriones de 7 días.....	54
Figura 23- Comparación de la presencia de eritrocitos inmaduros en los sinusoides del hígado embrionario.....	55
Figura 24- Células de núcleo reducido en tratamiento de 2000 µg/L.....	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1- Diseño experimental de embriones tratados con Atrazina a dos concentraciones con el respectivo control

Tabla 2- Comparación de los tiempos de exposición a reactivos de cada protocolo

Tabla 3- resultados estadísticos de endpoints morfológicos embrionarios

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

ROS	Especies reactivas de oxígeno
ATZ	Atrazina
RUP	Pesticida de uso restringido
DEA	Deetil atrazina
DIA	Diisopropil atrazina
DDA	Didesalquil atrazina
HA	Hidroxiatrazina
DEHA	De-etil hidroxil atrazina
DIHA	De-isopropil hidroxil atrazina
DEDIHA	De-etildesisopropilhidroxil atrazina
DDT	1,1,1 tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano
ADME	Distribución, metabolismo y eliminación
CYP450	Citocromo P450
PPM	Partes por millón
AHHasa	Aril hidrocarburo hidroxilasa
LPO	Peroxidación lipídica
PDI	Proteínas del tipo de disulfuro isomerasa
ERO1	Oxidoreductina del retículo endoplasmático
UPR	Respuesta a la proteína desplegada
HH	Hamilton & Hamburger
CPF	Clorpirifos
CEUA	Comisión de Ética en el uso de Animales

HE	Hematoxilina-eosina
PFA	Paraformaldehído
VMP	Valor máximo permitido
CT	Tejido conectivo
HP	Hepatoblasto
VD	Ducto venoso
VC	Vena central
S	Espacios sinusoidales
E	Eritrocitos
H	Hepatocitos
OR	Odds ratio

RESUMEN

La atrazina (ATZ) es un herbicida de la familia de las triazinas que actúa específicamente en el fotosistema II inhibiendo el pasaje de electrones. En investigaciones donde es evaluada la toxicidad embrionaria de la ATZ para diferentes especies se han documentado anomalías endocrinas, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en tejidos específicos y diferentes anomalías morfológicas en organismos adultos, sin embargo poco se sabe sobre los efectos en el desarrollo embrionario. Embriones de gallina (*Gallus gallus*) figuran como modelos animales para estudiar efectos xenobióticos sobre el desarrollo embrionario, esto gracias a la accesibilidad de compartimentos, fácil obtención y ortología entre aves y mamíferos. En este sentido, el objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de la ATZ sobre la toxicidad del desarrollo y la hepatogénesis en embriones de *Gallus gallus*. La metodología utilizada se basó en el tratamiento *in ovo* por inyección en la cámara de aire en 3 grupos: el grupo control tratado con agua destilada, un grupo tratado con la concentración de 200 µg/L y un grupo tratado con dosis de 2000 µg/L de ATZ. Los embriones sometidos a experimento fueron colectados luego de 7 días de incubación. En dicho momento se evaluaron los parámetros morfológicos de cada embrión: mortalidad, presencia de hemorragia, malformaciones, peso del embrión, y fase de desarrollo (HH). Seguidamente los embriones se colocaron en soluciones fijadoras (Carnoy o paraformaldehído 4%) durante 7 días. Posteriormente algunos embriones de la concentración de 2000 µg/L fueron seleccionados para procesamiento histológico y obtención de láminas teñidas con Hematoxilina-eosina que se utilizaron para evaluar descriptivamente el tejido hepático. Después del análisis se verificó que solo la presencia de hemorragia fue estadísticamente significativa a nivel subletal (2000 µg/L). Se observó diferencias en la calidad tisular e intensidad de la tinción con el fijador paraformaldehído 4%. Finalmente al contrastar los cortes histológicos correspondientes a embriones tratados y controles no se observaron diferencias cualitativas indicando que la ATZ en esas condiciones de tratamiento no tienen efectos nocivos aparente sobre la histología del hígado, aunque si se visualizaron características puntuales como una mayor congestión sinusoidal y presencia de células picnóticas en los hígados tratados con atrazina, indicando un posible impacto sobre la morfología del hígado. Estudios futuros podrán evaluar si otros parámetros celulares, bioquímicos y genéticos con diferentes concentraciones evidencian impacto en embriones de ave

Palabras clave: agrotóxico, embriotoxicidad, atrazina, teratogénesis, histología, morfología.

RESUMO

A atrazina (ATZ) é um herbicida triazínico que atua no fotossistema II, inibindo o transporte de elétrons. Estudos que avaliaram a toxicidade embrionária da ATZ em diferentes espécies documentaram anormalidades endócrinas, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em tecidos específicos e diversas anormalidades morfológicas em organismos adultos, entretanto pouco se sabe sobre os efeitos sobre o desenvolvimento embrionário. Embriões de galinha (*Gallus gallus*) são considerados modelos animais para o estudo dos efeitos de xenobióticos sobre o desenvolvimento embrionário, devido à acessibilidade de seus compartimentos, facilidade de obtenção e ortologia entre aves e mamíferos. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da ATZ na toxicidade do desenvolvimento e na hepatogênese em embriões de *Gallus gallus*. A metodologia utilizada baseou-se no tratamento *in ovo* por injeção na câmara de ar em três grupos: um grupo controle tratado com água destilada, um grupo tratado com uma concentração de 200 µg/L e um grupo tratado com uma dose de 2000 µg/L de ATZ. Os embriões submetidos ao experimento foram coletados após 7 dias de incubação. Nesse momento, os parâmetros morfológicos de cada embrião foram avaliados: mortalidade, presença de hemorragia e malformações, peso embrionário e estágio de desenvolvimento (HH). Posteriormente, os embriões foram colocados em fixadores (solução de Carnoy ou paraformaldeído 4%) por 7 dias. Alguns embriões do grupo tratado com 2000 µg/L foram selecionados para processamento histológico e obtenção de lâminas coradas com hematoxilina-eosina, as quais foram utilizadas para avaliação descritiva do tecido hepático. Após as análises, verificou-se que apenas a presença de hemorragia apresentou significância estatística em nível subletal (2000 µg/L). Observou-se diferenças na qualidade do tecido e na intensidade da coloração ao se utilizar com o fixador o Paraformaldeído 4%. Finalmente, ao comparar as secções histológicas correspondentes aos embriões tratados e controle, não foram observadas diferenças qualitativas indicando que a atrazina nessas condições de tratamento não tem efeito nocivo aparente sobre a histologia do fígado. Contudo, características específicas, como aumento da congestão sinusoidal e presença de células picnóticas, foram observadas nos fígados tratados com atrazina, indicando um possível impacto da atrazina sobre a morfologia do fígado. Estudos futuros poderão examinar se outros parâmetros celulares, bioquímicos e genéticos com diferentes concentrações de atrazina evidenciam o impacto em embriões.

Palavras-chave: agrotóxico, embriotoxicidade, atrazina, teratogênese, histologia, morfologia.

ABSTRACT

Atrazine (ATZ) is a triazine herbicide that acts specifically on photosystem II, inhibiting electron transport. Studies evaluating the embryonic toxicity of ATZ in different species have documented endocrine abnormalities, reactive oxygen species (ROS) production in specific tissues, and various morphological abnormalities in adult organisms. However, little is known about its effects on embryonic development. Chicken (*Gallus gallus*) embryos are used as animal models to study xenobiotic effects on embryonic development due to the accessibility of their compartments, ease of obtaining them, and their orthology between birds and mammals. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of ATZ on developmental toxicity and hepatogenesis in *Gallus gallus* embryos. The methodology used was based on *in ovo* treatment by injection into the air chamber in three groups: a control group treated with distilled water, a group treated with a concentration of 200 µg/L, and a group treated with a dose of 2000 µg/L of ATZ. Embryos subjected to the experiment were collected after 7 days of incubation. At that time, the morphological parameters of each embryo were evaluated: mortality, presence of hemorrhage, malformations, embryo weight, and developmental stage (HH). Subsequently, the embryos were placed in fixative solutions (Carnoy's solution or 4% paraformaldehyde) for 7 days. Later, some embryos from the 2000 µg/L concentration group were selected for histological processing and preparation of hematoxylin-eosin-stained slides, which were used to descriptively evaluate the liver tissue. After analysis, it was verified that only the presence of hemorrhage was statistically significant at the sublethal level (2000 µg/L). Differences were observed in tissue quality and staining intensity with the 4% paraformaldehyde fixative. Finally, when comparing the histological sections corresponding to treated and control embryos, no qualitative differences were observed, indicating that atrazine (ATZ) under these treatment conditions has no apparent harmful effect on liver histology. However, specific characteristics such as increased sinusoidal congestion and the presence of pyknotic cells were observed in the livers treated with atrazine, indicating an impact of atrazine on liver morphology. Future studies will be able to evaluate whether other cellular, biochemical, and genetic parameters with different concentrations show an impact on avian embryos.

Keywords: agrochemical, embryotoxicity, atrazine, teratogenesis, histology, morphology.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	18
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. AGROTÓXICOS.....	19
2.2. ATRAZINA.....	20
2.3. EMBRIÓN DE GALLINA COMO MODELO EXPERIMENTAL.....	25
2.4. PROBABLE TOXICOCINÉTICA DE LA ATRAZINA EN AVES.....	26
2.5. IMPORTANCIA DEL HÍGADO EN LOS PROCESOS TOXICOCINÉTICOS DE LA ATZ... 30	
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	36
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4. METODOLOGÍA.....	37
4.1. OBTENCIÓN DE HUEVOS EMBRIONADOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	37
4.2. REACTIVOS E INSUMOS.....	38
4.3. TRATAMIENTO.....	38
4.4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE EMBRIONES.....	40
4.5. ANÁLISIS DE DATOS.....	44
5. RESULTADOS.....	45
5.1. ANÁLISIS MORFOLÓGICO EMBRIONARIO.....	45
5.2. COMPARACIÓN HISTOLÓGICA DE PROTOCOLOS.....	51
5.3. SOLUCIONES FIJADORAS: CARNOY X PARAFORMALDEHÍDO 4%.....	54
5.4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MUESTRAS TRATADAS x CONTROL 55	
6. DISCUSIÓN.....	57
6.1. DISCUSIÓN SOBRE LA MORFOLOGÍA EMBRIONARIA.....	58
6.2. DISCUSIÓN SOBRE LOS PROTOCOLOS HISTOLÓGICOS.....	61
6.3. DISCUSIÓN DE LA MORFOLOGÍA HEPÁTICA.....	64
7. LIMITACIONES.....	66
8. CONCLUSIONES.....	67
8.1. CONCLUSIONES BIOLÓGICAS.....	67
8.2. CONCLUSIONES METODOLÓGICAS.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXOS.....	78

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la embriotoxicología ha tomado relevancia en el escenario científico, siendo capaz de evaluar la influencia negativa de sustancias con potenciales tóxicos en el procesos de formación de diversos organismos. Entre los resultados que dichos estudios reportan están la mortalidad y teratogenicidad, que permiten discutir las formas y dosis en que las sustancias afectan el desarrollo embrionario (PETERS & PIERSMA, 1990).

Estas investigaciones son aplicables a diversos organismos. Por ejemplo, en seres humanos existen diversos reportes de fármacos, agrotóxicos, virus, bacterias, y cómo estos afectan la gestación materna (SILBERGELD & PATRICK, 2005). Además de los estudios realizados para develar las consecuencias de la exposición a los xenobióticos en humanos, la embriotoxicología posee un enfoque ecológico, que analiza los efectos contaminantes sobre embriones de especies silvestres. En este sentido, los modelos de ave han sido utilizados para modelar diversas afecciones correlacionadas con tóxicos provenientes del ambiente (HILL & HOFFMAN, 1984).

Los impactos de los contaminantes ambientales producto de las actividades antropogénicas del hombre son percibibles en pájaros, aunque poco se sabe sobre los mecanismos de afección en el desarrollo embrionario de estos animales. Entre las sustancias más utilizadas en la industria agrícola, se encuentran los agrotóxicos, que son capaces de llegar a la cadena alimenticia, incluyendo la de las aves (HAO et al., 2021). Así, las investigaciones toxicológicas en especies avícolas son cruciales, incluyendo la fase embrionaria del desarrollo. En este sentido, es relevante el desarrollo de nuevos estudios que permitan direccionar la evaluación del riesgo ambiental, los límites de exposición y estrategias de manejo de los compuestos agroquímicos.

Delante de lo expuesto, son necesarios incentivos para investigar el impacto de los agroquímicos con potenciales tóxicos en el medio ambiente y la fauna que la componen, incluyendo fases como la embriogénesis. Considerando los argumentos presentados, este estudio tiene como objetivo evaluar los efectos de la atrazina en la morfología y el tejido hepático de embriones de ave en el séptimo día de desarrollo. Además se presenta la descripción y comparación de los protocolos usados para obtener láminas histológicas que permitan visualizar el tejido de interés.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. AGROTÓXICOS

El uso de agrotóxicos en la agricultura moderna es un método ampliamente utilizado para controlar plagas, enfermedades y la propagación de malezas dentro de modelos de siembra monocultivistas y cultivos extensivos (LOPES & ALBUQUERQUE, 2018). Estos compuestos definidos como cualquier sustancia química de origen sintético empleada para inhibir la proliferación de insectos, larvas, hongos y cualquier microorganismo que ocasione perjuicios en el desarrollo de la vida humana han tenido un crecimiento sostenido en su consumo, alcanzando en el año 2022 un uso total de 3.70 millones de toneladas a nivel mundial, un 4% más comparado con las estadísticas del año anterior (FAO, 2024; RAMIREZ, 2020). Dicho incremento no solo refleja una dependencia de los sistemas agrícolas de las sustancias químicas, sino que también produce ciertas preocupaciones debido a la expansión generalizada y bioacumulación de moléculas con múltiples potenciales toxicológicos en el medio ambiente y consecuentemente en organismos vivos (SINGH et al., 2020).

En este escenario, en el año 2023, Brasil plantó un total de 96,8 millones de hectáreas de cultivo, un 5,5% más comparado con el año anterior (IBGE, 2023). De esa área de cultivo, los productos mayormente plantados fueron la soya con más de 3,2 millones de hectáreas en el territorio, la caña de azúcar con 10 millones de hectáreas aproximadamente y el maíz con más de 22 millones de hectáreas (IBGE, 2023). En conjunto, los 3 cultivos conforman el 67,8 % del área total plantada e históricamente, son las siembras junto con el algodón que más agrotóxicos consumen, correspondiendo al 83% de los plaguicidas comercializados en el territorio (TYGEL et al., 2023). Brasil refleja las tendencias mundiales de intensificación química y además, las amplifica debido a los niveles de producción agrícola.

En consecuencia, los ingredientes activos más utilizados en el territorio, según Pignati et al (2017), son: glifosato, clorpirifos, atrazina, mancozeb, methoxyfenozide, acefato, haloxyfop-P-methyl, Lactofen, Methomyl, Diquat, Picoxystrobin, Flumetsulam, Teflubenzuron, Imidacloprid, Lambda-cyhalothrin, Imazethapyr, Azoxystrob-in y Flutriafol. Esas sustancias se dividen entre herbicidas, insecticidas y fungicidas, y muestran una diversidad de moléculas que actualmente mantienen la producción de

cultivos, aunque también poseen diversos impactos en los ecosistemas y en los seres humanos (DAUFENBACK et al., 2022)

2.2. ATRAZINA

Si bien el uso de glifosato figura como uno de los agrotóxicos que generan mayor preocupación (LIMA et al., 2021), la 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino triazina, o atrazina (ATZ) (Figura 1), también posee relevancia en términos toxicológicos. Químicamente, la ATZ se presenta como un polvo cristalino y blanquecino, inodoro, con características poco volátiles, poco reactivas e inflamables. Esta triazina es sintetizada en laboratorios como químico de grado técnico con porcentajes de pureza que van desde el 92% al 99.9% (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1999). Es una sustancia fácilmente soluble en dimetilsulfóxido, moderadamente soluble en alcohol etílico, dietil éter, cloroformo o etil acetato, y es poco soluble en agua. Además, en formulados secos se conserva estable. No entanto, en ambientes ácidos, alcalinos, soluciones acuosas neutras o en temperaturas extremas, tiende a hidrolizarse a 2-hidroxiatrazina, tornándose un metabolito secundario carente de actividad herbicida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990).

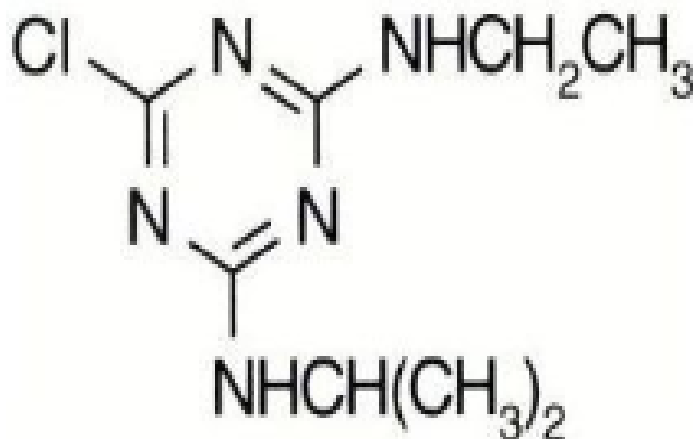


Figura 1. Fórmula estructural de la Atrazina (Fuente: adaptada de Ibama, 2019).

Las propiedades tanto físicas como químicas explican su amplia utilización en la agricultura. La atrazina se validó como el herbicida triazínico por excelencia en el combate de malezas gramíneas, particularmente en Estados Unidos, donde está catalogada como un pesticida de uso restringido (RUP), siendo que las personas que lo manejan

deben tener certificaciones específicas, a través de las oficinas estatales (LAKSHMINARAYAN et al., 1996). De acuerdo con Dorsey et al. (2003), la aplicación se puede realizar en polvo, líquido o granulado, facilitando la incorporación a diferentes sistemas de cultivo.

El mecanismo de acción del agrotóxico conecta las propiedades físico-químicas con sus efectos fisiológicos: una vez la ATZ disuelta en el suelo, es absorbida por las plantas a través de las raíces gracias a la interceptación radicular y viaja por el xilema hasta su sitio activo, el sitio A del fotosistema II, causando que el proceso de transferencia de electrones en la fotosíntesis sea inhibido (SHIMABUKURO & SWANSON, 1969). La fotosíntesis es la principal forma de obtención de energía de organismos autotróficos; por lo tanto, si este mecanismo se ve afectado, la planta muere (MARCHI et al., 2008). El mismo mecanismo de absorción y translocación que asegura su eficacia en plantas también es responsable de su persistencia ambiental, debido a que permanece en suelos y cuerpos de agua, prolongando su acción más allá del cultivo objetivo (SU & LIANG, 2011).

Dicha persistencia es el foco de los estudios toxicológicos. En tanto que su función agronómica está bien caracterizada, investigaciones como las de Jablonowski et al. (2011) alertan que la ATZ podría causar efectos adversos en otros organismos, convirtiendo su uso extensivo en potencial amenaza tanto para ecosistemas como para la salud ambiental (ROHR, 2021).

2.2.1. Interacción de la atrazina con el medio

La principal vía de entrada de la ATZ al ambiente es a través del suelo, donde fenómenos como la precipitación, escorrentía y lixiviación facilitan la diseminación del agroquímico (HE et al., 2019). Los eventos previamente citados dependen directamente de la composición edafológica; así, Junior (2021) muestra que los latosoles rojos, bajo condiciones de precipitación intensa, podrían transportar altas concentraciones de herbicidas. Una vez incorporada, la ATZ no permanece inmutable, más bien experimenta transformaciones como la degradación microbiana (biótica), degradación por luz (abiótica) y descomposición química (abiótica), interfiriendo en el proceso de degradación. La ATZ sufre procesos de desalquilación e hidroxilación, dando como resultado metabolitos como el de-etil ATZ (DEA), de-isopropil ATZ (DIA), di-desalquil ATZ (DDA), hidroxil ATZ (HA), de-etil hidroxil ATZ (DEHA), de-isopropil hidroxil ATZ (DIHA) y de-etildesisopropilhidroxil ATZ (DEDIHA) (BHATTI et al., 2022). En la Figura 2, se

observan los metabolitos primarios y secundarios de la ATZ encontrados en el medio ambiente. De los 7 metabolitos mencionados, la DEA, DIA y DDA son los principales productos de degradación del ATZ, poseyendo mayor polaridad, movilidad, persistencia y toxicidad (XUE et al., 2021).

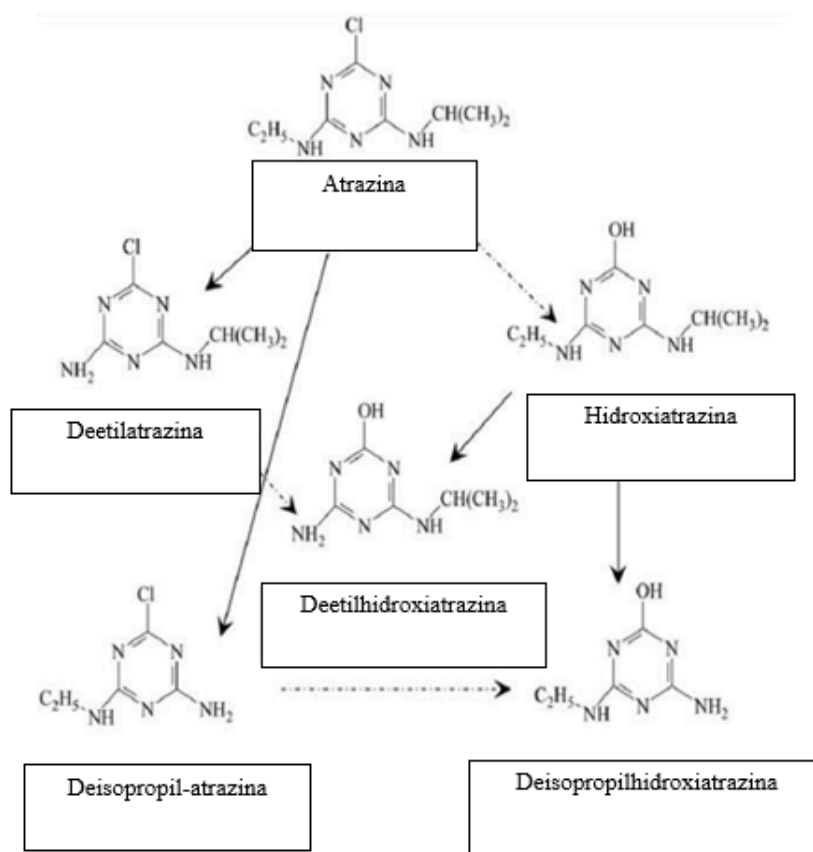


Figura 2. Vía de degradación de la atrazina, con metabolitos primarios y secundarios en cuerpos hídricos (Fuente: adaptado de DE ROSA ELVIRA et al., 2024).

Siendo que en el suelo la ATZ persiste y además es transformada en diferentes metabolitos tóxicos, las superficies donde se encuentren dichos compuestos pueden comportarse como fuentes de contaminación. Así, es posible la liberación o la transferencia a diferentes entornos (CHEN et al., 2015). Dentro del mismo suelo, existen comunidades microbianas benéficas para el suelo que se pueden ver afectadas al contacto con los compuestos agroquímicos. Algunos estudios reportan que la aplicación repetida de atrazina podría modificar de manera significativa la estructura y función de los microorganismos del suelo (SEGHERS et al., 2003). Estudios como los de Tortella et al. (2013) confirman que en condiciones de aplicación repetida en concentraciones de 40 mg kg^{-1} , existe inhibición de la actividad enzimática y la diversidad microbiana.

En contrapartida a los efectos inhibitorios de los microorganismos como respuesta a la exposición de atrazina, la literatura reporta que especies de bacterias y hongos son capaces de degradarla. En un experimento donde se añadió ATZ en concentración de 1000 mg L^{-1} a un consorcio bacteriano, fue detectada la presencia de agentes como DIA y HA (metabolitos secundarios) entre la segunda y cuarta semanas de experimento (KOLEKAR et al., 2019), evidenciando así la capacidad de algunas especies de bacterias para degradar herbicidas.

Una vez que la ATZ es diseminada a partir del suelo, dicho compuesto puede ser transportado fácilmente para cuerpos de agua tanto superficiales como subterráneos, debido a su persistencia. El modelaje hídrico es una herramienta útil para estimar la distribución de la ATZ en los cuerpos de agua. En una investigación se realizó un modelo que estudiaba concentraciones de ATZ en aguas subterráneas, obteniendo valores entre $0,004$ y $4,7 \mu\text{g L}^{-1}$, concluyendo que hay una relación directamente proporcional entre el uso de la ATZ y la edad del agua subterránea (STACKELBERG et al., 2012). Al hacer un estudio en lagos y arroyos de Estados Unidos, en aguas superficiales, se evidenció que entre más cultivos con uso de ATZ existen cerca del cuerpo hídrico, mayor concentración del compuesto hay en ellos (YUN & QIAN, 2015).

En conjunto, estos hallazgos muestran que la ATZ, al entrar en contacto con suelos y cuerpos de agua, no solo se transforma en metabolitos persistentes con potencial tóxico, sino que también interactúa con comunidades microbianas, distintos ecosistemas y especies, generando impactos ecológicos. Lo anterior justifica su atención en estudios toxicológicos.

2.2.2. Exposición a la atrazina en organismos desarrollados

Los efectos de la ATZ en los organismos han sido un tema ampliamente estudiado en diversos grupos taxonómicos, evaluando principalmente su toxicidad, a partir de parámetros como mortalidad, características que afectan el estado físico basal (*fitness*) del ser vivo, efectos que median el desarrollo reproductivo y la función inmunológica. La mayoría de las investigaciones toman como modelo a los organismos acuáticos, donde se observa notable sensibilidad a este herbicida. Por ejemplo, en la especie ictiológica *Astyanax altiparanae*, expuesta a diferentes concentraciones subcrónicas de ATZ, se encontró que se producen alteraciones y signos prematuros de daño celular en hígado y testículos, además de activación de procesos que indican oxidación e inflamación

(DESTRO et al., 2021). En concordancia, Wang et al., (2019) mostró que la exposición de ATZ en concentraciones de 25 µg/ml en neutrófilos obtenidos de la sangre del pez carpa común (*Cyprinus carpio*), puede causar apoptosis en las células, además de inducir la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disfunción mitocondrial. Así mismo, la exposición de 3 dosis subletales de atrazina en el pez *Channa punctata* causa micronúcleos en los eritrocitos de la sangre, daño en el DNA y en las células de las branquias (NWANI et al., 2011).

Más allá de los ambientes acuáticos, un estudio en mamíferos reveló que en ratones BALB/c hembras, expuestas a dosis bajas, medias y altas de ATZ, por medio de la alimentación forzada, tuvieron diferencias significativas en el peso corporal (CHANG et al., 2021). Las dosis más altas de ATZ indujeron la reducción del peso corporal, del bazo y de las células esplénicas, en adición, disminuyeron células en sangre: linfocitos, leucocitos y monocitos. En el mismo experimento, al realizar un examen toxicológico, se ha observado que, con dosis medias y altas, ocurre aplasia y muerte tecidual en timo, bazo, hígado y riñones. Las dosis altas solo causaron una baja en neutrófilos, glóbulos blancos y normoblastos. Finalmente, se evaluaron marcadores inmunológicos como niveles de interleucina-5 e inmunoglobulinas, con los cuales se pudo concluir que dicho herbicida es capaz de causar inmunotoxicidad (CHANG et al., 2021).

En anfibios, organismos bioindicadores, también se reportan efectos adversos. Mahmoud et al. (2022) hallaron en *Sclerophrys regularis* lesiones histopatológicas en riñón e hígado, incluyendo acumulación de gotículas lipídicas, fibrosis y hemorragias hepáticas y cambios en las concentraciones de glucógeno. Este tipo de alteraciones similares a las reportadas en peces y mamíferos refuerzan la idea de una afectación transversal a distintas especies y niveles biológicos.

2.2.3. Exposición a la atrazina en el desarrollo embrionario

Los estudios experimentales en modelos animales han demostrado el potencial embriotóxico y teratógeno de diversos agroquímicos y la ATZ no es la excepción (GARCIA, 1998). El organismo acuático *Danio rerio* expuesto a este herbicida en etapa embrionaria desarrolló anomalías morfológicas como edemas, deformidades del saco vitelino, lordosis, escoliosis y acortamiento corporal, así como formación de especies reactivas de oxígeno e incremento en la cantidad de enzimas indicadoras de estrés oxidativo (CHROMCOVA et al., 2013).

De forma complementaria, los modelos murinos han permitido observar mecanismos más específicos a nivel genético y reproductivo. Ratones hembra embarazadas indicaron que los individuos expuestos a ATZ en el desarrollo embrionario tienen mayores niveles de 8-oxo-guanina en las células meióticas. El 8-oxo-guanina es una base nitrogenada del DNA, marcador de daño en el material genético y estrés oxidativo, que compromete la reparación y la sinapsis cromosómica (GELY-PERNOT et al., 2017). Otra investigación con ratones hembras expuestas a ATZ desde la etapa embrionaria, indicó anormalidades uterinas en la madurez. La hipótesis del mecanismo de acción es que la ATZ actúa independiente de estrógeno (GRIFFITHS et al., 2022).

Los hallazgos encontrados en embriones de aves indican que la exposición a dosis altas de ATZ *in ovo* puede inhibir el crecimiento en codornices machos y hembras. En adición a concentraciones de 504 µg/kg por huevo, se tuvo efectos en el sistema reproductivo en las crías hembras, una vez nacidas (WILHELMS et al., 2006). Matsushita et al. (2006) mostraron que la exposición *in ovo* actúa como disruptor endocrino, al influir en la diferenciación ovárica.

Así, las investigaciones mencionadas reflejan que la exposición embrionaria a la ATZ puede alterar procesos en el desarrollo, abarcando cambios morfológicos, genéticos y endocrinos que a su vez pueden variar entre especies.

2.3. EMBRIÓN DE GALLINA COMO MODELO EXPERIMENTAL

Los modelos embrionarios de gallina (*Gallus gallus*) han sido usados por décadas para diversos estudios relacionados con el desarrollo de vertebrados, debido a su relevancia biomédica en la comprensión de procesos embrionarios. Además, son comercialmente disponibles, de bajo costo y de fácil manipulación (STARK & ROSS, 2019).

En términos comparativos, las aves, al ser organismos ovíparos y amniotos, desarrollan estructuras extraembrionarias, tales como el saco alantoideo que es un homólogo al presente en mamíferos, lo que refleja una conservación fisiológica en ambos grupos (SMITH et al., 2012). Dicha ortología entre aves y mamíferos permite extrapolar resultados obtenidos en modelos aviares a algunos procesos del desarrollo ocurridos en mamíferos (LUCKETT, 1977). No obstante, existen diferencias fisiológicas: el desarrollo aviar ocurre fuera del útero y sin metabolismo materno, a diferencia de mamíferos, donde

las sustancias son primero metabolizadas en el hígado materno, alterando la biodisponibilidad y toxicocinética de las mismas (WACHHOLZ et al., 2021).

Estudios toxicológicos en embriones de aves se fundamentan en su demostrada sensibilidad biológica y especificidad fisiológica frente a xenobióticos, convirtiendo dicho modelo en un sistema confiable para el estudio de toxicidad, teratogenicidad, genética, nutrición, microbiología, entre otros (HILL & HOFFMAN, 1984). En este sentido, la prueba *in ovo* de toxicidad del desarrollo es una metodología que evalúa los potenciales efectos tóxicos de determinadas sustancias químicas dentro del embrión de ave, implicando un procedimiento meticuloso que va desde la obtención de los huevos, hasta su puesta en condiciones controladas, la exposición a los tratamientos y el análisis final para calcular índices de respuesta embrionaria (ACHARYA et al., 2024).

Los estudios de toxicidad que evalúan agrotóxicos en embriones de ave son comunes. Investigaciones previas han evaluado los efectos estructurales de insecticidas clorados como el 1,1,1 tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (DDT) y sus metabolitos en la células neurales de embriones de aves (BORNMAN et al., 2007). Otros estudios han descrito los efectos embriotóxicos del fungicida Rovral *in ovo* (ARCAIN et al., 2021), las anomalías hepáticas en embriones aviares por la exposición al herbicida fenoxi, ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (SANTAGOSTINO et al., 1988). Asimismo, se han realizado ensayos con clorpirifos (CHANDRA SEKARAN et al., 2023) y con metabolitos de la atrazina (JOSHI et al., 2013).

A pesar de la diversidad de agroquímicos que han demostrado efectos negativos en el desarrollo embrionario de gallinas, son poco conocidos los efectos tóxicos y teratogénicos que la ATZ puede tener en el desarrollo del embrión de ave y en el tejido hepático embrionario. Con esto, es importante realizar investigaciones que contemplen las interacciones de químicos como factor desencadenante de embriotoxicidad, visto que cada mecanismo depende del nivel de exposición, determinado por procesos toxicocinéticos.

2.4. PROBABLE TOXICOCINÉTICA DE LA ATRAZINA EN AVES

El entendimiento de los componentes toxicocinéticos y toxicodinámicos es de importancia en la evaluación de riesgos asociados a diferentes xenobióticos. Por un lado, la toxicocinética describe los procesos que ocurren en el organismo una vez que el xenobiótico llega a dosis efectivas, comprendiendo 4 etapas: absorción, distribución,

metabolismo y eliminación (ADME) (CROOM, 2016). Cabe destacar que la susceptibilidad a esas sustancias cambia durante el desarrollo de un organismo, es decir, que dosis que pueden ser seguras para adultos podrían ser peligrosas, incluso nocivas en etapas tempranas (CROOM, 2016). Ya la toxicodinámica, que se divide en diferentes niveles: molecular, celular, tisular y orgánico, se encarga de investigar los mecanismos por los que un xenobiótico interactúa y produce un efecto adverso (CROOM, 2016).

Como todo xenobiótico, el comportamiento toxicocinético de la ATZ comienza con la absorción y distribución, siendo estos los primeros pasos para conocer el potencial químico del herbicida, ya que determinan la biodisponibilidad del compuesto para interactuar con diversos tejidos.

2.4.1. Absorción y distribución en embriones de ave

En los huevos de ave, la exposición del embrión a componentes xenobióticos ocurre mediante diferentes vías *in ovo* (LEHEL et al., 2021). En la experimentación controlada, se utilizan métodos de simulación de absorción del ambiente al embrión, como la inyección de la sustancia en partes del huevo, tales como el albumen, saco vitelino o la yema, aunque también es posible utilizar otras metodologías como la inmersión del huevo en la sustancia (LEHEL et al., 2021).

Una vez el compuesto es introducido en el embrión, comienza el proceso de distribución que depende mayormente de las estructuras extraembrionarias como el alantoides y la bolsa amniótica (SHENG & FOLEY, 2012). A pesar de que no existen investigaciones sobre la absorción y distribución de ATZ en embriones de ave, estudios con otros xenobióticos, como el albendazol sulfóxido, indican que la concentración máxima en el embrión es observada 36 horas luego de la inyección, lo que indica una absorción gradual (NAVARRO et al., 1997).

2.4.2. Metabolismo y biotransformación en aves

Una vez que la ATZ ha entrado al organismo gracias al proceso de absorción, ocurre el metabolismo. En organismos vertebrados desarrollados, el metabolismo es realizado en el hígado, donde una porción de la ATZ total es transformada en DEA, DIA y DEDIHA (QIAN et al., 2024).. En la Figura 3 se muestra un diagrama de las posibles conversiones metabólicas de la ATZ, que ocurren en gallinas ponedoras expuestas, ahí los metabolitos de la ATZ (I) son los análogos hidroxilados de I, es decir: la hidroxiatrazina (HA) (V) y

los intermediarios de la N-desalquilación de I y V que en el último paso lleva a la formación de 2-cloro-4,6-(di-amino)-s-triazina (IV) y ammelina (VIII), respectivamente (FOSTER & KHAN, 1976)

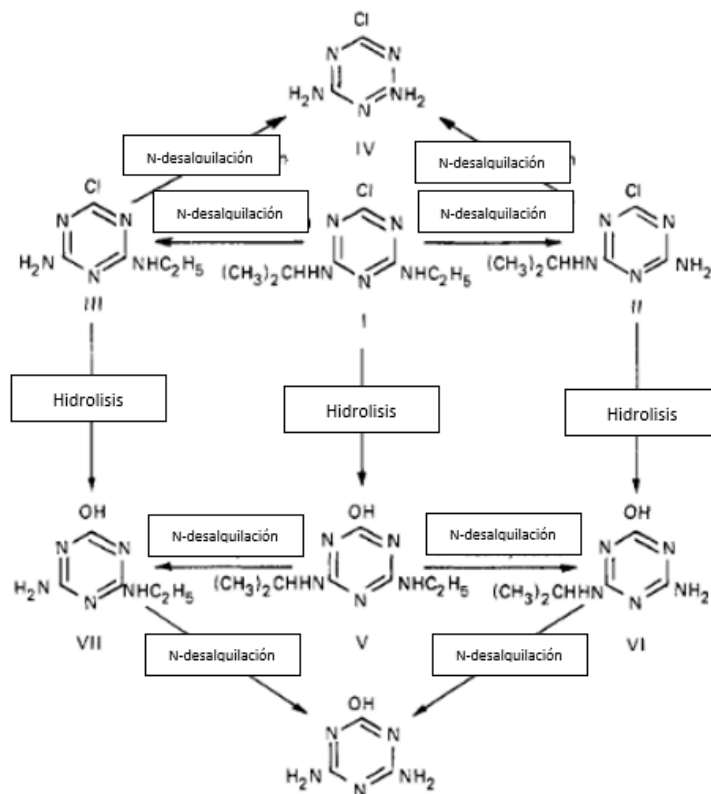


Figura 3. Vía metabólica de la ATZ en gallinas ponedoras (Fuente: adaptado de FOSTER & KHAN, 1976)

Asimismo, Du et al. (2017) proporcionan un análisis sobre la relación entre las isoformas enzimáticas del citocromo P450 (CYP450) y el metabolismo de la ATZ administrada en codornices (*Coturnix coturnix*) adultas. Los autores reportaron que el incremento en la dosis administrada de ATZ provoca una respuesta dosis-dependiente en los niveles de RNA mensajero (mRNA) de varias isoformas, incluyendo CYP1B1, CYP2D6, CYP2C18, CYP2H1, CYP3A4, CYP3A7 y CYP4V2. Los resultados anteriores indican que la exposición a ATZ activa el sistema hepático de biotransformación de xenobióticos, como la expresión génica de múltiples CYP450. A pesar de lo expuesto, existe poca información sobre la actuación metabólica de la ATZ en el hígado de embriones de aves.

2.4.3. Eliminación y persistencia en aves

En aves adultas, la eliminación de xenobióticos ocurre a nivel renal al igual que en mamíferos (HUNTER et al., 2008). Sin embargo, la filtración glomerular en aves no es constante y la función renal varía en el ciclo reproductivo, lo que influye en la cinética de las sustancias (HUNTER et al., 2008).

En contrapartida, la eliminación de xenobióticos en los embriones aviares no ocurre debido a la ausencia de órganos excretores; por tanto, permanecen en la circulación sanguínea durante la incubación a excepción de los desechos metabólicos nitrogenados que son secuestrados en el alantoides como una suspensión semi sólida de uratos. Lo anterior podría llevar a una persistencia tisular de los xenobióticos en el embrión (FRY, 1995). En la Figura 4 se muestran las estructuras que componen el sistema embrionario en aves.

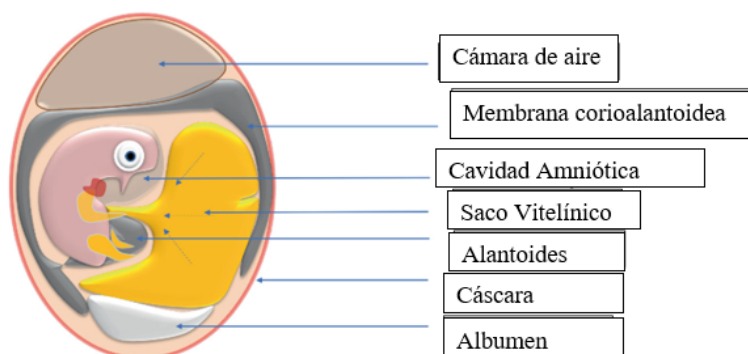


Figura 4. Estructuras que componen el huevo de gallina (Fuente: adaptado de HOLDEN et al., 2022)

Como se mencionó, los embriones carecen de un sistema de eliminación. En adición, la capacidad hepática para la biotransformación de xenobióticos también es limitada (HAMILTON et al., 1983). El hígado embrionario de aves sigue un proceso específico en relación con los sistemas de detoxificación; por ejemplo, algunas enzimas que actúan en las reacciones de oxidación, como la aril hidrocarburo hidroxilasa (AHHasa) y la 7-ethoxy coumarina-O-deethylasa, son expresadas en las fases tempranas del desarrollo (HEINRICH-HIRSCH et al., 1990). Asimismo, los mecanismos de conjugación, importantes en procesos de detoxificación, se expresan en etapas tempranas de forma insignificante y aumentan drásticamente hasta la eclosión, indicando una madurez en el organismo (DUTTON, 1978). Así, comprender la función y limitación del hígado es importante para estudiar la toxicocinética de xenobióticos como la atrazina en embriones.

2.5 IMPORTANCIA DEL HÍGADO EN LOS PROCESOS TOXICOCINÉTICOS DE LA ATZ

El hígado es un órgano esencial en el metabolismo de algunos xenobióticos (CHEN et al., 2019). De hecho, la función principal de este órgano es la biotransformación de diversos compuestos, en su mayoría lipofílicos, incluidos los productos finales metabólicos, contaminantes, antinutrientes, productos químicos y fármacos (ZAEFARIAN et al., 2019).

Posterior al proceso de absorción de un xenobiótico, ocurre la distribución sistémica, que se encarga de llevar la sustancia al hígado a través de la circulación sanguínea. Ya en el hígado, los hepatocitos y algunas enzimas como los citocromos P450 realizan la biotransformación mediante reacciones de reducción, oxidación, hidrólisis y conjugación, ayudando a la transformación de sustancias lipofílicas en moléculas polares e hidrosolubles, lo que facilita la eliminación (ZAEFARIAN et al., 2019).

2.5.1 Mecanismos de hepatotoxicidad

Son diversos los mecanismos de hepatotoxicidad que se registran entre especies de vertebrados y que a su vez se correlacionan con el uso de xenobióticos (INGAWALE et al., 2014). Muchos de estos mecanismos se encuentran interrelacionados. Por ejemplo, en aves de la especie *Columba livia* expuestas a avermectina, se observaron lesiones hepáticas estrechamente relacionadas con el estrés oxidativo y apoptosis (ZHU et al., 2013). A continuación se describen los principales mecanismos de toxicidad hepática por exposición a xenobióticos en diferentes modelos animales.

2.5.1.1 Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

El estrés oxidativo en células hepáticas por tratamientos con xenobióticos es uno de los mecanismos más importantes y con mayor respaldo bibliográfico (QIAN et al., 2024). Uno de estas sustancias es la ATZ que es capaz de producir radicales libres en el organismo, que a su vez generan cantidades umbrales de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la alteración en el metabolismo redox y por disfunciones en las cadenas respiratorias mitocondriales, elevando así niveles de estrés oxidativo intracelulares (QIAN et al., 2024).

En el artículo de Zhang et al. (2017) han observado alteraciones en el hígado de codorniz mediante tratamiento con ATZ, observando daño mitocondrial irreparable y

comprometimiento de la integridad morfológica y fisiológica del hígado. En el mismo estudio, el grupo expuesto a 500 mg/kg de ATZ tuvo lesiones hepáticas por la inflamación mitocondrial, destrucción de crestas y acumulación de gotas lipídicas en el tejido.

Las consecuencias de las lesiones mitocondriales son la producción deficiente de ATP y amplificadores del estrés oxidativo, tal como lo reportan Nwani et al. (2010), quienes estudiaron marcadores de amplificación del estrés oxidativo, como peroxidación lipídica (LPO), en el hígado del pez *Channa punctatus*, tras la exposición a ATZ. El incremento de LPO formado es un indicador de producción de ROS que en altos niveles puede llevar a la inactivación enzimática, peroxidación de lípidos, daño en el DNA y muerte celular (NWANI et al., 2010).

2.5.1.2 Estrés del retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático se encarga de realizar el plegamiento de proteínas, de mantener los niveles de calcio intracelular y de la síntesis de lípidos (BARAL, 2024). Para desempeñar estas funciones, varios procesos ocurren en homeostasis total. Por ejemplo, en mamíferos, el plegamiento de proteínas se produce por las proteínas chaperonas resistentes en el RE en conjunto con un ambiente redox que incluye proteínas del tipo de disulfuro isomerasa (PDI) y oxidoreductina del retículo endoplasmático (ERO1) (BARAL, 2024). Sin embargo, la síntesis constante de proteínas puede saturar el RE por la acumulación de proteínas mal plegadas (JACKSON et al., 2023). Al evento anterior se le denomina estrés del retículo endoplasmático. Dentro del hígado, un mecanismo para mitigar el estrés del RE se inicia; este es un conocido evento de respuesta a la proteína desplegada (UPR) y busca aliviar el daño celular (BARAL, 2024; JACKSON et al., 2023).

La atrazina ha demostrado generar estrés del RE en diferentes tejidos y especies, aunque no hay estudios en aves.

En la línea L02 de hepatocitos humanos, la ATZ ha demostrado que activa mecanismos del estrés del RE; en este caso, la activación se correlaciona con el aumento de los niveles de iones de calcio intracelular; además, en el estudio se identificaron niveles aumentados de mRNA y proteína de las proteínas chaperonas GRP78 y GRP94 (QIAN et al., 2025).

2.5.1.3. Apoptosis

Como resultado de la acumulación de daños por estrés oxidativo, mitocondrial y estrés del RE, las células pueden entrar en apoptosis, también conocida como muerte

celular programada. En la investigación de Zaya et al. (2011), se utilizaron renacuajos de *Xenopus laevis* con exposición a la ATZ, y se observó que los renacuajos tratados con 400 µg/L tuvieron una mayor cantidad de células inmunopositivas para caspasa-3 activada en el hígado, lo que sugiere un aumento en la tasa de apoptosis.

De esta forma, las investigaciones consultadas convergen en una secuencia de eventos donde la ATZ, al elevar las ROS y dañar las mitocondrias, podría a su vez sobrecargar el RE y activar las UPR. En el caso de que los sistemas homeostáticos de compensación fallen, la exposición a ATZ puede ocasionar apoptosis (ZAYA et al., 2011). Esos mecanismos son descritos en organismos adultos, y los impactos sobre el hígado en desarrollo pueden ser aún más drásticos y comprometer su correcta formación y funcionamiento por toda la vida.

2.6. HEPATOGÉNESIS EN *Gallus gallus*

El desarrollo del hígado en los embriones de gallina sigue una secuencia caracterizada dentro de las etapas de Hamilton & Hamburger (HH) (Hamilton & Hamburger, 1992; WONG & CANVEY, 1992). La hepatogénesis en el embrión aviar comienza entre las 50-53 horas de incubación, puesto que en dicha fase los divertículos endodérmicos emergen del intestino anterior y llegan hasta el septum transversal, específicamente al mesodermo; las partes distales y proximales de los divertículos posteriormente formarán el hígado, los conductos biliares y la vesícula, respectivamente (Figura 5) (WONG & CANVEY, 1992).

A nivel morfológico, el hígado de ave embrionado en el séptimo día de incubación se observa compacto y dispuesto en cordones de parénquima que en el centro poseen un espacio interno (lumen) que conforman el canalículo biliar. En los cordones parenquimatosos que se disponen de forma cilíndrica son encontradas las células hepáticas o hepatocitos con formas cuboidales y columnares. Dichas células poseen núcleos prominentes con nucleolos visibles (WONG & CANVEY, 1992;). Además, es posible visualizar algunos organelos que conforman los hepatocitos, como por ejemplo, las mitocondrias hepáticas, que cuando observadas con microscopía electrónica de barrido demuestran longitudes aproximadas de 8µm y una forma filamentosa (Sandström & Westman, 1971). En el mismo estudio se reportan pocas y pequeñas cisternas de retículo endoplasmático rugoso en el citoplasma.

Cada cordón hepático es seccionado por capilares sinusoides, que son espacios vasculares recubiertos por una capa endotelial y macrófagos, que poseen funciones como

el pasaje de células sanguíneas y oxígeno, además de tener un rol en la hematopoyesis (WONG & CAVEY, 1993; Guedes et al., 2014). Los macrófagos encontrados alrededor de los sinusoides, también conocidos como células de Kupffer inmaduras, se encargan de la fagocitosis de eritrocitos en los espacios vasculares (SORRELL & WEISS, 1982). Wong & Cavey (1993) reportan que los macrófagos en el revestimiento endotelial de los sinusoides aparecen en la fase del desarrollo 29 (HH 29).

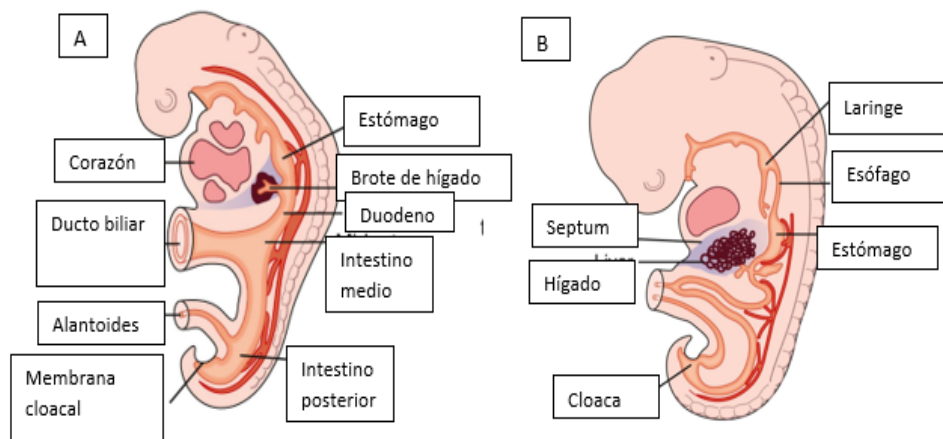


Figura 5. Origen de los hepatoblastos en etapas embrionarias (Fuente: adaptado de SLEISENGER & FORDTRAN, 2023)

En el día 7 de incubación, correspondiente a la fase HH 30, el hígado del embrión aviar está totalmente desarrollado físicamente (WONG & CAVEY, 1993). El hígado actúa como un órgano hematopoyético granulocítico secundario en el embrión, en cuanto la médula ósea todavía no está totalmente desarrollada (WONG & CAVEY, 1993; YAN et al., 2025). La actividad hematopoyética en el hígado embrionario de ave comienza entre los días E15 - E21, notada a partir de la observación de la presencia restringida de granulopoyesis en el tejido conectivo de los espacios porta hepáticos (Guedes et al., 2014), como mostrado en la Figura 6. En el mismo estudio no se observaron signos de eritropoyesis hepática en estas fases.

En adición, durante los días 7 y 8 de incubación, aparece por primera vez el glucógeno hepático y hay un incremento de aproximadamente 7 mg/g en el día 10 de incubación a 26 mg/g en el día 19 de incubación (BALLARD & OLIVER, 1963). Lo anterior ocurre antes de que los islotes pancreáticos sean formados, en el octavo día de incubación. Así, el glucógeno hepático presente en el embrión de gallina podría indicar

que el hígado almacena energía durante el periodo de incubación (BALLARD & OLIVER, 1963).

Teniendo en cuenta que el hígado es el órgano que realiza los procesos del metabolismo de xenobióticos, es importante conocer los mecanismos implicados en la hepatotoxicidad durante el desarrollo embrionario.

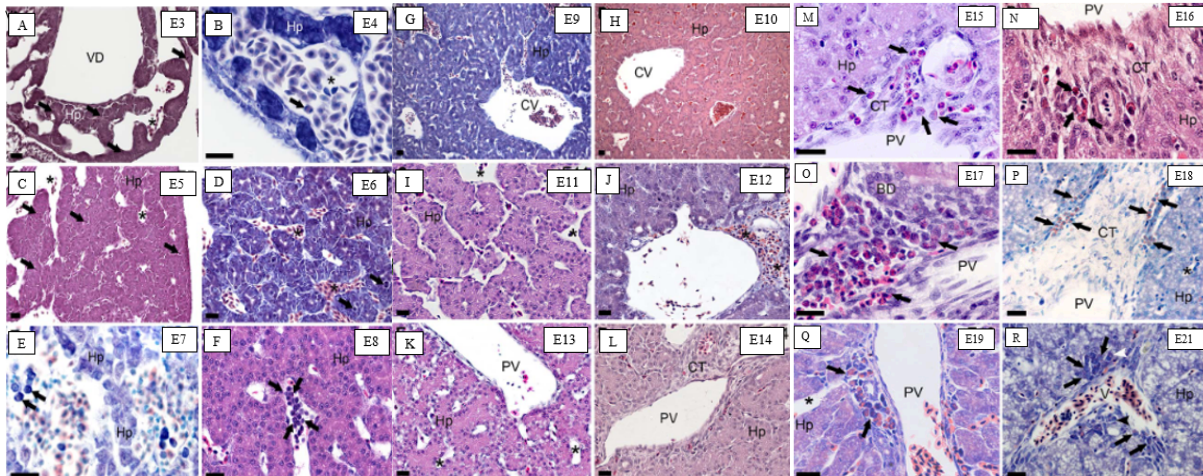


Figura 6. Microfotografías del hígado embrionario de ave demostrando los tiempos de la hematopoyesis. Estadios E3 a E8 (A-F) sin actividad hematopoyética. En E3 (A), E5 (C) y E6 (D) se observa mitosis de hepatoblastos (indicadas con flechas). En E4 se ve la mitosis de un eritrocito circulante (flechas). En E7 se observan células hematopoyéticas inmaduras (flecha) en los sinusoides. En E8 hay células eritropoyéticas inmaduras (barras). Desde E9 a E14 se observa la ausencia de actividad hematopoyética. De E15 a E21 se observa un hígado con actividad hematopoyética únicamente granulocítica en el tejido conectivo (CT) de los espacios porta-hepáticos (indicados en flechas). Hp, hepatoblastos; VD, ducto venoso; capilares sinusoidales (asterisco); PV, vena porta. E3, E5, E8, E10, E11, E12, E13, E15, E16, E17 (tinciones de hematoxilina-eosina); E4, E6, E7, E9, E18, E19, E21 (Giemsa de Lennert). Barras indican 20 μ m. (Fuente: adaptado de Guedes et al., 2014).

2.6.2. Hepatotoxicidad de embriones de aves

Alteraciones en hígado de embriones de gallina son reportadas en algunos estudios con agrotóxicos, se detectaron alteraciones bioquímicas en el hígado, específicamente en la disminución significativa de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa, enzima importante en la gluconeogénesis, además de un aumento en la enzima ATPasa en embriones de gallina de 12 días, expuestos al insecticida organoclorado endosulfán, lo que sugiere una dinámica compensatoria (PUSHPANJALI et al., 2005). Con el clorpirifos (CPF), un insecticida organofosforado que actúa como inhibidor de la colinesterasa y que tiene un potencial teratogénico, se realizó un estudio donde se evaluó su impacto en embriones de codorniz (QUERO et al., 2024). Los resultados histopatológicos mostraron degeneraciones, como focos de necrosis, congestión vascular e infiltración celular (QUERO et al., 2024). Lo

anterior demuestra la alta embriotoxicidad del CPF, dado que una sola exposición es capaz de producir lesiones hepáticas, tal y como se muestra en la Figura 7.

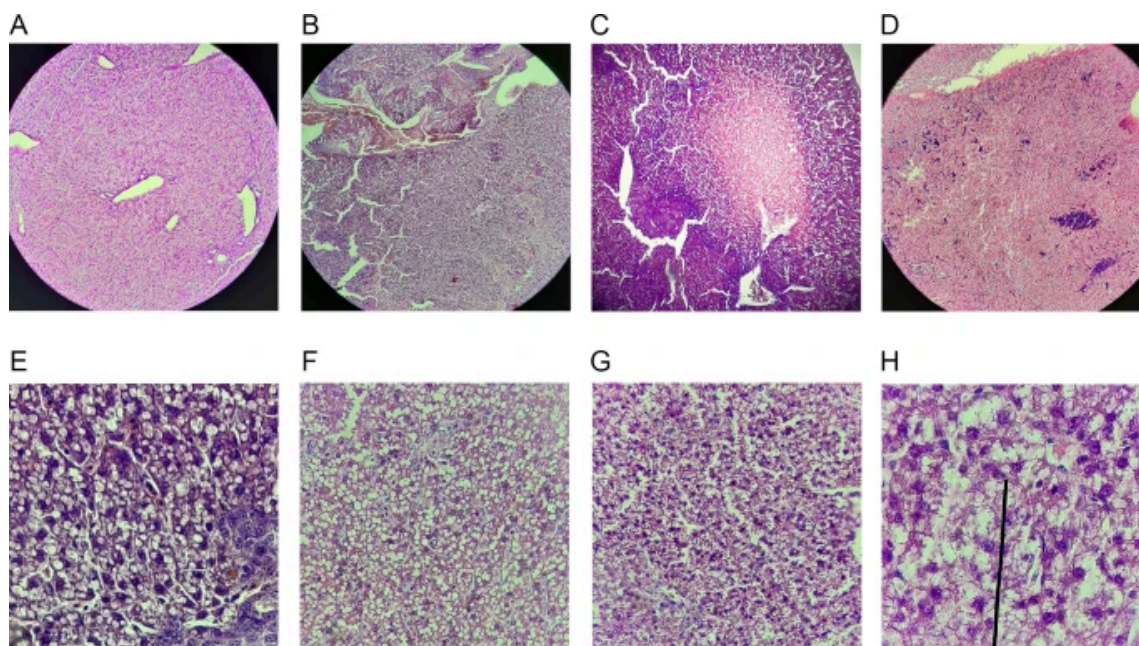


Figura 7. Lesiones observadas en hígado de codorniz tratado con CPF. A) es el grupo control (día 1), con un parénquima normal; B) representa el tratamiento de 38,4 µg/huevo, con trastorno trabecular; C) correspondiente al tratamiento de 192 µg/huevo de CPF, posee tejido necrótico al igual que D) que es el tratamiento con 384 µg/huevo. En E) (38,4 µg/huevo) hay dilatación de los sinusoides, aunque las células hepáticas están conservadas, así como en F) (192 µg/huevo); G) representa al tratamiento 384 µg/huevo, donde se perciben daños en hepatocitos y citoplasma; H) en la dosis mayor de CPF hubo lesiones graves, incluyendo necrosis y vacuolización (Fuente: adaptado de QUERO et al., 2024).

Ya con el glifosato, el herbicida de mayor uso a nivel mundial, fue realizado un estudio donde se evaluaron los efectos en el hígado y el riñón en embriones de ave expuestos a dicha sustancia. En el sexto día de incubación se aplicaron 10 mg de glifosato por kg de masa de huevo mediante inyección en la cámara de aire; y los huevos fueron incubados hasta la eclosión. Los hallazgos histológicos en los pollos tratados con glifosato *in ovo* reportan inflamación, hemorragia, necrosis y aumento de la espesura de la vena central (FATHI et al., 2019).

Considerando el conocimiento previo sobre los efectos de ATZ en el hígado de varios organismos desarrollados, y la escasez de estudios sobre los efectos de este compuesto en el desarrollo hepático de embriones de organismos amniotas (aves y mamíferos), el presente trabajo tuvo como objetivo analizar los efectos de la atrazina en el desarrollo de embriones de gallina, específicamente sobre la hepatotoxicidad, desarrollando un protocolo de análisis histológico apropiado.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la exposición aguda a la atrazina sobre parámetros de toxicidad del desarrollo y sobre la morfología histológica del hígado en embriones de *Gallus gallus* en el séptimo día de incubación.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la exposición aguda a la atrazina sobre la mortalidad embrionaria en embriones de *Gallus gallus*.
- Evaluar alteraciones morfológicas externas y parámetros del desarrollo embrionario, incluyendo presencia de hemorragias, malformaciones, peso embrionario y etapa del desarrollo (HH), posterior a la exposición a atrazina.
- Comparar diferentes protocolos de fijación histológica visando la optimización de la preservación morfológica del hígado embrionario de *Gallus gallus* en el séptimo día de incubación.
- Describir y comparar la morfología histológica del hígado de embriones tratados con atrazina y sus respectivos controles en el séptimo día de desarrollo.

4. METODOLOGÍA

4.1 OBTENCIÓN DE HUEVOS EMBRIONADOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente proyecto fue contemplado por la Comisión de Ética en el uso de Animales (CEUA-Unila), de acuerdo con la NOTA INFORMATIVA CONCEA/Nº 01/2024.

Huevos fertilizados de gallina (*Gallus gallus*) se obtuvieron mediante la compra a productores orgánicos en la ciudad de Foz do Iguaçu, Paraná, entre los meses de septiembre a noviembre de 2025. En total se obtuvieron 7 docenas (n = 84) de huevos (Tabla 1), que fueron distribuidos en 5 repeticiones de 12 huevos cada una (6 huevos tratados y 6 controles) para la concentración de 2000 µg/L de atrazina diluida en acetonitrila, y 2 repeticiones de 12 huevos cada (6 huevos tratados y 6 controles) para la repetición de 200 µg/L de atrazina diluida en acetonitrila. Cabe destacar que el mayor número de repeticiones en la concentración de 2000 µg/L se debe al foco de estudio de efectos subletales histológicos. Los huevos control fueron tratados con agua destilada y autoclavada, sin embargo no se incluyó un grupo control del solvente (acetonitrila) debido a restricciones temporales durante la experimentación, siendo esta una limitación metodológica reconocida dentro del estudio.

Tabla 1 - Diseño experimental de embriones tratados con Atrazina a dos concentraciones con el respectivo control

	Tratamiento 1		Tratamiento 2	
	Control	ATZ 2000 µg/L	Control	ATZ 200 µg/L
Repetición 1	6	6	6	6
Repetición 2	6	6	6	6
Repetición 3	6	6	-	-
Repetición 4	6	6	-	-
Repetición 5	6	6	-	-

Total de huevos por tratamiento	60	24
--	----	----

Total de huevos	84
------------------------	----

Fuente: Autoría propia

4.2 REACTIVOS E INSUMOS

La atrazina (CAS: 1912-24-9) empleada en dicho experimento es de la marca Sigma-Aldrich, con pureza >98%; la acetonitrila (CAS: 75-05-8) que se utilizó en la disolución de la atrazina también fue adquirida en Sigma-Aldrich, de grado HPLC y con pureza del 99,9%. Además, para alcanzar la concentración de atrazina deseada se añadió agua ultrapura proveniente de un sistema de purificación de la línea ELGA PURELAB.

Inicialmente, se elaboró una solución madre pesando 0,01 g (10 mg) de ATZ y disolviéndose en un balón volumétrico de 10 mL, completando el volumen con acetonitrila. La concentración final de la solución madre fue de 1000 mg/L. A partir de dicha solución madre, fue preparada una solución intermedia de 200 mg/L, de la cual se tomaron 100 µL y 10 µL que se diluyeron en agua ultrapura hasta un volumen final de 10 mL en balones volumétricos separados, obteniéndose así las concentraciones de 2000 µg/L y 200 µg/L de atrazina, respectivamente. Dichas soluciones se transportaron al laboratorio de embriología del desarrollo donde se almacenaron en heladera a temperaturas constantes de -5°C para la conservación eficaz del ingrediente activo.

4.3 TRATAMIENTO

4.3.1 Procesamiento: día 0

El procedimiento realizado en el día 0 de incubación consistió primeramente en la desinfección de las cáscaras de huevo con alcohol 70%. Posteriormente se ejecutó la observación minuciosa de los huevos con el fin de descartar la presencia de abolladuras o fisuras; también se realizó la enumeración de cada huevo y su respectivo pesaje en balanza analítica de la línea EVEN (modelo: EVA-220B-BI).

Sucesivamente, los huevos se llevaron a la capilla de extracción de gases (Spencer Equipamentos). Dentro de la capilla de extracción, usando tijeras quirúrgicas se realizó un pequeño orificio en la cámara de aire de cada huevo (Figura 4), en dicho orificio y con el

auxilio de una pipeta con puntera se inyectaron las soluciones de control o tratamiento. La inyección en la cámara de aire como vía de introducción del xenobiótico fue seleccionada por ser una metodología ampliamente utilizada en estudios *in ovo*, permitiendo la absorción gradual del compuesto. En cada huevo fueron inyectadas las soluciones en una proporción de 1 $\mu\text{L/g}$ de huevo, siendo que la masa de los huevos varió entre 43,56 g y 64,99 g. El volumen fue ajustado individualmente al peso de cada huevo para padronizar la exposición. No fue observada pérdida visible de la solución durante la inyección

Cada huevo, después de inyectado, fue sellado con silicón caliente y colocado en posición vertical con la cámara de aire hacia arriba por 2 horas dentro de una incubadora (Chocadeiras Pantanal). Pasadas dos horas, los huevos se reubicaron aleatoriamente de forma horizontal, y el sistema de rotación de los huevos fue entonces encendido. El proceso de incubación ocurrió por 7 días con un sistema de desplazamiento automático cada 2 horas y la temperatura fue un factor constante dentro de la incubadora con un valor de $38,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$. La humedad fue mantenida con auxilio de bandejas con agua.

4.3.2 Procesamiento: día 7

En el día 7 de incubación se realizó la extracción de los embriones. Así, los huevos fueron retirados de la incubadora, colocados de forma horizontal en un cartón de huevos a temperatura ambiente.

En cada huevo, se realizó un segundo orificio en la cámara de aire para retirar un aproximado de 5-6 mL de albumen (sin dañar el embrión) y así disminuir el volumen interno del huevo para retirar el embrión de la cáscara. Seguidamente, los huevos colocados horizontalmente se cubrieron con cinta adhesiva transparente de 4 a 5 cm de longitud y con una tijera quirúrgica se abrió una ventana en la parte superior de la cáscara del huevo para observar el embrión (Figura 8). Una vez que el embrión estuvo expuesto, se verificó la presencia del corazón latiendo, para análisis de mortalidad. En seguida, el embrión fue colectado con auxilio de tijeras quirúrgicas y cucharas.

Aquellos huevos no fertilizados, indefinidos (que no retomaron el desarrollo) o con el blastoderma definido pero no desarrollado (conforme a ARCAÍN et al., 2021) se descartaron de los análisis. Los criterios de exclusión fueron aplicados igualmente a todos los grupos. De los 84 huevos incubados 14 fueron descartados, divididos en 7 huevos sin embrión, 2 huevos que se encajaron en el parámetro de indefinidos, puesto que no tenían embrión, y el contenido interno presentaba características atípicas como mal olor, yema

verde, yema y clara densas, 3 huevos fueron descartados por poseer fisuras en la cáscara y 3 huevos más se descartaron por tener solo el blastoderma definido.

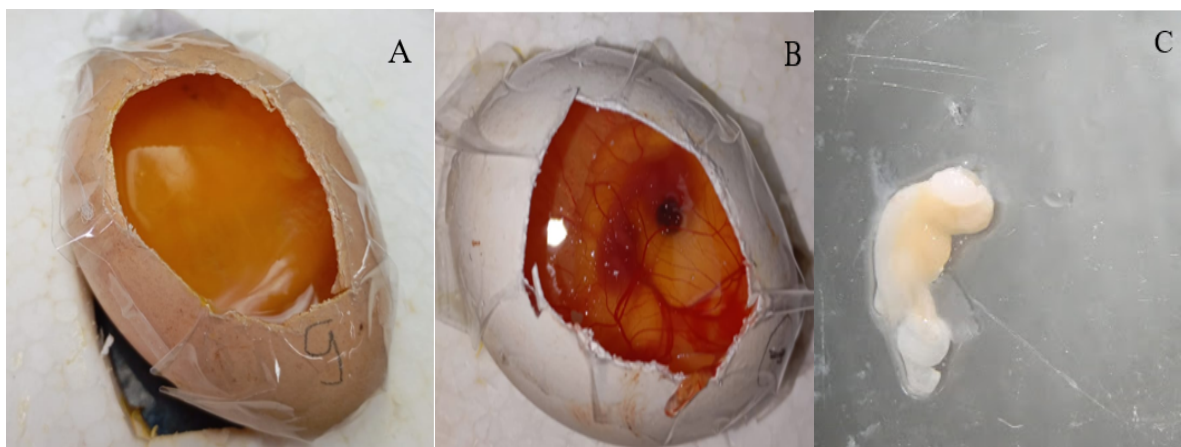


Figura 8. Abertura superior en la cáscara del huevo, donde se observa los compartimentos internos. A) huevo no fecundado con presencia de yema y clara apenas (descartado). B) huevo donde se visualiza yema, membranas vascularizadas y embrión vivo. C) embrión muerto (Fuente: Autoría propia).

Cada embrión de forma separada se colocó en una placa Petri con PBS 1X, que a su vez fue trasladada a un microscopio estereoscópico de la línea Zeiss, para terminar la limpieza del embrión, especialmente retirando las membranas extraembrionarias; además, en esta etapa se verificó la presencia de malformaciones y de hemorragia. En adición, durante la observación de los embriones en lupa se realizó la clasificación de etapas según Hamilton y Hamburger (1951). Finalmente los embriones obtenidos se pesaron en balanza analítica EVEN (modelo: EVA-220B-BI). Una vez registrada la información, el material fue colocado en tubos Falcon de 50 mL con solución Carnoy o paraformaldehído 4% y luego almacenado en un refrigerador a 4 °C. La evaluación de cada endpoint metodológico se realizó con conocimiento previo de todos los tratamientos.

4.4 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE EMBRIONES

4.4.1 Preparación de las muestras

4.4.1.1 Protocolos de parafinización

En el procesamiento de los embriones tratados con 2000 µg/L, se probaron dos protocolos (largo y corto) adaptados de De Andrade (2019). Debido al tamaño de los embriones, se establecieron ajustes específicos en cuanto a los tiempos de exposición a los reactivos de deshidratación e inclusión, con el fin de garantizar una adecuada penetración de los solventes y preservar la integridad del tejido hepático. Además, se evaluaron dos

fijadores diferentes procurando la mejor preservación del tejido. Las formulaciones y tiempos finales del protocolo original y sus adaptaciones se encuentran descritos en la Tabla 2. La comparación de los protocolos tuvo carácter metodológico y no interfirió en el análisis de los efectos de la atrazina.

De cada una de las cinco repeticiones a 2000 µg/L de atrazina, se seleccionó un embrión tratado y un embrión control para los cortes histológicos. Cada embrión se procesó de forma individual, así, se retiraron del tubo Falcon. La cabeza y extremidades fueron seccionadas, mientras que el torso se lavó en PBS 1× (tres lavados de 10 min). Luego, el proceso de deshidratación y diafanización se efectuó a temperatura ambiente, no obstante, la impregnación e inclusión en parafina se hicieron a 65 °C.

En las repeticiones 1, 3 y 5 se evaluó el protocolo largo, mientras que en las repeticiones 2, 4 y 5 se evaluó el protocolo corto (Tabla 2). Los embriones de las repeticiones 1-4 fueron fijados en solución Carnoy, en cuanto los embriones de la repetición 5 fueron fijados con PFA 4%, ambos fijadores se utilizaron durante 7 días a temperatura de 4 °C. Así, se obtuvo un total de 12 bloques de parafina con material histológico (siendo 6 de los embriones tratados y 6 control), cada uno pegado a un cassette histológico diferente (Figura 9). El uso de ambos fijadores fue empleado para comparar la preservación tisular y la calidad de las tinciones realizadas.

Tabla 2 - Comparación de los tiempos de exposición a reactivos de cada protocolo

Reactivos	Tiempos por protocolo	
	Protocolo largo (repeticiones 1,3 e 5)	Protocolo corto (repeticiones 2, 4 e 5)
Fijador	Carnoy (repeticiones 1 y 3) o Paraformaldehído 4% (repetición 5)	Carnoy (repeticiones 2 y 4) o Paraformaldehído 4% (repetición 5)
Deshidratación - Temperatura ambiente		
alcohol 70%	1 hora	30 minutos
alcohol 80%	1 hora	30 minutos

Tiempos por protocolo		
Reactivos	Protocolo largo (repeticiones 1,3 e 5)	Protocolo corto (repeticiones 2, 4 e 5)
alcohol 85%	1 hora	30 minutos
alcohol 90%	1 hora	30 minutos
alcohol 95%	1 hora	30 minutos
alcohol puro (I) (CAS 64-17-5)	overnight	30 minutos
alcohol puro (II) (CAS 64-17-5)	1 hora	30 minutos
alcohol 100% (III) (CAS 64-17-5)	1 hora	overnight
Diafanización - temperatura ambiente		
alcohol -xilol (1:1)	1 hora	30 minutos
xilol I (CAS 1330-20-7)	1 hora	15 minutos
xilol II (CAS 1330-20-7)	-	15 minutos
xilol III (CAS 1330-20-7)	-	-
Impregnación y parafinización (65 °C)		
Xilol-parafina (1:1) (I)	3 horas	15 minutos
Xilol-parafina (1:1) (II)	-	15 minutos

Tiempos por protocolo		
Reactivos	Protocolo largo (repeticiones 1,3 e 5)	Protocolo corto (repeticiones 2, 4 e 5)
Parafina I y II	overnight	2 horas
Parafina III	emblocamiento	emblocamiento

Fuente: Autoría propia.



Figura 9. Material histológico en bloques de parafina posterior a un proceso de deshidratación.
(Fuente: autoría propia)

4.4.1.2 Cortes histológicos, desparafinización, coloración hematoxilina-eosina y observación de láminas

Cada bloque obtenido fue cortado transversalmente y de forma independiente en un microtomo (Leica-Histocore BIOCUT). Para garantizar la estandarización y uniformidad, fue efectuado corte de desbaste (trim) de 0,8 μm de espesura, ya el corte de sección (sec) se efectuó entre 0,5 y 0,6 μm de espesura. Dichos cortes de sección se colocaron en un baño de flotación (Lupetec) a 45 °C hasta su total expansión. Posteriormente, un aproximado de 5-10 cortes histológicos por embrión procesado se incluyeron en cada lámina histológica, las cuales se dejaron secar durante 24 horas.

Ulteriormente, las láminas pasaron por un protocolo de desparafinización y rehidratación adaptado de Maestro & Kalisz, 2015. Aquí, todas las láminas al comienzo se sumergieron en xileno (CAS 1330-20-7) por 10 minutos, en dos baños consecutivos. Luego, se realizaron dos inmersiones en alcohol absoluto (CAS 64-17-5), seguidas de

baños en etanol al 95%, 70% y 50% cada uno durante 5 minutos. Finalmente, las láminas se sumergieron en agua desionizada por 5 minutos y se re hidrataron en PBS 1X por 10 minutos para seguidamente dejarlas secar.

Tras el secado de las láminas, se realizó la tinción histológica por el método de hematoxilina-eosina (HE). Las láminas se sumergieron en un baño de hematoxilina filtrada al 3% de la marca Alphatec (lote: 32925) durante 10 minutos, luego las láminas se llevaron a un lavado en agua corriente hasta la eliminación del exceso de colorante, aproximadamente por 5 minutos. Posteriormente, el material se llevó a un baño de eosina filtrada al 3% de la marca Alphatec durante 5 minutos, repitiéndose el enjuague de agua corriente. Luego, las láminas se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas.

Tras 24 horas, al material histológico procesado se le añadió bálsamo de Canadá sintético (Synth) como medio de montaje y se colocaron las lamínulas. Las láminas totalmente montadas se llevaron a la estufa de secado a 40 °C por 24 horas. Transcurrido dicho periodo, cada lámina se llevó a observación mediante microscopio óptico (Zeiss Primotech) directamente conectado a un computador con el software Zeiss Labscope.

4.5. ANÁLISIS DE DATOS

4.5.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO EMBRIONARIO

Para las variables mortalidad, malformación y presencia de hemorragia, los datos obtenidos fueron transformados en porcentaje y analizados por medio del test de Fisher exacto bilateral y se dividieron en 2 resultados por cada parámetro: un análisis estadístico entre control y concentración de 2000 µg/L, análisis entre control y concentración de 200 µg/L; la magnitud de los resultados se expresó con Odds ratio con IC 95% de Baptista Pike. Cabe destacar que se consideraron únicamente los huevos con embriones vivos o muertos. Los huevos considerados indefinidos fueron descartados.

Para verificar la variable continua, es decir, las medias del peso (gramos) de los embriones dentro de cada dosis, se aplicó t de Student después de la verificación de normalidad por Shapiro-Wilk y de homogeneidad de varianzas por medio del test de Levene. Finalmente, para el análisis de datos de las fases HH dentro de cada dosis, se realizó el test de Wilcoxon para pruebas independientes, con el fin de mantener el carácter ordinal de los elementos. Los estudios estadísticos fueron ejecutados utilizando el software

GraphPad Prism, versión 8.0. En todos los análisis estadísticos se tomó como significancia estadística $p < 0,05$.

4.5.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MUESTRAS HISTOLÓGICAS Y COMPARACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS PROTOCOLOS

Se compararon los protocolos de procesamiento histológico largo y corto, así como el desempeño de los fijadores (Carnoy y PFA 4%), con el fin de buscar diferencias en la preservación del tejido. La evaluación se realizó por medio de un análisis comparativo de microfotografías, abarcando criterios como: i) presencia o ausencia de desprendimiento de porciones del tejido hepático, ii) conservación o pérdida de detalles celulares y iii) una tinción de HE equilibrada. Lo expuesto se ejecutó conforme los datos e informaciones metodológicas descritos por Ellis & Yin (2017). La comparación de protocolos histológicos fue realizada con las láminas control, a excepción de las características de tinción de las células sanguíneas que se realizaron con láminas de embriones tratados debido a que se observó una mayor presencia de dichas células en el espacio sinusoidal de este grupo.

Para las láminas de tejido hepático correspondientes a los embriones tratados con atrazina de 2000 $\mu\text{g/L}$ se realizó una evaluación descriptiva comparativa entre los grupos control y tratado, a través de la adaptación descripciones histológicas previas como la realizada por Quero et al. (2024). El análisis de microfotografías tuvo como finalidad identificar la presencia o ausencia de aparentes alteraciones morfológicas. Para el hígado los parámetros determinados fueron: estructura y disposición de los hepatocitos, presencia o ausencia de necrosis, presencia o ausencia de hepatocitos hipertrofiados, congestión sinusoidal y presencia o ausencia de hepatocitos picnóticos.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISIS MORFOLÓGICO EMBRIONARIO

Al comparar los huevos tratados con ATZ 2000 $\mu\text{g/L}$ y el control, la tasa de mortalidad de los embriones fue de 4,55% y 7,41% respectivamente (Figura 10) (Tabla 1 de los Anexos). Sin embargo, el test de Fisher indicó que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($P > 0,999$). Invariablemente, al comparar

la probabilidad de mortalidad entre ambos grupos (control - tratado), el valor de Odds ratio (OR) fue de 1,68 veces, indicando que los embriones control tuvieron una probabilidad de mortalidad 1,68 veces mayor que la de los tratados con 2000 $\mu\text{g/L}$. El intervalo de confianza Baptista - pike (IC 95%), que indica el rango donde podría encontrarse el OR real fue de 0,1835 - 25,37, evidenciando que los eventos de mortalidad fueron muy pocos en las muestras observadas.

Al comparar la mortalidad en el grupo de huevos tratados con ATZ 200 $\mu\text{g/L}$ junto al control (Figura 10), se observó una mayor tendencia en la mortalidad en el grupo control con 20,0% contra un 11,11% en el tratamiento (Tabla 1 del Anexos). Sin embargo, el test de Fisher evidenció un valor de P no significativo ($P > 0,999$). En concordancia, el OR fue de 2,00; con IC 95% de Baptista-Pike de 0,19 - 32,16, mostrando nuevamente una imprecisión sobre la estimación e impidiendo observar estadísticamente los efectos de la ATZ 200 $\mu\text{g/L}$ sobre la mortalidad

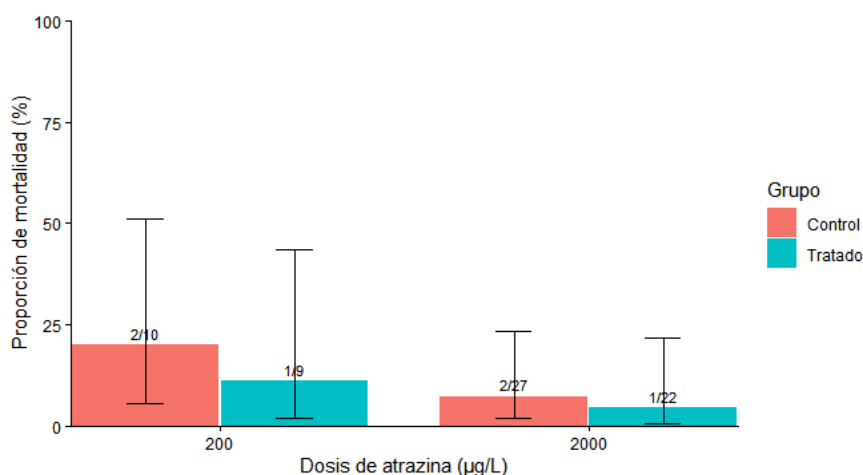


Figura 10 - Mortalidad embrionaria por grupo y dosis estudiada. Las barras representan la proporción de embriones muertos y las líneas verticales simbolizan los intervalos de confianza del 95% por método de Wilson - Brown. La etiqueta en la parte superior de las barras indican la cantidad de embriones muertos en relación al total evaluado. No hubo diferencia significativa entre los grupos analizados (test exacto de Fisher). (Fuente: autoría propia).

En relación a la tasa de hemorragia observada en los embriones, con la concentración de 2000 $\mu\text{g/L}$ de ATZ se observó una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de aparición de hemorragia entre el grupo control y tratado, siendo que en el grupo control hubo una proporción de 18,52% de hemorragias y en el grupo tratado el porcentaje fue del 50% (Figura 11) (Tabla 2 del Anexos). En consonancia, la prueba exacta de Fisher indicó una diferencia estadística significativa ($P = 0,0316$). El OR fue de 0,23 con un intervalo de confianza del 95% por el método Baptista - pike de 0,07 - 0,89.

Cuando analizada la concentración de 200 $\mu\text{g/L}$ de ATZ (Figura 11) (Tabla 2 del Anexos), no hubo significancia estadística con el test exacto de Fisher ($P = 0,1698$), probablemente por el bajo número de n utilizado para dicha concentración. El OR fue de 0,2 con un intervalo de confianza del 95% (Baptista - pike) de 0,032 - 1,32.

Siendo que la hemorragia fue el único endpoint con significancia estadística en la concentración de 2000 $\mu\text{g/L}$ de atrazina, es considerado un efecto subletal macroscópico durante el desarrollo embrionario. En este estudio la hemorragia se registró de forma categórica (presencia/ausencia), aunque no se realizó un recuento de localización anatómica, más bien la hemorragia se observó de manera difusa.

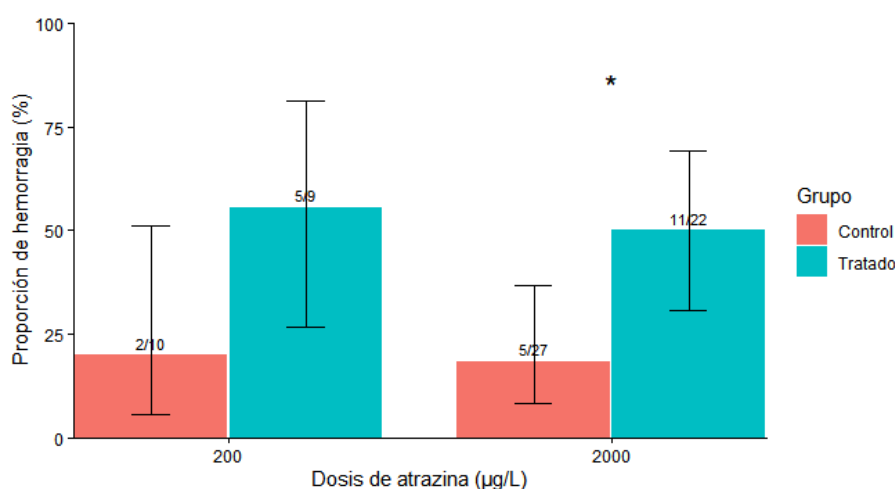


Figura 11 - Hemorragia observada en embriones por grupo y dosis estudiada. Barras representan la proporción de embriones con hemorragia y las líneas verticales simbolizan los intervalos de confianza del 95% por método de Wilson - Brown. La etiqueta en la parte superior de las barras indican la cantidad de hemorragias por embrión en relación al total evaluado. * Indica diferencia significativa entre grupos control y tratado con 2000 $\mu\text{g/L}$ (test exacto de Fisher, $p = 0,0316$). (Fuente: autoría propia).

Al analizar la presencia de malformaciones en la concentración de 2000 $\mu\text{g/L}$ de ATZ, la prueba de Fisher indicó insignificancia estadística de esta característica cuando se comparó el tratamiento y el control ($P > 0,999$); los porcentajes de malformación en el grupo control fue de 14,8% y en el tratamiento fue de 18,18% (Figura 12) (Tabla 2 del Anexos). En ese sentido, el OR fue de 0,783 y el intervalo de confianza del 95% (método Baptista pike) fue 0,206 - 3,004, reflejando así una estimación poco clara de los efectos de la atrazina sobre la malformación de los embriones.

Ya en la concentración de 200 $\mu\text{g/L}$ de ATZ, la prueba de Fisher indicó que no hay significancia estadística ($P = 0,5820$), los porcentajes de malformación en el grupo control y tratamiento fueron de 10,00% y 22,22%, respectivamente (Figura 12) (Tabla 3 del Anexos). El OR fue de 0,3389 con un intervalo de confianza del 95% (Baptista - pike) de

0,024 - 4,067, lo que refleja una estimación imprecisa para poder evaluar el efecto de la ATZ sobre la malformación.

Así, no fueron observadas malformaciones externas evidentes, con alteraciones en el eje corporal, cierre neural o desarrollo de miembros, en ninguno de los grupos evaluados.

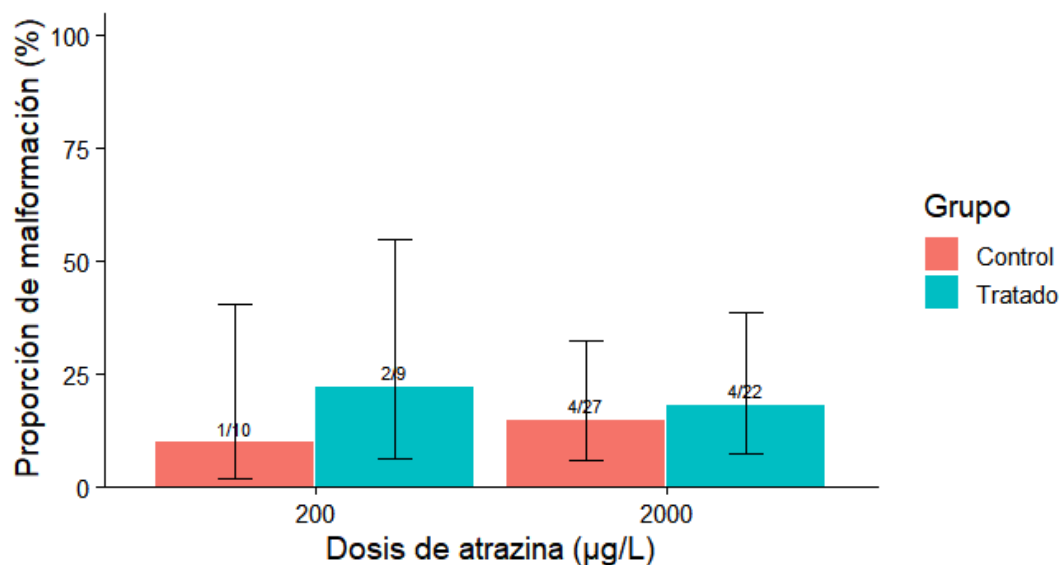


Figura 12 - Malformación embrionaria por grupo y dosis estudiada. Barras representan la proporción de embriones con malformación y las líneas verticales simbolizan los intervalos de confianza del 95% por método de Wilson - Brown. La etiqueta en la parte superior de las barras indican la cantidad de malformaciones en relación al total evaluado. No hubo diferencia significativa entre los grupos analizados. $P=0,5820$ en la concentración de 200 µg/L y $P>0,999$ en la concentración 2000 µg/L. (Fuente: autoría propia).

La variable del peso (g) en la dosis de 2000 µg/L de atrazina en media fue bastante cercana entre grupos control y tratado, los pesos medios fueron de 0,7996 g y 0,8273 g respectivamente. Por tanto, hubo una diferencia entre medias de 0.0277 ± 0.0539 g (Figura 13). La prueba estadística de Shapiro-Wilk arrojó un resultado de compatibilidad en la normalidad del grupo tratado pero no en los controles, como se puede observar en el gráfico de probabilidad normal (Figura 14A). Ya la comparación de varianzas dictaminada por el test de Levene indicó que no hubo diferencias significativas en la comparación de grupos ($P=0,7456$). Lo anterior, es evidenciado en el gráfico de homocedasticidad donde no hay una dispersión marcada (Figura 14B). En conformidad con lo expuesto, la prueba *t* de student no mostró diferencias significativas entre el peso embrionario de los grupos ($P=0,6092$).

Las medias del peso en la dosis de 200 µg/L fueron de 0,7449 g en el control y 0,9255 g en el grupo tratado, obteniendo una diferencia de medias de 0.1807 ± 0.1619 g (Figura

13). Asimismo, la prueba estadística de Shapiro-Wilk indicó normalidad en el grupo control, pero no en los tratamientos. Sin embargo, el gráfico de probabilidad normal refleja la aproximación de los pesos obtenidos a la línea referencial (Figura 15A). Por otro lado, en la prueba de Levene al estudiar la homocedasticidad en los grupos se observó que no existen diferencias significativas ($P= 0,2317$). La Figura 15B que representa el gráfico de homocedasticidad, respalda gráficamente los resultados de la prueba de Levene. Dado que las varianzas resultaron homogéneas, se realizó una prueba t de student que no evidenció diferencias significativas entre el peso de los embriones de los grupos evaluados ($P=0,2800$). A pesar de la variación individual observada, el tratamiento con atrazina no promovió alteraciones significativas en el peso embrionario después de 7 días de incubación.

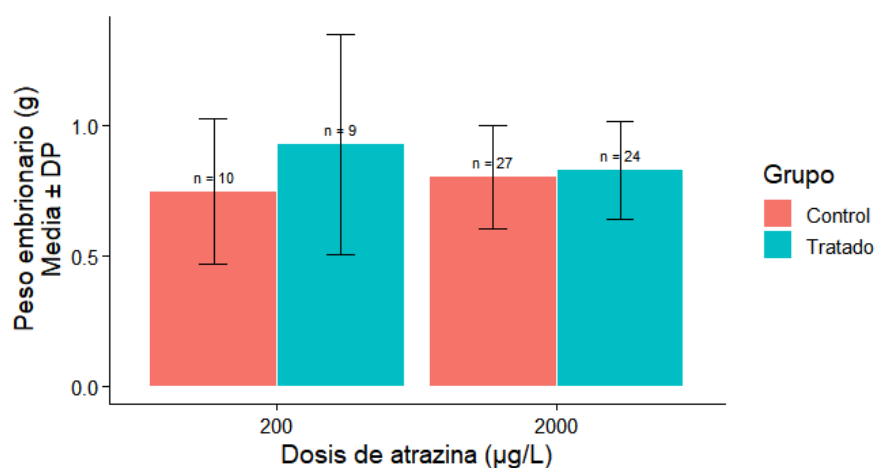


Figura 13. Media y desviación estándar de los pesos de los embriones encontrados vivos en las concentraciones de 200 µg/L ($P= 0,2317$) y 2000 µg/L ($P= 0,6092$) de tratamiento con atrazina y los controles respectivos. No hubo diferencia significativa entre los grupos analizados. (Fuente: autoría propia).

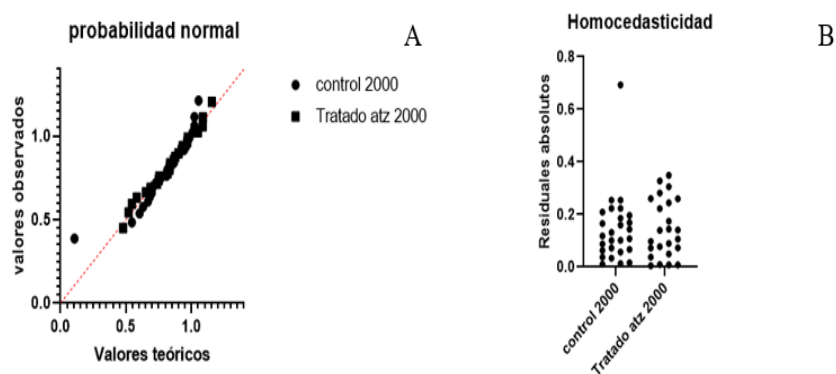


Figura 14. Gráfico de probabilidad normal (14A) y homocedasticidad para la dosis de 2000 µg/L (14B). En 14A los puntos se observan cercanos a la línea roja que representa los valores teóricos, a excepción de un outlier correspondiente al grupo control. En 14B el residual absoluto representado por puntos en ambos grupos se distribuyen de forma semejante, indicando homogeneidad de las varianzas. (Fuente: autoría propia).

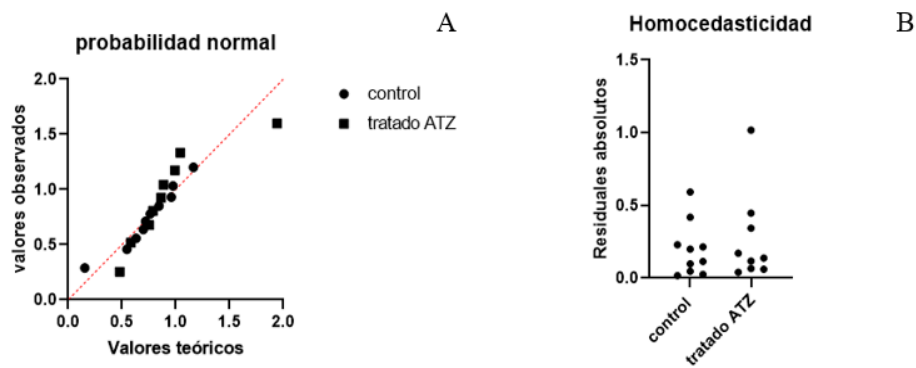


Figura 15. Gráfico de probabilidad normal (15A) y homocedasticidad para la dosis de 200 µg/L (15B). En 15A los puntos se observan cercanos a la línea roja que representa los valores teóricos, a excepción de outliers correspondientes al grupo tratado. En 15B los residuales absolutos están distribuidos de forma semejante haciendo alusión a la homogeneidad de varianzas (Fuente: autoría propia).

Finalmente, en la evaluación estadística de las etapas de desarrollo embrionario (HH) por medio de la prueba de Wilcoxon, se observó que en la concentración de 2000 µg/L de atrazina las medianas de la fase HH entre grupo control y tratado fueron equivalentes en ambos casos (mediana= HH 31). Además, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P= 0,2144$) (Figura 16) en relación a la embriogénesis siguiendo la clasificación de Hamilton & Hamburger (1992). En la concentración de 200 µg/L de atrazina se evidenció una mediana de HH 30,5 en el control y HH 31,0 en los tratados. Mediante la prueba estadística de Wilcoxon también fue determinado que no hubo diferencias significativas en el desarrollo embrionario al comparar los grupos ($P= 0,2984$) (Figura 16).

Los datos indican que el tratamiento con atrazina no interfirió en el avance del desarrollo embrionario hasta la etapa HH esperada para el séptimo día de incubación.

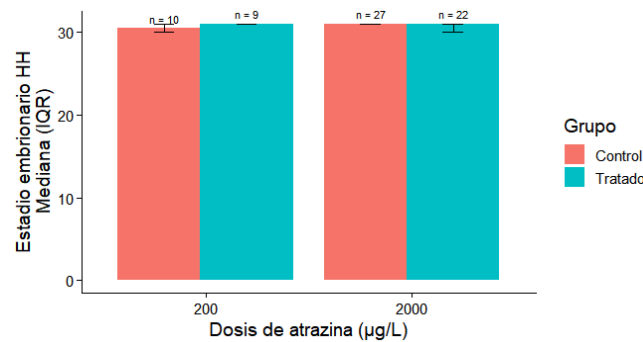


Figura 16. Mediana y rangos intercuartílicos de las fases embrionarias (HH) en las concentraciones de 200 µg/L y 2000 µg/L de tratamiento con atrazina y los controles respectivos. sin diferencia significativa entre los grupos analizados. (Fuente: autoría propia)

La Tabla 3 muestra de forma comparativa los resultados del análisis morfológico embrionario entre los grupos control y tratamiento de atrazina (200 y 2000 µg/L), junto con las pruebas estadísticas, el valor de p y la significancia estadística.

Tabla 3 - resultados estadísticos de endpoints morfológicos embrionarios

Variable / prueba	valor de p	Significancia estadística
Mortalidad (%) (Fisher)	>0,999	No
Hemorragia (%) (Fisher)	0,0316	Sí
Malformación (%) (Fisher)	>0,999	No
Peso (g) (t de Student)	0,6092	No
Etapa HH (mediana) (Wilcoxon)	0,2144	No

Fuente: Autoría propia.

5.2. COMPARACIÓN HISTOLÓGICA DE PROTOCOLOS

Los resultados a seguir se refieren exclusivamente a la comparación entre protocolos, independientemente del tratamiento con atrazina. Se observó con ambos protocolos, una conservación parcial de la estructura del tejido hepático, pudiendo identificarse los siguientes criterios: preservación de arquitectura hepática, definición nuclear, intensidad de tinción, integridad de los sinusoides

5.2.1 PRESERVACIÓN DE ARQUITECTURA HEPÁTICA E INTEGRACIÓN DE LOS SINUSOIDES

Al realizar comparaciones entre las microfotografías de láminas control pertenecientes a los protocolos largo y corto, donde se utilizó la solución Carnoy como fijador, se evidenciaron cortes histológicos parcialmente aptos para realizar una evaluación comparativa de los protocolos usados para el procesamiento del tejido hepático de los embriones de ave. No hubo diferencias perceptibles entre ambos protocolos (Figura 17).

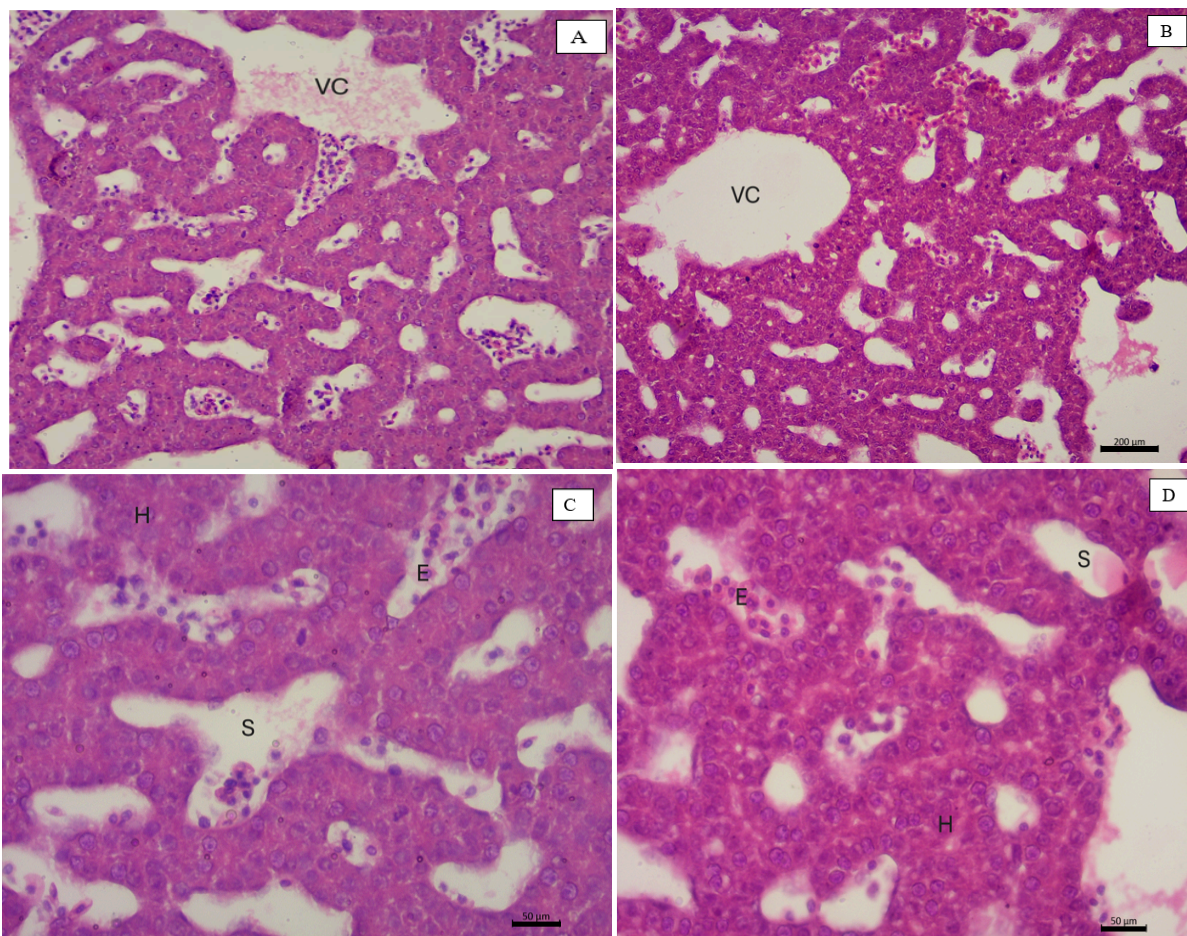


Figura 17. Láminas histológicas de hígado de embrión de gallina (E7) realizadas con dos protocolos diferentes (largo y corto). Las microfotografías A y C corresponden al protocolo corto (láminas control), mientras que B y D pertenecen al protocolo largo (láminas control). Con ambos protocolos se conserva parcialmente la arquitectura hepática, observándose así la vena central (VC) en A y B; los espacios sinusoidales (S), eritrocitos (E) y hepatocitos (H) en las imágenes c) y d). Tinción de hematoxilina-eosina (HE). Las Barras indican 200 μm para A y B; 50 μm para C y D. (Fuente: autoría propia).

La preservación del tejido hepático fue parcial en ambos protocolos dado que en la evaluación histológica se observaron alteraciones que podrían comprometer la totalidad del tejido. Por ejemplo, se identificaron diversas pérdidas de porciones teciduales, además de un

visible encogimiento del hígado y los tejidos circundantes, tal como se representa en la Figura 18.

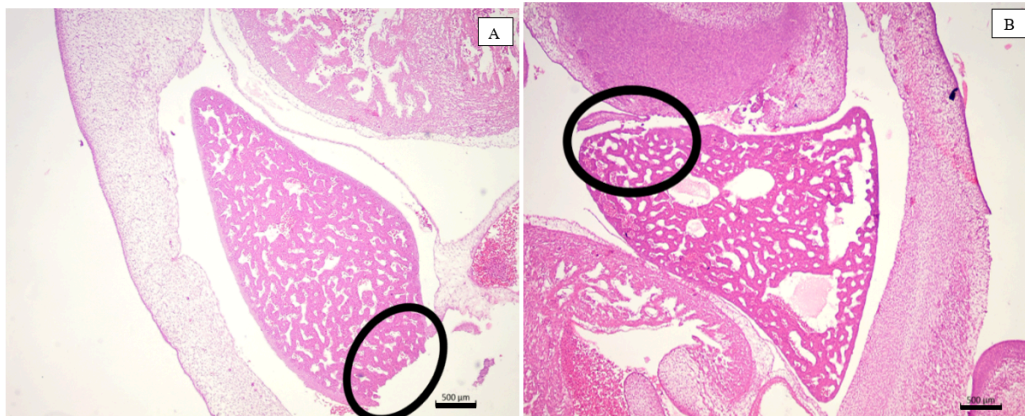


Figura 18. Disrupciones histológicas en láminas de hígado de embrión de gallina (controles). En A se observa una lámina del protocolo corto con una pérdida del tejido hepático en la parte inferior del lóbulo derecho (delimitado por un óvalo). En B es observada una lámina del protocolo largo con pérdida del tejido hepático en la parte superior del lóbulo (delimitado por un óvalo). En ambas microfotografías es posible evidenciar encogimiento del tejido. Tinción hematoxilina-eosina (HE). Barras indican 500 µm. (Fuente: autoría propia).

5.2.2 INTENSIDAD DEL COLOR Y DEFINICIÓN NUCLEAR

En cuanto a la tinción en estos protocolos (láminas tratamiento), los hepatocitos se tiñen intensamente con eosina. La hematoxilina aunque se tiñó de forma menos intensa, fue posible observar los núcleos y nucleolos. Sin embargo, se identificó una coloración intensa tanto de hematoxilina como de eosina en los eritrocitos de los espacios sinusoidales (Figura 19).

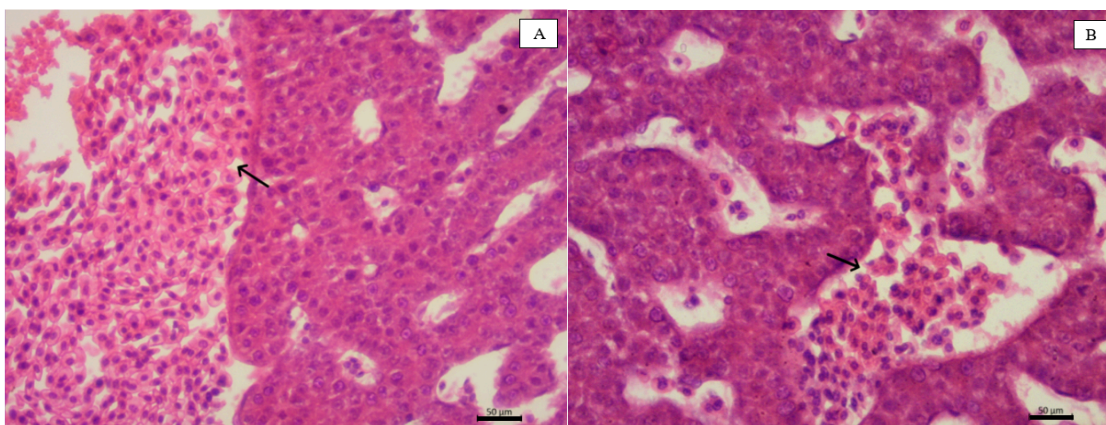


Figura 19. Tinción histológica de hematoxilina-eosina. En A y B se muestran microfotografías del protocolo largo y corto respectivamente (embriones tratados con ATZ 2000 µg/L). En el parénquima la tinción con eosina es visiblemente fuerte, los núcleos se observan bien delimitados, aunque con menor intensidad de la tinción hematoxilina. Los eritrocitos (flechas) localizados en los espacios sinusoidales poseen una tinción HE uniforme y con estructuras bien delimitadas. Hepatocitos (H), eritrocitos (E). Las Barras indican 50 µm. (Fuente: autoría propia).

5.3. SOLUCIONES FIJADORAS: CARNOY X PARAFORMALDEHÍDO 4%

Al comparar los efectos de las dos soluciones fijadoras utilizadas tanto en el protocolo largo como en el corto (láminas de embriones control), a través de las microfotografías histológicas, fue posible visualizar que hubo una leve mejoría en la retracción de las láminas correspondientes a los embriones fijados con paraformaldehído 4%, debido a que el encogimiento del hígado y de los tejidos circundantes fue menor. Sin embargo, se observaron pérdidas de porciones teciduales, semejantes a los observados en las microfotografías pertenecientes a las láminas histológicas de embriones fijados con Carnoy (Figura 20).

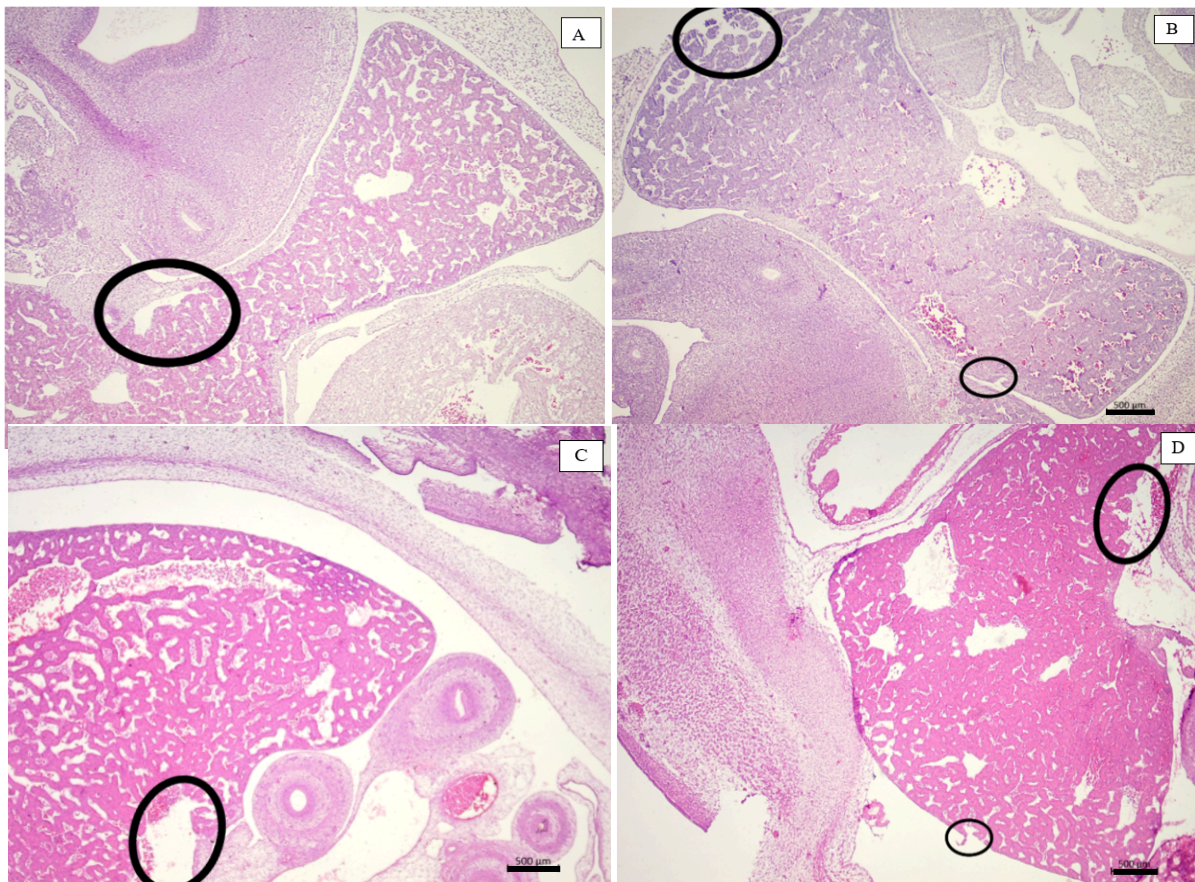


Figura 20. Comparación de los fijadores utilizados en láminas control. En A y B se observan cortes histológicos de la repetición 5 relativos a los embriones controles fijados con paraformaldehído 4%, protocolo corto y largo correspondientemente. Las microfotografías C y D pertenecen a embriones fijados con solución carnoy, protocolo corto y largo correspondientemente. Tanto en las láminas fijadas con paraformaldehído como las fijadas con solución Carnoy se pueden visualizar porciones desprendidas del tejido hepático (delimitado por óvalos). En A y B se percibe una menor retracción del tejido hepático y circundante al compararse con C y D, donde los espacios entre el hígado y los otros tejidos son mayores. Tinción hematoxilina-eosina (H & E). Barras indican 500 µm. (Fuente: autoría propia).

La tinción con hematoxilina-eosina de las láminas de los embriones fijados con paraformaldehído 4% de ambos protocolos tuvo un efecto inverso a las láminas de ambos protocolos que fueron fijadas en solución Carnoy. Las láminas correspondientes a la fijación

con paraformaldehído mostraron una tinción más visible de la hematoxilina que de eosina en los hepatocitos. Aunque las células hepáticas se percibieron mejor en estas láminas, la visualización del núcleo fue difícil. En los espacios sinusoidales la tinción de los eritrocitos se reveló de forma más uniforme, pudiéndose distinguir el núcleo de dichas células, tal como se muestra en la Figura 21.

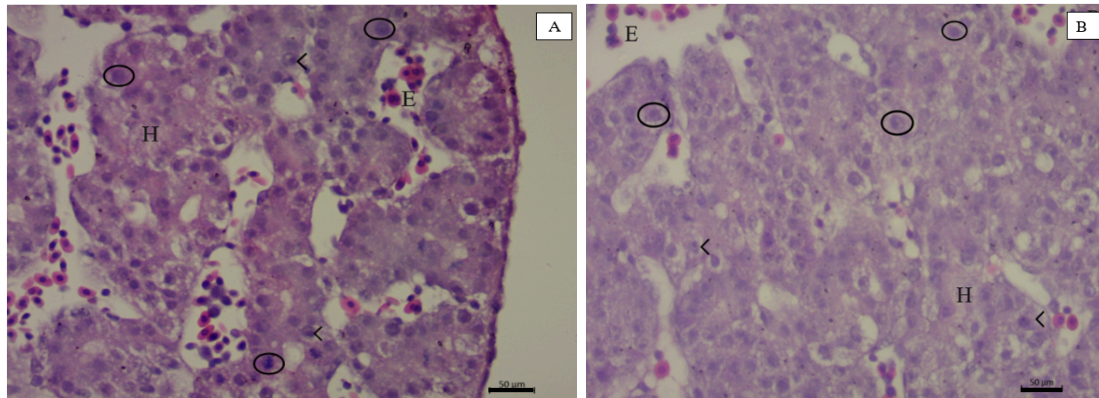


Figura 21. Tinción histológica hematoxilina-eosina en láminas correspondientes a embriones control fijados con paraformaldehído (4%). A y B pertenecen a los protocolos largo y corto, en el orden mencionado. En ambas microfotografías se observa poca intensidad en la tinción de eosina en el parénquima hepático, se perciben núcleos tenuemente delimitados colorados por hematoxilina. Hepatocitos (H), eritrocitos (E), células hepáticas delimitadas por óvalos, núcleos celulares señalados por puntas de flecha. Las Barras indican 50 µm. (Fuente: autoría propia).

5.4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MUESTRAS TRATADAS x CONTROL

Al realizar la examinación histológica descriptiva de las láminas más conservadas, se observó que la histoarquitectura hepática fue similar en las muestras correspondientes a los embriones control y tratados con atrazina 2000 µg/L. Dichos hallazgos no fueron cuantificados ni sometidos a análisis estadístico, debiendo ser interpretado como observaciones cualitativas. En ambos grupos los hepatocitos se encuentran en una disposición cilíndrica alrededor de un lumen conspicuo formados dentro de los cilindros, además de amplios espacios vasculares (sinusoides hepáticos) que separan los cilindros hepáticos y sin hipertrofia alguna (Figura 22).

La principal diferencia encontrada entre el hígado de los animales control y los expuestos a atrazina 2000 µg/L fue una aparente elevación de células eritrocíticas inmaduras en los espacios sinusoidales de los embriones tratados con el herbicida, indicando un posible congestionamiento hepático, como es observado en la Figura 23. En ninguno de los grupos analizados se encontraron indicios de necrosis ni de vacuolización.

En láminas pertenecientes al tratamiento fue percibida la aparición de células con núcleos condensados y reducidos, semejantes a células picnóticas (Figura 24). A pesar de este último hallazgo en el tratamiento y de la presencia de una cantidad aparentemente mayor de eritrocitos en el espacio sinusoidal, no es posible asegurar que hubo cambios en el tejido hepático, dado que la histoarquitectura del parénquima y de hepatocitos fueron similares entre grupo control y tratamiento.

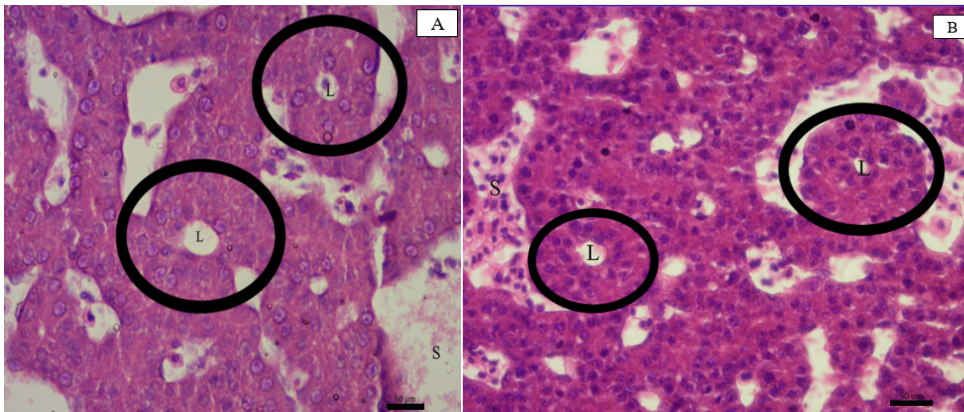


Figura 22. Comparación de la histoarquitectura hepática en embriones de 7 días. La microfotografía A es la representación histológica del grupo control y B corresponde al grupo tratado con atrazina (2000 µg/L). En ambas láminas se evidencia una disposición similar de los hepatocitos en forma de cilindro (óvalos) y el lumen conspicuo dentro de la conformación cilíndrica (L); los cilindros hepáticos se separan entre sí por la existencia de espacios sinusoidales (S). Tinción hematoxilina-eosina (HE). Barras indican 50 µm. (Fuente: autoría propia).

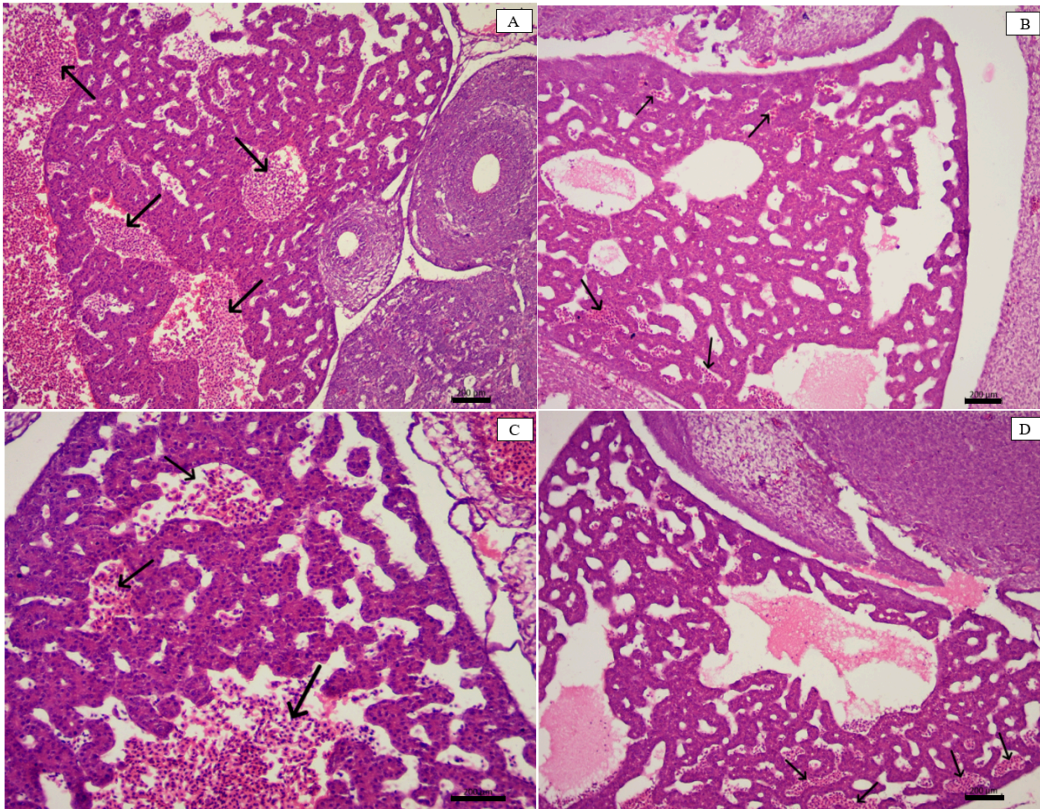


Figura 23. Comparación de la presencia de eritrocitos inmaduros en los sinusoides del hígado embrionario de los grupos control B, D y tratado con atrazina 2000 µg/L, microfotografías A, C. Tanto en el grupo control cuanto en el tratamiento se observó presencia de eritrocitos en los espacios sinusoidales (indicado por flechas), sin embargo, la cantidad de eritrocitos visualizada fue aparentemente mayor en las láminas del tratamiento con atrazina. Tinción hematoxilina-eosina (H & E). Barras indican 50 µm. (Fuente: autoría propia).

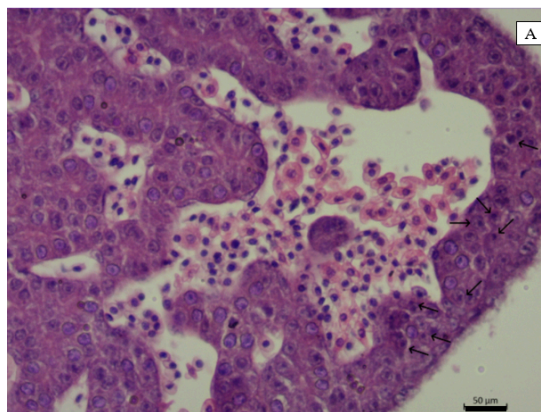


Figura 24. Células de núcleo reducido s en tratamiento de 2000 µg/L. Células de núcleo reducido y condensado en a) (flechas) Tinción hematoxilina-eosina (HE). Barras indican 50 µm. (Fuente: autoría propia).

6. DISCUSIÓN

Los estudios de embriotoxicidad y toxicología del desarrollo a nivel morfológico en modelos animales son importantes para entender el potencial de un agente xenobiótico

para ocasionar malformaciones fetales, tasas de supervivencia, reducción del peso y longitud embrionaria (KHERA et al., 1989). En este contexto, el embrión de gallina figura como un modelo animal para evaluar los efectos de agrotóxicos ampliamente esparcidos en el medio ambiente debido a las ventajas que posee por su accesibilidad a los compartimentos de interés (WACHHOLZ et al., 2021). Ante dicha aseveración, estudios realizados con atrazina, señalan efectos negativos en los procesos del desarrollo embrionario de múltiples especies. La atrazina siendo un agente de uso extensivo, es ambientalmente regulado en distintos países. En Brasil, el valor máximo permitido (VMP) del herbicida en agua usada para consumo humano es de 2 $\mu\text{g/L}$ (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2007). No obstante, Moreira et al. (2012) reportaron concentraciones de atrazina en agua que ultrapasan el VMP en cuerpos superficiales dentro del territorio brasileño. Así, el presente trabajo, se realizó con concentraciones 100 y 1000 veces más elevadas que el VMP, con el fin de estudiar los efectos morfológicos externos y hepáticos en embriones de gallina de 7 días. Esos valores fueron seleccionados puesto que los trabajos previos de nuestro grupo de investigación indicaron que concentraciones de 20 a 200 $\mu\text{g/L}$ resultaron en ninguna diferencia significativa en relación a los valores de mortalidad y malformación (datos no mostrados).

6.1. DISCUSIÓN SOBRE LA MORFOLOGÍA EMBRIONARIA

Durante el experimento, fue constatado que la exposición a atrazina en concentraciones de 200 y 2000 $\mu\text{g/L}$ en embriones de ave no produjo una diferencia estadísticamente significativa de la mortalidad cuando comparado con los grupos de control respectivos. Considerando los datos anteriores, los resultados sugieren que con las configuraciones experimentales aplicadas, no fue posible revelar que la atrazina tuviese un efecto claro sobre la mortalidad o supervivencia de los embriones hacia el séptimo día de desarrollo. Además, la mortalidad embrionaria, aunque ampliamente utilizada en estudios embrio toxicológicos, es considerada una prueba de baja sensibilidad para la detección de efectos subletales, puesto que tiende a reflejar apenas exposiciones severas de altas dosis e incompatibles con la vida. Por lo tanto en este estudio, la ausencia de mortalidad como parámetro estadístico no se interpreta como ausencia de efecto biológico. Entretanto es importante resaltar que la metodología empleada analizó los efectos agudos de la inyección única de solución, y el contacto crónico con sustancias nocivas puede representar un mayor riesgo de intoxicación (RALSTON-HOOPER et al., 2009).

Existe evidencia de que la atrazina en exposiciones agudas no demuestra ser tóxica sobre diversos organismos que se encuentran en etapas tempranas del desarrollo, como *Lampsilis siliquoidea*, *Hyalella azteca* o *Diporeia spp.* Aunque sí demuestra efectos tóxicos cuando los mismos organismos, especialmente *Diporeia spp.* y *Lampsilis siliquoidea*, son expuestos de forma crónica (BRINGOLF et al., 2007; RALSTON-HOOPER et al., 2009). Con esto, también es evidenciado que los signos de intoxicación en escenarios de exposición aguda y crónica son variables en distintos organismos. Parámetros como el peso embrionario y fase HH son útiles como indicadores generales, sin embargo pueden no reflejar alteraciones celulares y bioquímicas iniciales.

A pesar de la escasez de estudios de los efectos de la atrazina en embriones de ave, estudios comparables utilizando atrazina en diferentes modelos embrionarios muestran una variabilidad de efectos sobre la mortalidad. Por ejemplo, estudios en embriones de pez cebra observaron que no hubo una diferencia estadística en la mortalidad cuando expuestos a un amplio intervalo de concentraciones de atrazina desde 0,3 a 30 ppb (WIRBISKY et al., 2016), 0,3 a 10000 µg/L (BLAHOVA et al., 2020) y 80 mg/L (MAIA et al., 2025). La mayor parte de las dosificaciones utilizadas en los estudios mencionados sobrepasan las usadas en el presente estudio (200 y 2000 µg/L). En contraste, también se han reportado estudios con una disminución considerable en la supervivencia de larvas de la misma especie cuando se emplearon dosis de atrazina que están entre 0,1 y 5,0 mg/L (ZALUSKY et al. 2022).

A pesar de no reportar datos de mortalidad significativos, los estudios citados relatan aún una significancia estadística en la tasa de malformaciones observadas. La ausencia de alteraciones histológicas marcantes puede estar relacionada a la ventana corta de exposición, las concentraciones limitadas y/o la limitación de coloración de hematoxilina-eosina al detectar alteraciones subcelulares

Por su vez, la variable hemorragia en la concentración más alta tuvo una significancia estadística, habiendo más hemorragias en el grupo tratado que en el control. Lo anterior sugiere que la atrazina en una concentración de 2000 µg/L podría estar relacionada a efectos sobre el desarrollo del sistema vascular embrionario, inclusive cuando no hay una significancia estadística de la mortalidad embrionaria. Se resalta que la hemorragia fue analizada a los 7 días de desarrollo, y podría aún ser fatal en etapas más avanzadas, inviabilizando la eclosión del individuo. El hecho de que la hemorragia fue el único

parámetro con diferencia estadística sugiere que alteraciones vasculares podrían ocurrir antes que las alteraciones morfológicas hepáticas detectables por HE

La dosis más baja probada en este estudio no tuvo una relevancia estadística, a pesar de que se observó una mayor cantidad de embriones con hemorragia en el grupo tratado, comparado con el control. La ausencia de significancia estadística en la concentración de 200 µg/L comparada a la de 2000 µg/L podría estar relacionada al reducido tamaño muestral (n) que se analizó. Artículos donde fue evaluada la presencia de focos hemorrágicos en renacuajos tratados con atrazina reportan que hay una significancia estadística sobre la hemorragia focalizada en el tejido visceral como efecto subletal, utilizando concentraciones arriba del VMP (LENKOWSKI et al., 2008). En consonancia, embriones de pez cebra tratados con 10 mg/L de atrazina, luego de 36 horas de exposición tuvieron efectos negativos en el sistema vascular; aunque en este escenario si hubo una correlación entre la mortalidad y los disturbios vasculares (WIEGAND et al., 2001).

La hemorragia ocurre cuando los eritrocitos salen desde los vasos sanguíneos hacia diversos órganos o tejidos de un organismo, esta puede ser causada por diversas razones como enfermedad, o como una respuesta a la toxicidad (BASHER et al., 1983; LENKOWSKI et al., 2008). En este sentido, la hemorragia presente en los embriones tratados con 2000 µg/L de atrazina podría suponer una respuesta a la exposición de tipo subletal, y podría ser una señal de daño vascular presente antes de detectar parámetros de mortalidad.

A pesar de no haber obtenido resultados significativos en cuanto a la presencia de malformaciones, peso embrionario y fases del desarrollo con tratamiento por atrazina, otros estudios han documentado malformaciones relativas a medidas craneales, alteraciones somáticas, diferencias en el peso y crecimiento según concentraciones utilizadas y especies en fase embrionaria evaluadas. Estudios sobre la exposición a atrazina en embriones de peces han reportado deformaciones corporales, edemas y deformación del saco vitelino, cola reducida y ausencia de cabeza en intervalos de concentración desde 0,1 a 5 mg/L (ZALUSKY et al., 2022). Otros estudios resaltan diferencias morfológicas-reproductivas sólo en la adultez de hembras de pez cebra que fueron expuestas a atrazina en concentraciones de 3 y 30 ppb durante el periodo embrionario (WIRBINSKI et al., 2016). Es de resaltar que diferentes metodologías experimentales tuvieron diferentes resultados. Así, son necesarios estudios robustos, con

muestras lo suficientemente grandes y métodos controlados para la correcta verificación de los efectos sobre los embriones.

6.2. DISCUSIÓN SOBRE LOS PROTOCOLOS HISTOLÓGICOS

Al comparar el protocolo largo y corto para preparación de láminas histológicas de hígado, no fueron observadas diferencias aparentes en el tejido. Cuando se realizan los procesos de deshidratación, aclaramiento e impregnación del material en parafina, es preciso considerar el tipo de material, la espesura y las propiedades física e histoquímicas cuando los reactivos usados en el procesamiento interactúan con los tejidos en tiempos específicos (TAQI et al., 2018).

La deshidratación, siendo la primera etapa del procesamiento, busca la eliminación gradativa del agua en el contenido tisular por medio de diferentes reactivos como el etanol, metanol, alcohol isopropílico o acetona (SUVARNA et al., 2012). Tiempos cortos pueden perjudicar la deshidratación, impidiendo la completa eliminación del agua, que a su vez perjudica la infiltración del medio de inclusión y la calidad de los cortes histológicos (TAQI et al., 2018; SUVARNA et al., 2012). Tiempos muy largos en agentes deshidratantes también tienen efectos negativos sobre el tejido, ocasionando retracción tisular (TAQI et al., 2018).

Con el aclaramiento histológico es producida una homogeneidad en el índice de refracción haciendo que los tejidos se vuelvan transparentes, y esta etapa generalmente es realizada usando xilol (HONG et al., 2019). Una extensa exposición al xilol puede causar endurecimiento y cristalización del tejido, favoreciendo el seccionamiento y retracción del corte histológico; por su parte, la omisión de esta etapa afecta la impregnación de la parafina (TAQI et al., 2018). Por fin, la infiltración del tejido es ejecutada a través de materiales con cadenas largas de hidrocarburos, como la parafina (SLAOUI, 2011). La exposición prolongada puede favorecer las grietas en el tejido, mientras que los tiempos cortos pueden perjudicar la completa infiltración de parafina, creando lagunas, rasguños o ruptura del tejido (GOLOGAN et al., 2023)

En este estudio, el reactivo de deshidratación utilizado fue el etanol a diferentes grados. Dentro de los tiempos a los que se sometió el tejido, se resalta que tanto en el protocolo largo como corto fueron empleados tres baños de etanol absoluto, siendo que uno de ellos quedó overnight. La literatura reporta que en las fases gradativas de

deshidratación, cuando esta se realiza en dos días, el material es mantenido en etanol 70% (GITIRANA, 2024). El alcohol absoluto overnight sobre el material histológico probablemente fue perjudicial, ocasionando quiebras y retracción del material. Estudios apuntan que protocolos donde se emplea una deshidratación intensa aunado al uso de xilol, generan mayor retracción tisular (METGUD et al., 2013). Así, es posible dilucidar que es necesario realizar una optimización de los protocolos teniendo en cuenta los procedimientos sin interrupciones, desde la hidratación hasta la formación de bloques con parafina, con el fin de minimizar los efectos adversos en las láminas histológicas. Experimentos futuros serán realizados teniendo en cuenta las variables propuestas.

Un factor adicional a tener en cuenta en la comparación de los resultados largo y corto es el tamaño de los embriones de 7 días de desarrollo. La literatura apunta a que la penetración de los reactivos en el tejido depende en gran medida del tamaño y profundidad que la muestra histológica posea, por lo tanto, entre más grande y profunda sea la muestra, los reactivos demorarán más tiempo en penetrar los tejidos internos (SUVARNA et al., 2012). En este sentido, en embriones completos como los utilizados durante la experimentación, el alcohol podría no remover en su totalidad el agua en el interior del tejido, ocasionando consecuentemente una inacción del agente aclarante (xilol) y una pobre infiltración de la parafina. Lo anterior es explicado debido a que el agua al ser una molécula polar no permite que la parafina (molécula apolar) actúe en el tejido (SUVARNA et al., 2012).

La selección de fijadores óptimos para el tejido de interés es importante, puesto que una fijación inadecuada podría comprometer las etapas posteriores del procesamiento histológico (AJILEYE & ESAN, 2022). En este estudio se demostró que tanto la solución Carnoy como el paraformaldehído 4% permitieron obtener cortes histológicos aptos para una evaluación morfológica parcial. Así, fue preservada la histoarquitectura de estructuras importantes como hepatocitos, vena central, sinusoides y eritrocitos presentes en los mismos sinusoides. Ambos fijadores son utilizados en experimentos con embriones. Se ha observado que, en tejido embrionario de gallina de 7 a 21 días de desarrollo, la solución Carnoy, al ser un fijador efectivo, permitió visualizar estructuras celulares de órganos productores de hormona del crecimiento fuera de la glándula pituitaria (MURPHY et al., 2003). El paraformaldehído 4% ha sido empleado para la preservación de embriones de gallina en fase de desarrollo HH9, donde se evidenció el paraformaldehído como un método de fijación que afecta la morfología nuclear y la apariencia del tejido, aunque

mantiene las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas (ECHEVERRÍA et al., 2024).

La selección del fijador fue impactante en los resultados de las tinciones observadas. La solución Carnoy es un fijador de tipo desnaturalizante que se compone de 3 sustancias: etanol, ácido acético y cloroformo (HOWAT & WILSON, 2014). La interacción entre los compuestos forman uniones de hidrógeno que estabilizan los tejidos (PUCHTLER et al., 1968). Específicamente, el ácido acético dentro del fijador posee la capacidad de coagular la cromatina. Al estudiar la relación entre tinción HE y el fijador Carnoy, tejidos desarrollados provenientes del riñón y bazo revelan delimitada y uniformemente la estructura morfológica del núcleo y nucleolo en las células (GÜRGEN & YILDIRIM, 2020). En el presente estudio, cuando se utilizó la solución Carnoy, se observaron en el espacio sinusoidal células eritrocíticas con núcleo y citoplasma altamente diferenciados y delimitados con HE, lo que indica que el fijador actuó de forma esperada en ese grupo celular. En cuanto a los hepatocitos, se observó el núcleo delimitado teñido de hematoxilina, aunque con una menor intensidad que el parénquima teñido de eosina.

El Paraformaldehído (PFA) es un fijador de reticulación que actúa en los tejidos formando puentes de metileno con las proteínas, inmovilizándolas (IRGEN-GIORO, 2022). Artículos mencionan que el PFA preserva la morfología celular y nuclear de distintos tejidos como el sistema nervioso (SNYDER et al., 2022) o tejido hepático embrionario (ELLIS & YIN, 2017). No obstante se reportan algunas distorsiones tisulares como vacuolización artificial, pérdida de citoplasma y una tinción más tenue de la eosina (SNYDER et al., 2022; ELLIS & YIN, 2017). En el presente estudio, cuando fue usado el paraformaldehído 4% se evidenció una coloración uniforme de las células sanguíneas en los sinusoides, identificando el núcleo y citoplasma de la sangre; en los hepatocitos, el parénquima se mostró con una coloración menos intensa de eosina y hematoxilina en comparación con las visualizaciones realizadas en las láminas de embriones fijados con Carnoy. La baja intensidad de las tinciones es una característica documentada de algunos fijadores reticulantes, por ejemplo, en el tejido nervioso periférico se reportó que el glutaraldehído (fijador reticulante) tuvo un bajo contraste de tinción nuclear y axoplasmal al teñir con hematoxilina eosina, tricrómico de Masson, azul rápido de luxol y azul de anilina (DÖRTBUDAK et al., 2025). Otra investigación que usa formaldehído (10%) para la fijación de tejido renal y esplénico describiendo una tinción pálida de la eosina, especialmente en la células renales (GÜRGEN & YILDIRIM, 2020). Lo descrito en este

estudio en relación a la baja tinción podría deberse a que los puentes de metileno que se forman entre el fijador y las proteínas, posteriormente impiden la unión de las proteínas con los colorantes ácidos como la eosina, un fenómeno conocido como enmascaramiento químico (CARSON & CAPELLANO, 2020). Además, en muestras grandes (como es el caso de los embriones de 7 días), la fijación con el paraformaldehído puede ser heterogénea, debido a que hay una penetración más lenta (en comparación al Carnoy), preservando bien la parte externa aunque de forma insuficiente las partes internas de la pieza (CHESNICK et al., 2010).

6.3. DISCUSIÓN DE LA MORFOLOGÍA HEPÁTICA

Finalmente, la caracterización morfológica del tejido hepático tratado x control indicó una diferencia importante en muestras de embriones tratados con 2000 µg/L de atrazina: la congestión sinusoidal. A pesar de la poca literatura sobre los efectos de la atrazina sobre el tejido hepático embrionario, estudios equiparables con otras especies reportan diferentes afectaciones en el tejido hepático. Alevines de la especie *Piaractus mesopotamicus* tratados con atrazina en la dosis de 3570 µg/L por 30 días tuvieron alteraciones hepáticas severas comprendiendo características como necrosis focal irreversibles, gotículas lipídicas en el parénquima y citoplasma vacuolado (CRUZ, 2015). La observación del incremento aparente de células sanguíneas inmaduras en los espacios sinusoidales en láminas tratadas en comparación con láminas del grupo control también ya fue observada en peces juveniles en desarrollo (*Astyanax altiparanae*) en contacto con diferentes concentraciones de atrazina durante 35 días, habiendo un incremento en la congestión vascular asociado a hiperplasia endotelial (SILVA et al. 2023). Aquí es resaltada la diferencia entre los procedimientos, siendo que en el actual trabajo el tratamiento fue de aplicación única (test agudo), en cuanto que en los trabajos citados previamente los animales quedaron expuestos por días al químico. Aunque no hay reportes del efecto de la atrazina sobre la congestión hepática del hígado aviar en desarrollo, fué observado que en codornices adultas expuestas a 50, 250 y 250 mg/kg de atrazina hubo congestión leve y desorden en el cordón celular hepático (ZHANG et al., 2012). Los estudios indican que la congestión de células sanguíneas en los sinusoides probablemente esté correlacionada a alteraciones vasculares por el uso de xenobióticos. Dado que en este estudio no hubo un análisis cuantitativo de las observaciones histológicas, existen limitaciones en la interpretación definitiva en relación a la congestión hepática. Sin embargo, es importante

enfatar que alteraciones iniciales a nivel celular pueden no ser detectables con HE; alteraciones bioquímicas y moleculares pueden preceder alteraciones morfológicas.

Los núcleos picnóticos en muestras histológicas son estructuralmente informativos dado que su visualización sugiere problemas en el empaquetamiento de la cromatina (BURGOYNE, 1999). En el contexto de tratamientos con atrazina, estudios donde se evalúa el tejido hepático de distintas especies que han sido expuestas a atrazina reportan la presencia de picnosis, cariorrexis acompañado de necrosis; en adición, dichas investigaciones reportan resultados con marcadores oxidativos trabajados por inmunohistoquímica (RAJINI *et al.*, 2015; KADRY *et al.*, 2012). En el presente estudio, el mecanismo del xenobiótico en el tejido hepático embrionario no fue directamente evaluado, pero podría explicar la aparición de los núcleos picnóticos en las láminas pertenecientes a embriones tratados con 2000 µg/L. Así, para obtener resultados concluyentes de los hallazgos se requiere la utilización de marcadores específicos que indiquen alteraciones en apoptosis y en proliferación celular.

Aunque la histoarquitectura del hígado tratado con atrazina 2000 µg/L se preservó, las evidencias de congestión sinusoidal y presencia de células picnóticas indican que en la dosis evaluada, el herbicida atrazina podría inducir cambios sutiles a nivel celular y vascular. Estudios futuros deben realizarse con un mayor número de muestras, análisis cuantitativos e inmunohistoquímicos que ayuden a develar los mecanismos toxicológicos de la atrazina en hígado de aves en fases embrionarias. Los datos encontrados en este estudio sobre congestión sinusoidal y células picnóticas son de carácter descriptivos, por tanto no permiten inferir mecanismos, pues esto exige técnicas complementarias.

7. LIMITACIONES

En relación a las limitaciones del estudio, algunos factores dentro del diseño experimental se deben tomar en cuenta. Primero, se trabajó con un número limitado de dosis, donde se evaluaron dos concentraciones (200 µg/L y 2000 µg/L) que a su vez restringe la posibilidad de evaluar la relación dosis-respuesta. En adición, el estudio se enfocó en morfología externa y la histología hepática, dejando de lado marcadores bioquímicos y/o moleculares que permitieran evaluar vías moleculares concretas que se pueda ver afectadas, tales como apoptosis o estrés oxidativo. La parte histológica se trabajó meramente con tinción Hematoxilina-eosina y la comparación entre los grupos (control x tratado) de 2000 µg/L fue totalmente descriptiva. Por lo tanto, no hubo una sección de cuantificación morfométrica que permitiera de forma conclusiva percibir cambios sutiles.

8. CONCLUSIONES

8.1. CONCLUSIONES BIOLÓGICAS

Este trabajo estudió los efectos de la atrazina en el desarrollo embrionario de *Gallus gallus* de 7 días, profundizando en la morfología externa y el tejido hepático. Los resultados obtenidos demostraron la ausencia de efectos letales significativos en las concentraciones de 2000 y 200 µg/L. Sin embargo, hubo significancia estadística sobre la presencia de hemorragia en los embriones tratados con la dosis mayor como un efecto que podría indicar daño vascular en nivel subletal hasta el día estudiado. Otros parámetros analizados como malformación embrionaria, peso o fase del desarrollo se mostraron estadísticamente no significativos. Lo anterior muestra que los efectos a la exposición a atrazina pueden expresarse como afecciones subletales aún cuando los parámetros de mortalidad no indican significancia estadística. Con dichos datos es posible afirmar que bajo la ventana de exposición y tiempo el endpoint de hemorragia podría ser un indicador temprano de sensibilidad.

Los resultados histológicos de hígado embrionario pertenecientes a tratados y controles apuntan a que de forma descriptiva se encontró congestión sinusoidal y células picnóticas que figuran como alteraciones vasculares en láminas correspondientes al tratamiento con atrazina. Sin embargo no se encontraron otras características de daño tisular como vacuolización, necrosis o apoptosis. Con esto, es importante recalcar las limitaciones de esta parte del estudio descriptivo como el tamaño muestral, la ausencia de evaluaciones cuantitativas. Estudios futuros con mayores tamaños en la muestra, adaptaciones adecuadas en cuanto al procedimiento histológico, análisis estadísticos cuantitativos y con marcadores inmuno histológicos como marcadores vasculares para la evaluación de hemorragia, marcadores apoptóticos para células picnóticas y marcadores del estrés oxidativo para estudiar la congestión sinusoidal podrán traer resultados más conclusivos de la acción de la atrazina en embriones aviares.

8.2. CONCLUSIONES METODOLÓGICAS

En relación a los protocolos histológicos empleados para observar el tejido hepático, se constató que la duración de los protocolos (largo y corto) no se observó una diferencia en la histoarquitectura del tejido, aunque el protocolo debe ser aún optimizado, visto que el material fue apenas parcialmente preservado, La comparación de fijadores evidenció

que tanto la solución Carnoy como el paraformaldehído 4% preservan de forma parcial el tejido hepático, logrando estudios morfológicos gracias a la preservación de las estructuras que componen el hígado embrionario como los sinusoides, células sanguíneas, parénquima hepático (parcialmente). No obstante, la tinción de hematoxilina y eosina tuvo diferencias al comparar ambos fijadores, siendo que con la solución Carnoy, la tinción fue más intensa resaltando el citoplasma y la delimitación de los núcleos y con el paraformaldehído 4% la tinción se presentó de forma opaca, especialmente en el parénquima que es teñido con eosina. Lo anterior brinda información útil para estandarizar protocolos histológicos en futuros estudios con embriones aviares de 7 días de desarrollo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, Biswajeet et al. Perspectives on chick embryo models in developmental and reproductive toxicity screening. *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.), v. 126, n. 108583, p. 108583, 2024.

AJILEYE, A. B.; ESAN, E. O. Fixation and fixatives in histopathology: a review. *Bayero Journal of Pure and Applied sciences*, v. 15, n. 1, p. 231–243, 2022.

ARCAIN, Beatriz et al. Embryotoxic effects of Rovral® for early chicken (*Gallus gallus*) development. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, v. 84, n. 15, p. 632–648, 2021.

BALLARD, F. J.; OLIVER, I. T. Glycogen metabolism in embryonic chick and neonatal rat liver. *Biochimica et biophysica acta*, v. 71, p. 578–588, 1963.

BARAL, Ananda. Endoplasmic reticulum stress signaling in the regulation of hepatic pathological responses. *Stresses*, v. 4, n. 3, p. 481–504, 2024.

BASHER, H. A.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. Infection, haemorrhagia and death of chick embryos experimentally inoculated with *Listeria monocytogenes* by the intra-allantoic route. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie* [International journal of microbiology and hygiene. A, Medical microbiology, infectious], v. 255, n. 2–3, p. 239–246, 1983.

BHATTI, Priyanka et al. Ultimate fate and possible ecological risks associated with atrazine and its principal metabolites (DIA and DEA) in soil and water environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 248, n. 114299, p. 114299, 2022.

BLAHOVA, Jana et al. Embryotoxicity of atrazine and its degradation products to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 77, n. 103370, p. 103370, 2020.

BORNMAN, M. S. et al. Ultrastructural effects of DDT, DDD, and DDE on neural cells of the chicken embryo model. *Environmental toxicology*, v. 22, n. 3, p. 328–336, 2007.

BRINGOLF, Robert B. et al. Acute and chronic toxicity of pesticide formulations (atrazine, chlorpyrifos, and permethrin) to glochidia and juveniles of *Lampsilis siliquoidea*. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 26, n. 10, p. 2101–2107, 2007.

BURGOYNE, L. A. The mechanisms of pyknosis: hypercondensation and death. *Experimental cell research*, v. 248, n. 1, p. 214–222, 1999.

CARSON, Freida L.; CAPPELLANO, Christa (ORGS.). *Histotechnology: A self-instructional text*. 3. ed. Chicago, IL, USA: American Society of Clinical Pathologists Press, 2009.

CHANDRA SEKARAN, Swathi Priyadarshini et al. Effect of chlorpyrifos and its metabolites on skeletal system development of chick embryo. *Birth defects research*, v. 115, n. 11, p. 1063–1078, 2023.

CHANG, Jiongjiong et al. Toxic effects of atrazine on immune function in BALB/c mice. *Environmental science and pollution research international*, v. 28, n. 28, p. 37978–37994, 2021.

CHEN, Jingxuan et al. A comprehensive review of cytochrome P450 2E1 for xenobiotic metabolism. *Drug metabolism reviews*, v. 51, n. 2, p. 178–195, 2019.

CHEN, Qinglin et al. Soil microbial community toxic response to atrazine and its residues under atrazine and lead contamination. *Environmental science and pollution research international*, v. 22, n. 2, p. 996–1007, 2015.

CHESNICK, Ingrid E. *et al.* Elevated pressure improves the rate of formalin penetration while preserving tissue morphology. *Journal of cancer*, v. 1, p. 178–183, 2010.

CHROMCOVA, Lucie et al. The effects of atrazine exposure on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Neuroendocrinology Letters*, v. 34, n. 2, p. 7, 2013.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. 17a Reunião do GT Classificação e Diretrizes Ambientais para Enquadramento de Águas Subterrâneas.

CROOM, Edward L. The role of toxicokinetics and toxicodynamics in developmental and translational toxicology. In: *Molecular and Integrative Toxicology*. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 45–81.

DAUFENBACK, Vanessa et al. Agrotóxicos, desfechos em saúde e agroecologia no Brasil: uma revisão de escopo. *Saúde em Debate*, v. 46, n. spe2, p. 482–500, 2022.

DE ANDRADE, Bárbara Zanardini. Efeito Da Plataforma Vibratória No Perfil Bioquímico, Estresse Oxidativo E Morfologia Dos Tecidos Hepático E Adiposo De Ratos Winstar Obesos. Paraná: Universidade Estadual Do Oeste Do Paraná - Campus De Cascavel, 2019.

DE ROSA, Elvira et al. Assessment of atrazine contamination in the Sele River estuary: spatial distribution, human health risks, and ecological implications in Southern Europe. *Environmental sciences Europe*, v. 36, n. 1, 2024.

DESTRO, Ana Luiza F. et al. Effects of subchronic exposure to environmentally relevant concentrations of the herbicide atrazine in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae*. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 208, n. 111601, p. 111601, 2021.

DORSEY, Alfred et al. *Toxicological Profile For Atrazine*. 1600 Clifton Road NE, Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Toxicology, 2003.

DÖRTBUDAK, Muhammet Bahaeddin et al. Comparison of different fixatives effects in histochemical stainings of peripheral nerve tissue. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, v. 70, n. 12, p. 88–94, 2025.

DU, Zheng-Hai et al. Activating nuclear xenobiotic receptors and triggering ER stress and hepatic cytochromes P450 systems in quails (*Coturnix C. coturnix*) during atrazine exposure. *Environmental toxicology*, v. 32, n. 6, p. 1813–1822, 2017.

DUTTON, G. J. Developmental aspects of drug conjugation, with special reference to glucuronidation. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 18, n. 1, p. 17–35, 1978.

ECHEVERRIA, Camilo V., Jr; LEATHERS, Tess A.; ROGERS, Crystal D. Effectiveness of fixation methods for wholemount immunohistochemistry across cellular compartments in chick embryos. 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/2024.03.23.586361>>.

ELLIS, Jillian L.; YIN, Chunyue. Histological analyses of acute alcoholic liver injury in zebrafish. *Journal of visualized experiments: JoVE*, n. 123, 2017.

FATHI, Mohamed Ahmed et al. Effect of in ovo glyphosate injection on embryonic development, serum biochemistry, antioxidant status and histopathological changes in newly hatched chicks. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, v. 103, n. 6, p. 1776–1784, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Pesticides use and trade, 1990–2022. FAO, 2024. Disponível em: <<https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/a8a8c2c8-ee36-42e8-a619-7e73c8daf8a6/content>>.

FOSTER, T. S.; KHAN, S. U. Metabolism of atrazine by the chicken. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 24, n. 3, p. 566–570, 1976.

FRY, D. M. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environmental health perspectives*, v. 103 Suppl 7, p. 165–171, 1995.

GARCÍA, A. M. Efectos teratógenos de la exposición a pesticidas. *Una Alternativa Para El Mundo Rural Del Tercer Milenio*, 1998.

GUEDES, Priscila Tavares et al. Histological analyses demonstrate the temporary contribution of yolk sac, liver, and bone marrow to hematopoiesis during chicken development. *PloS one*, v. 9, n. 3, p. e90975, 2014.

GELY-PERNOT, Aurore et al. Embryonic exposure to the widely-used herbicide atrazine disrupts meiosis and normal follicle formation in female mice. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 3526, 2017.

GITIRANA, Lycia de Brito. *Técnicas Histológicas: Conceitos Básicos*. Rio de Janeiro: Editora Científica Digital, 2024.

GOLOGAN, Daniela *et al.* Quality assurance and cost reduction in histopathology laboratories using tissue microarrays. *Veterinary sciences*, v. 10, n. 4, p. 280, 2023.

GRIFFITHS, Meaghan J. et al. Prolonged atrazine exposure beginning in utero and adult uterine morphology in mice. *Journal of developmental origins of health and disease*, v. 13, n. 1, p. 39–48, 2022.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, v. 195, n. 4, p. 231–272, 1992.

HAMILTON, J. W.; DENISON, M. S.; BLOOM, S. E. Development of basal and induced aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase activity in the chicken embryo in ovo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 80, n. 11, p. 3372–3376, 1983.

HAO, Yanfen et al. Ecotoxicology of persistent organic pollutants in birds. *Environmental science. Processes & impacts*, v. 23, n. 3, p. 400–416, 2021.

HE, Huijun et al. A review on recent treatment technology for herbicide atrazine in contaminated environment. *International journal of environmental research and public health*, v. 16, n. 24, p. 5129, 2019.

HEINRICH-HIRSCH, B. et al. Activity of aldrin epoxidase, 7-ethoxycoumarin-O-deethylase and 7-ethoxyresorufin-O-deethylase during the development of chick embryos in ovo. *Archives of toxicology*, v. 64, n. 2, p. 128–134, 1990.

HILL, E. F.; HOFFMAN, D. J. Avian models for toxicity testing. *Journal of the American College of Toxicology*, v. 3, n. 6, p. 357–376, 1984.

HOLDEN, Nicholas et al. (ORGS.). *Introduction to Biosystems Engineering II*. Virginia Tech Publishing, 2022.

HONG, Seung-Mo et al. A “clearer” view of pancreatic pathology: A review of tissue clearing and advanced microscopy techniques: A review of tissue clearing and advanced microscopy techniques. *Advances in anatomic pathology*, v. 26, n. 1, p. 31–39, 2019.

HOWAT, William J.; WILSON, Beverley A. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods (San Diego, Calif.)*, v. 70, n. 1, p. 12–19, 2014.

HUNTER, R. P.; MAHMOOD, I.; MARTINEZ, M. N. Prediction of xenobiotic clearance in avian species using mammalian or avian data: how accurate is the prediction? *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, v. 31, n. 3, p. 281–284, 2008.

IBGE. Produção Agrícola Municipal 2023. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?edicao=41285&t=destaques>>

INGAWALE, Deepa K.; MANDLIK, Satish K.; NAIK, Suresh R. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 37, n. 1, p. 118–133, 2014.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1999.

IRGEN-GIORO, Shawn et al. Fixation can change the appearance of phase separation in living cells. *eLife*, v. 11, n. e79903, 2022.

JABLONOWSKI, Nicolai David; SCHÄFFER, Andreas; BURAUDEL, Peter. Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine. *Environmental science and pollution research international*, v. 18, n. 2, p. 328–331, 2011.

JACKSON, Kaitlyn G. et al. The dynamic role of endoplasmic reticulum stress in chronic liver disease. *The American journal of pathology*, v. 193, n. 10, p. 1389–1399, 2023.

JOSHI, Nikita et al. Developmental abnormalities in chicken embryos exposed to N-nitrosoatrazine. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, v. 76, n. 17, p. 1015–1022, 2013.

KADRY, Shadia et al. Vitamin E as antioxidant in female african catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to chronic toxicity of atrazine. *Egyptian journal of aquatic biology and fisheries*, v. 16, n. 2, p. 83–98, 2012.

KOLEKAR, Parag D. et al. Microcosm study of atrazine bioremediation by indigenous microorganisms and cytotoxicity of biodegraded metabolites. *Journal of hazardous materials*, v. 374, p. 66–73, 2019.

LAKSHMINARAYAN, P. G.; BOUZAHER, Aziz; SHOGREN, Jason F. Atrazine and water quality: An evaluation of alternative policy options. *Journal of environmental management*, v. 48, n. 2, p. 111–126, 1996.

LEHEL, József et al. Model study on chicken embryos to investigate potential teratogenic risk of wild birds due to pesticide and environmental contaminant. 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-517851/v1>>.

LENKOWSKI, Jenny R. et al. Perturbation of organogenesis by the herbicide atrazine in the amphibian *Xenopus laevis*. *Environmental health perspectives*, v. 116, n. 2, p. 223–230, 2008.

LIMA, Igor Barbosa; BOËCHAT, Iola Gonçalves; GÜCKER, Björn. Glifosato no Brasil. *Caderno de Geografia*, v. 31, n. 1, p. 90, 2021..

LOPES, Carla Vanessa Alves; ALBUQUERQUE, Guilherme Souza Cavalcanti. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. *Saúde em Debate*, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018.

LUCKETT, W. Patrick. Ontogeny of amniote fetal membranes and their application to phylogeny. In: *Major Patterns in Vertebrate Evolution*. Boston, MA: Springer US, 1977. p. 439–516.

MAESTRO; KALISZ. IMMUNOFLUORESCENCE. 2015. Disponível em: <<https://www.imperial.ac.uk/media/imperial-college/medicine/beta-cell-genome-regulation-lab/IHC-protocol-for-paraffin-embedded-tissue.pdf>>.

MAHMOUD, Fatma A. Bdel-Regal et al. Impact of atrazine and nitrate on liver and kidney of egyptian toad *Sclerophrys regularis*: bioindicator alarming on ecosystem. *Acta scientiarum. Biological sciences*, v. 44, p. e56386, 2022.

MAIA, Maria Eduarda et al. Effects of atrazine, diuron and glyphosate mixtures on zebrafish embryos: acute toxicity and oxidative stress responses. *Ecotoxicology (London, England)*, v. 34, n. 2, p. 304–316, 2025.

MARCHI, Giuliano; MARCHI, Edilene Carvalho Santos; GUIMARÃES, Tadeu Graciolli (ORGS.). *Herbicidas: mecanismos de ação e uso*. Embrapa Cerrados, 2008.

MATSUSHITA, S. et al. Effects of in ovo exposure to imazalil and atrazine on sexual differentiation in chick gonads. *Poultry science*, v. 85, n. 9, p. 1641–1647, 2006.

METGUD, R. et al. Conventional xylene and xylene-free methods for routine histopathological preparation of tissue sections. *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission*, v. 88, n. 5, p. 235–241, 2013.

MOREIRA, Josino Costa et al. Groundwater and rainwater contamination by pesticides in an agricultural region of Mato Grosso state in central Brazil. *Ciencia & saude coletiva*, v. 17, n. 6, p. 1557–1568, 2012.

MURPHY, A. E. et al. Extrapituitary GH in the chicken: underestimation of immunohistochemical staining by Carnoy's fixation. *The journal of endocrinology*, v. 177, n. 2, p. 223–234, 2003.

NAVARRO, M. et al. Study of the distribution of albendazole-sulphoxide (ABZ-SO) in fertilized egg compartments. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, v. 37, n. 4, p. 191–196, 1997.

NWANI, C. D. et al. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 31, n. 2, p. 314–322, 2011.

ÖZTÜRK GÜRGEN, Hazal; YILDIRIM, Funda. Kedi ve Köpek Dokularının Farklı Fiksatiflerle Tespiti ve Histolojik Görünümlerinin Karşılaştırılması. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, v. 17, n. 3, p. 242–247, 2020.

PETERS, P. W.; PIERSMA, A. H. In vitro embryotoxicity and teratogenicity studies. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, v. 4, n. 4–5, p. 570–576, 1990.

PIGNATI, Wanderlei Antonio et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciência & saúde coletiva*, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, 2017.

PUCHTLER, H. et al. Carnoy fixation: practical and theoretical considerations. *y. Histochemie*, v. 16, n. 4, p. 361–371, 1968.

PUSHPANJALI et al. In ovo embryotoxicity of α -endosulfan adversely influences liver and brain metabolism and the immune system in chickens. *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 82, n. 2, p. 103–114, 2005.

QIAN, Honghao et al. Toxic effects of atrazine on liver and underlying mechanism: A review. *Exposure and health*, v. 16, n. 2, p. 517–526, 2024.

QIAN, Honghao et al. The role of endoplasmic reticulum stress in Atrazine-induced hepatic lipid accumulation. *Toxicology letters*, v. 412, p. 34–43, 2025.

QUERO, Arnaldo A. M.; PEDROSA, Analía; GORLA, Nora B. M. Liver and kidney damage in quail embryos hatched from eggs sprayed once with chlorpyrifos during artificial incubation. *Veterinary research communications*, v. 48, n. 2, p. 1285–1291, 2024.

RAJINI, A.; REVATHY, K.; SELVAM, G. Histopathological changes in tissues of *Danio rerio* exposed to sub lethal concentration of combination pesticide. *Indian journal of science and technology*, v. 8, n. 18, 2015.

RAMÍREZ CAMPOS, Marco Antonio. El Uso De Pesticidas En La Agricultura Y Su Desorden Ambiental. *Revista Enfermería la Vanguardia*, v. 6, n. 2, p. 40–47, 2020.

ROHR, Jason R. The atrazine saga and its importance to the future of toxicology, science, and environmental and human health. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 40, n. 6, p. 1544–1558, 2021.

SANDSTRÖM, B.; WESTMAN, J. Ultrastructure of the developing chicken liver before hatching. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948)*, v. 117, n. 4, p. 516–525, 1971.

SANTAGOSTINO, A. et al. Effect of 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid on liver catalase in chicken embryos. In: *Archives of Toxicology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1988. p. 387–390.

SEGHERS, Dave et al. Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS microbiology ecology*, v. 46, n. 2, p. 139–146, 2003.

SHENG, Guojun; FOLEY, Ann C. Diversification and conservation of the extraembryonic tissues in mediating nutrient uptake during amniote development: Nutrient uptake during amniote development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1271, n. 1, p. 97–103, 2012.

SHIMABUKURO, Richard H.; SWANSON, Harley R. Atrazine metabolism, selectivity, and mode of action. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 17, n. 2, p. 199–205, 1969.

SILBERGELD, Ellen K.; PATRICK, Thelma E. Environmental exposures, toxicologic mechanisms, and adverse pregnancy outcomes. *American journal of obstetrics and gynecology*, v. 192, n. 5 Suppl, p. S11-21, 2005.

SILVA, Stella Bicalho et al. Exposure to the herbicide atrazine induces oxidative imbalance, morphological damage and decreased survival in juvenile fish. *Bioscience journal: BJ*, v. 39, p. e39034, 2023.

SINGH, Divya et al. Impacts of agrochemicals on soil microbiology and food quality. In: *Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation*. Amsterdam: Elsevier, 2020. p. 101–116.

SLAOUI, Mohamed; FIETTE, Laurence. Histopathology procedures: from tissue sampling to histopathological evaluation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 691, p. 69–82, 2011.

SLEISENGER; FORDSTRAND. Embryology, anatomy, histology, and developmental anomalies of the liver. Disponible en: <<https://clinicalpub.com/embryology-anatomy-histology-and-developmental-anomalies-of-the-liver/>>. Acesso em: 16 nov. 2025.

SMITH, Susan M.; FLENTKE, George R.; GARIC, Ana. Avian models in teratology and developmental toxicology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 889, p. 85–103, 2012.

SNYDER, Jessica M. et al. Perfusion with 10% neutral-buffered formalin is equivalent to 4% paraformaldehyde for histopathology and immunohistochemistry in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Veterinary pathology*, v. 59, n. 3, p. 498–505, 2022.

SONG, Xiao-Yao et al. Atrazine causes autophagy- and apoptosis-related neurodegenerative effects in dopaminergic neurons in the rat nigrostriatal dopaminergic system. *International journal of molecular sciences*, v. 16, n. 6, p. 13490–13506, 2015.

SORRELL, J. M.; WEISS, L. Development of the embryonic chick phagocytic system: intraembryonic erythrophagocytosis induced by phenylhydrazine. *Journal of morphology*, v. 171, n. 2, p. 183–194, 1982.

STACKELBERG, Paul E. et al. Regression models for estimating concentrations of atrazine plus deethylatrazine in shallow groundwater in agricultural areas of the United States. *Journal of environmental quality*, v. 41, n. 2, p. 479–494, 2012.

STARK, Michael R.; ROSS, Micah M. The chicken embryo as a model in developmental toxicology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 1965, p. 155–171, 2019.

SU, Yu H.; LIANG, Yong C. Transport via xylem of atrazine, 2,4-dinitrotoluene, and 1,2,3-trichlorobenzene in tomato and wheat seedlings. *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 100, n. 3, p. 284–288, 2011.

SUVARNA, Kim S.; LAYTON, Christopher; BANCROFT, John D. Bancroft's theory and practice of histological techniques: Expert consult: Online and print. 7. ed. Londres, England: Churchill Livingstone, 2012.

TAQI, Syed Ahmed et al. A review of artifacts in histopathology. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, v. 22, n. 2, p. 279, 2018.

TORTELLA, G. R. et al. Atrazine dissipation and its impact on the microbial communities and community level physiological profiles in a microcosm simulating the biomixture of on-farm biopurification system. *Journal of hazardous materials*, v. 260, p. 459–467, 2013.

TYGEL, Alan et al. atlas agrotóxicos dos Fatos e dados do uso dessas substâncias na agricultura. Rio de Janeiro: Fundação Heinrich Böll, 2023.

WACHHOLZ, Gabriela Elis et al. From the farm to the lab: How chicken embryos contribute to the field of teratology. *Frontiers in genetics*, v. 12, p. 666726, 2021.

WANG, Shengchen et al. Atrazine exposure triggers common carp neutrophil apoptosis via the CYP450s/ROS pathway. *Fish & shellfish immunology*, v. 84, p. 551–557, 2019.

WIEGAND, C. et al. Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 49, n. 3, p. 199–205, 2001.

WILHELMS, K. W. et al. In ovo exposure to a triazine herbicide: effects of atrazine on circulating reproductive hormones and gonadal histology in young Japanese quail. *Archives of environmental contamination and toxicology*, v. 51, n. 1, p. 117–122, 2006.

WIRBISKY, Sara E. et al. An embryonic atrazine exposure results in reproductive dysfunction in adult zebrafish and morphological alterations in their offspring. *Scientific reports*, v. 6, n. 1, p. 21337, 2016.

WONG, G. K.; CAVEY, M. J. Development of the liver in the chicken embryo. I. Hepatic cords and sinusoids. *The anatomical record*, v. 234, n. 4, p. 555–567, 1992.

WONG, G. K.; CAVEY, M. J. Development of the liver in the chicken embryo. II. Erythropoietic and granulopoietic cells. *The anatomical record*, v. 235, n. 1, p. 131–143, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Atrazine. Health and safety guide. Geneva: World Health Organization for the International Programme on Chemical Safety, 1990.4.

XUE, Ying et al. Aquaculture-derived distribution, partitioning, migration, and transformation of atrazine and its metabolites in seawater, sediment, and organisms from a typical semi-closed mariculture bay. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, v. 271, n. 116362, p. 116362, 2021.

YUN, Jian; QIAN, Song S. A hierarchical model for estimating long-term trend of atrazine concentration in the surface water of the contiguous U.S. *Journal of the American Water Resources Association*, v. 51, n. 4, p. 1128–1137, 2015.

ZAEFARIAN, Faegheh et al. Avian liver: The forgotten organ. *Animals: an open access journal from MDPI*, v. 9, n. 2, p. 63, 2019.

ZALUSKI, Amanda B. et al. Atrazine and diuron effects on survival, embryo development, and behavior in larvae and adult zebrafish. *Frontiers in pharmacology*, v. 13, p. 841826, 2022.

ZHANG, Cong et al. Atrazine triggers hepatic oxidative stress and apoptosis in quails (*Coturnix C. coturnix*) via blocking Nrf2-mediated defense response. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 137, p. 49–56, 2017.

ZAYA, Renee M. et al. Atrazine exposure affects growth, body condition and liver health in *Xenopus laevis* tadpoles. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, v. 104, n. 3–4, p. 243–253, 2011.

ZHU, Wen-Jun et al. Avermectin induced liver injury in pigeon: mechanisms of apoptosis and oxidative stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 98, p. 74–81, 2013.

ANEXOS

Tabla 1- Proporción de embriones muertos con intervalos de confianza de Wilson - Brown 95%

Dosis (µg/L)	Grupo	Embriones muertos	Embriones vivos	Total	Proporción de mortalidad (%)	IC95% de Wilson - Brown embriones muertos
200	control	2	8	10	20,00%	0,0355 – 0,5098
200	tratado	1	8	9	11,11%	0,0057– 0,4350
2000	control	2	25	27	7,41%	0,01316–0,2337
2000	tratado	1	21	22	4,50%	0,0023 – 0,218

Tabla 2- Proporción de embriones con hemorragia con intervalos de confianza del 95% de Wilson - Brown

Dosis (µg/L)	Grupo	Embriones con hemorragia	Embriones sin hemorragia	total	Proporción de mortalidad (%)	Ic de Wilson 95% (hemorragia)
200	control	2	8	10	20,00%	0,036 - 0,509
200	tratado	5	4	9	55,56%	0,267- 0,812
2000	control	5	22	27	18,52%	0,082 - 0,367
2000	tratado	11	11	22	50,00%	0,307 - 0,693

Tabla 3- Proporción de embriones con malformación junto con intervalos de confianza del 95% de Wilson - Brown

Dosis (µg/L)	Grupo	Embriones con malformación	Embriones sin malformación	total	Proporción (%) de malformación	Ic de Wilson 95%	de
200	control	1	9	10	10,00%	0,005-0,404	
200	tratado	2	7	9	22,22%	0,0395-0,547	
2000	control	4	23	27	14,81%	0,059-0,325	-
2000	tratado	4	18	22	18,18%	0,073-0,385	-

Tabla 4- Media de los pesos embrionarios y diferencias entre las medias

Dosis (µg/L)	Grupo	Tamaño de la muestra	Media de los pesos	Diferencia entre medias (B - A) ± DE
200	control	10	0.7449	0.1807 ± 0.1619
200	tratado	9	0,9255	
2000	control	27	0.7996	0.02771 ± 0.05387
2000	tratado	22	0.8273	

B - Grupo tratado

A - Grupo control

DE - Desviación estándar

Tabla 5- Mediana y rangos intercuartílicos de las fases de desarrollo HH

Dosis ($\mu\text{g/L}$)	Grupo	Tamaño de la muestra	Mediana de las fases embrionarias	Rangos intercuartílicos
200	control	10	30,5	$Q_1 (25\%) = 30$ $Q_3 (75\%) = 31$
200	tratado	9	31,00	$Q_1 (25\%) = 31$ $Q_3 (75\%) = 31$
2000	control	27	31,00	$Q_1 (25\%) = 31$ $Q_3 (75\%) = 31$
2000	tratado	22	31,00	$Q_1 (25\%) = 30$ $Q_3 (75\%) = 31$

Q_1 - valor debajo del 25% de datos

Q_3 - valor debajo del 75% de datos