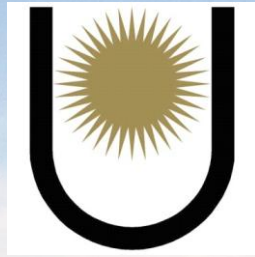


UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE



Tesis para optar el título de Doctor en Biología

**“IMPACTO DE LAS ACTIVIDADES
AGROINDUSTRIALES EN LA
REPRODUCCIÓN DE ANUROS (AMPHIBIA)
DEL LITORAL MESOPOTÁMICO DE
ARGENTINA”**

TESISTA: Lic. Lucila Marilén Curi

DIRECTOR: Dr. Rafael Carlos Lajmanovich

CO-DIRECTORA: Dra. Paola Mariela Peltzer

-Corrientes, Argentina-2019

A mi eterno ángel... mi madre.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	v
ABSTRACT	x
1. Capítulo I: Introducción general.....	1
1.1 Los Anfibios y su uso como organismos modelo en Ecotoxicología	1
1.2 Declinación de Anfibios: causas.....	2
1.3 Nuevas amenazas.....	8
1.4 Uso de Anuros (Amphibia) como organismos modelo	10
1.5 Objetivos de la tesis.....	12
1.5.1 Objetivo general.....	12
1.5.2 Objetivos particulares.....	12
2. Capítulo II: “Anormalidades en la morfología e histología gonadal y hepática en anuros adultos de cultivos de arroz”	15
2.1 Introducción	15
2.1.1 Objetivos	22
2.2 Metodología	22
2.2.1 Área de estudio	22
2.2.2 Especies seleccionadas.....	26
2.2.3 Muestreo de anuros.....	27
2.2.4 Mediciones generales y disección.....	28
2.2.5 Evaluación de la morfológica gonadal externa de machos.....	28
2.2.6 Procesamiento histológico de gónadas de machos.....	29
2.2.7 Análisis histológico de gónadas, Órgano de Bidder y variables analizadas.....	30
2.2.8 Procesamiento histológico del hígado	32
2.2.9 Análisis histológico del hígado y variables analizadas	32
2.2.10 Análisis estadísticos.....	33
2.3 Resultados.....	33

2.3.1 <i>Lysapsus limellum</i>	33
2.3.1.1 Parámetros morfológicos generales	33
2.3.1.2 Evaluación de la morfología gonadal externa de machos	34
2.3.1.3 Análisis de la histología testicular	36
2.3.1.4 Análisis de la histología hepática	40
2.3.2 <i>Rhinella bergi</i>	44
2.3.2.1 Parámetros morfológicos generales	44
2.3.2.2 Evaluación de la morfología gonadal externa de machos	44
2.3.2.3 Análisis de la histología testicular y del Órgano de Bidder	46
2.3.2.4 Análisis de la histología hepática	53
2.4 Discusión de resultados	58
3. Capítulo III: Efectos letales y subletales causados por la exposición a un formulado comercial en base a 2,4-D en renacuajos de <i>Physalaemus albonotatus</i> (Anura: Leptodactylide).....	71
3.1 Introducción	71
3.1.1 Plaguicidas en Argentina: la situación del 2,4-D	74
3.1.2 Objetivos	79
3.2 Metodología	79
3.2.1 Especie modelo.....	79
3.2.2 Herbicida utilizado	80
3.2.3 Ensayo Agudo	81
3.2.4 Ensayo crónico.....	81
3.2.4.1 Supervivencia.....	82
3.2.4.2 Crecimiento y desarrollo	82
3.2.4.3 Anormalidades morfológicas.....	82
3.2.4.4 Análisis de la morfología e histología gonadal	83
3.2.4.5 Análisis de la histología hepática	83
3.2.4.6 Análisis estadísticos.....	84

3.3 Resultados	84
3.3.1 Ensayo agudo	84
3.3.2 Ensayo crónico.....	85
3.3.2.1 Supervivencia.....	85
3.3.2.2 Crecimiento y desarrollo	86
3.3.2.3 Anormalidades	87
3.3.2.4 Morfología e histología gonadal	90
3.3.2.5 Análisis de la Histología hepática	94
3.4 Discusión de resultados	97
4. Capítulo IV: Consideraciones finales y conclusiones	105
4.1 “Anormalidades en la morfología e histología gonadal y hepática en anuros adultos de cultivos de arroz ”	105
4.2 “Efectos letales y subletales causados por la exposición a un formulado comercial en base a 2,4-D en renacuajos de <i>Physalaemus albonotatus</i> (Anura: Leptodactylidae)”	107
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS...	109
ANEXO	162
ABREVIACIONES UTILIZADAS	167
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	170
AGRADECIMIENTOS	172

RESUMEN

Las poblaciones de anfibios están en declinación y muchas de ellas han llegado a extinguirse en las últimas décadas. La intensificación y expansión de las actividades agroindustriales y la consecuente contaminación producida por los productos químicos utilizados, han sido consideradas como una de las causas responsables de este fenómeno. En este sentido, los anuros son vertebrados altamente sensibles, debido a ciertas características eco-fisiológicas, y pueden estar expuestos a los contaminantes tanto en la fase acuática como terrestres de su ciclo de vida.

La presente tesis doctoral tuvo como objetivo general, abordar mediante un estudio ecotoxicológico los efectos de los cultivos de arroz ampliamente distribuidos en la zona del litoral mesopotámico, y de uno de los herbicidas tradicionales utilizados para su producción, sobre parámetros morfo-histológicos en órganos blanco (gónadas e hígado) en anfibios anuros. Los objetivos particulares planteados en la presente tesis fueron: O1: Evaluar la morfo-histología de gónadas e hígado en especies de anuros adultos que co-ocurren en cultivos de arroz a escala agroindustrial; O2: Evaluar los efectos letales y subletales de un herbicida con formulación 2,4-D, comúnmente usado en arrozales en renacuajos de *Physalaemus albonotatus*.

Para cumplir el primer objetivo, se seleccionaron dos cultivos de arroz (CA) en Santa Fe (CA 1) y Chaco (CA 2); y dos sitios de referencias (Ref, áreas sin cultivos que mantienen ambientes típicos naturales representativos; Ref 1 y Ref 2), fueron seleccionados en las dos provincias, respectivamente. Se seleccionaron dos especies: *Lysapsus limellum* (Hylidae) y *Rhinella bergi* (Bufonidae) que son comunes en cultivos de arroz y en los sitios de referencia de ambas provincias, respectivamente. Los muestreos se realizaron durante dos periodos anuales, coincidiendo con periodo entre la siembra y cosecha del arroz. Se registraron parámetros morfológicos (Peso (Pe) y longitud hocico cloaca (LHC)) y se calculó el Factor de condición animal (FCA) en cada individuo. Se analizó cada individuo bajo lupa estereoscópica en búsqueda de anomalías gonadales, y en machos se calculó el volumen testicular (VT). Para

el análisis histológico de gónadas e hígado se analizaron seis individuos machos de cada sitio. Gónadas (gónadas más órgano de Bidder/OB en *R. bergi*), e hígado de ambas especies y sitios fueron destinados al procesamiento histológico convencional. En cada testículo se examinaron 10 túbulos seminíferos de una sección medial de la gónada derecha, se contabilizó el número de cistos con células en estadios tempranos, tardíos, se clasificaron de acuerdo a la cantidad de espermatozoides en el lumen en rangos (de 0 a 3), y las secciones además se analizaron para la identificación de alteraciones histológicas. En *L. limellum* se clasificó la intensidad de la pigmentación testicular en criterios que van del 0 (sin pigmento) a 3 (muy pigmentado). Para el análisis del hígado, se analizaron secciones hepáticas para cuantificar el número de melanomacrófagos (MM) y analizar las mismas en búsqueda de otras alteraciones hepáticas. Ninguno de los parámetros morfológicos (Pe, LHC, FCA, VT) resultó significativamente diferente entre sitios en ninguna de las especies. La morfología gonadal mostró variaciones en cuanto al tamaño de ambos testículos en los individuos de sitios agrícolas, y en *L. limellum* se observó gran variación en cuanto a la pigmentación testicular. En tres de los individuos de *R. bergi* colectados en el sitio CA 2 se registraron anomalías en sus miembros (sindactilia y ectromelia). El análisis histológico reveló que los individuos de *L. limellum* del sitio CA 1 contenían mayor proporción de cistos con células en estadios tempranos de la espermatogénesis, y una mayor proporción de túbulos con escasa o nula cantidad de espermatozoides libres en el lumen, respecto a los de Ref 1. Los individuos de *R. bergi* de CA 2 presentaron mayor proporción de cistos con células en estadios tempranos, pero la proporción de cistos con células en estadios tardíos no difirió entre sitios. El OB de *R. bergi* del sitio CA 2 presentó folículos agrandados y en otro caso se observó con aspecto bilobulado. Histológicamente, se observaron células pigmentarias, folículos atrésicos y vacuolas en los folículos de especies de este sitio, pero en una proporción baja. Mediante el análisis histológico del hígado de individuos de CA 1 y CA 2 se observó agrandamiento de sinusoides, venas dilatadas, vacuolización de hepatocitos e hipervascularización del tejido hepático. El número de MM contabilizado en el tejido hepático no mostró diferencias significativas en *L. limellum* entre sitios ($P > 0.05$). Sin embargo, en

R. bergi el número de MM fue mayor en individuos de CA 2 respecto a los de Ref 2 ($P < 0.05$).

Los individuos machos de las especies de anfibios anuros seleccionadas y que habitan las arroceras presentaron anomalías morfológicas en miembros, alteraciones morfológicas gonadales, y lesiones hepáticas histológicas en hígado, ausentes en los animales de los sitios de referencia. Particularmente, en *L. limellum* se registró una espermatogénesis alterada en comparación a lo que se observó para el sitio Ref 1.

Por otra parte, para cumplir el segundo objetivo, se calculó la Concentración Letal 50 (CL50) luego de la exposición aguda de renacuajos de *P. albonotatus* durante 96 h a diferentes concentraciones del formulado comercial a base de 2,4-D, Amina Zamba® (350, 700, 1400 y 2400 mg/l). Además, se analizaron diferentes efectos subletales luego de la exposición crónica a cuatro concentraciones correspondientes a 12,5, 25, 50 y 75 % de la CL50 calculada a las 96 h y un control (43,7, 87,5, 175 y 262,5 mg/l de 2,4-D). Se analizaron distintas respuestas biológicas en los renacuajos: supervivencia, crecimiento (Peso (Pe); longitud total (LT), longitud hocico cloaca (LHC)) y desarrollo (tiempo en alcanzar los estadios 38, 42 y la metamorfosis), anormalidades en morfología larval y alteraciones histológicas en hígado y gónadas de individuos metamórficos. Las CLs50 de 2,4-D Amina Zamba® a las 48, 72 y 96 h fueron 1040,2, 754,2 y 360 mg/l, respectivamente. La exposición crónica al herbicida alteró la supervivencia y causó anormalidades en la morfología larval siendo las alteraciones del disco oral e intestinales las más frecuentes en las larvas expuestas a las concentraciones mayores. El crecimiento (Pe, LT, LHC) de las larvas no reveló diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$). Los renacuajos expuestos a 2,4-D mostraron una aceleración en el desarrollo, alcanzando los estadios 38 y 42 y la metamorfosis significativamente antes que los individuos del control. El análisis histológico de hígado demostró que en los renacuajos expuestos a 87,5, 175 y 262,5 mg/l de 2,4-D hubo un incremento significativo en el número de MM respecto al control ($P < 0.05$). Además, se observó vacuolización de hepatocitos, agrandamiento de sinusoides y dilatación de vasos sanguíneos en los

individuos tratados. No se observaron alteraciones histológicas en testículos de renacuajos de *P. albonotatus* expuestos al herbicida 2,4-D. Por el contrario, el examen histológico de los ovarios de individuos tratados con las mayores concentraciones de 2,4-D Amina Zamba® (175, 262,5 mg/l) mostró un estado de desarrollo más retrasado respecto al control y a las menores concentraciones.

El herbicida a base del formulado 2,4-D (Amina Zamba®) causó un efecto letal agudo bajo sobre renacuajos de *P. albonotatus*, especie para la cual no existían evidencias sobre los efectos tóxicos de la exposición aguda y crónica a este agroquímico de uso masivo. Asimismo, se registraron anormalidades morfológicas severas, aceleración en el tiempo de desarrollo morfológico, retraso en desarrollo ovárico y proliferación de melanomacrófagos hepáticos por exposición a concentraciones altas de este herbicida. Estos marcadores biológicos deberían ser evaluados en futuros estudios para comprender los mecanismos que subyacen a estos efectos.

Finalmente, de acuerdo a los resultados obtenidos, se pudieron sostener las hipótesis planteadas en el capítulo I:

Los productos agroquímicos utilizados en los cultivos de arroz producen alteraciones en la morfo-histología gonadal en anfibios anuros adultos y causan histopatologías hepáticas por exposición crónica en *L. limellum* y *R. bergi*.

El formulado comercial 2,4-D Amina Zamba® altera el desarrollo, morfología e histología gonadal en renacuajos de *P. albonotatus*.

La exposición crónica a concentraciones subletales del formulado comercial 2,4-D Amina Zamba® causa alteraciones histopatológicas en el tejido hepático en renacuajos de *P. albonotatus*.

La información obtenida en relación a los efectos de las actividades agrícolas y la aplicación de plaguicidas, brinda evidencias del riesgo ecotoxicológico al que están expuestos los anfibios anuros en los cultivos de arroz en las provincias de Santa Fe y Chaco.

Palabras Claves: Anfibios, Agroecosistemas, Agroquímicos, Histología, Melanomacrófagos, Gónadas, hígado.

ABSTRACT

The amphibian populations are in decline, and many of them have become extinct in recent decades. The intensification and expansion of agro-industrial activities and the agrochemicals contamination have considered one of the main causes that operate on this phenomenon. In this sense, the anurans are highly sensitive vertebrate, due to certain eco-physiological characteristics, and may be exposed to pollutants both in aquatic and terrestrial phases of their life cycle.

The general aim of this doctoral thesis was to study the effects of rice crops and traditional herbicides used for its production on morphological and histological parameters of organs (gonads, liver) of anurans through an ecotoxicological study. The specific goals were: O1: To evaluate the morphology and histology of gonads and livers of two adult anurans species that co-occur in rice crops. O2: To evaluate the lethal and sublethal effects of a 2,4-D herbicide formulation, commonly used in rice fields in *Physalaemus albonotatus* tadpoles.

For the first purpose, two rice crops (RC) from Santa Fe (RC 1) province and Chaco (RC 2) province; and two reference sites (Ref, areas without crops that maintain typical representative natural environment; Ref 1 and Ref 2) were selected in the two provinces, respectively. Two anuran species were selected: *Lysapsus limellum* (Hylidae) and *Rhinella bergi* (Bufonidae) that are commonly found in the rice crops and reference sites of both provinces, respectively. The field surveys were carried out during two annual periods, coinciding to time between rice planting and harvesting. The weight (We) and snout-vent length (SVL) were measured, and the animal condition factor (CF) were calculated for each individual. The analysis of the gonadal morphology was performed under stereoscopic magnifying glasses and the testicular volume (TV) was calculated. Six male individuals from each site were selected for histological analysis of gonad and liver. Standard histological procedures of gonads (gonads and Bidder organ/BO in *R. bergi*) and livers of both species were performed. Ten seminiferous tubules of a medial section of the right testes were examined, the number of cysts with early stages, late stages of spermatogenic cells was

counted, and the amount of sperm in the lumen was stages from 0 to 3. In addition, all the sections were analyzed to score histological alterations. The intensity of testicular pigmentation was classified ranging from 0 to 3 criteria. For liver histological analysis, the number of melanomacrophages (MM) was quantified in the hepatic sections and other histological alterations were searched. None of the morphological parameters (We, SVL, FC, and TV) was significantly different between sites in any of the species. The gonadal morphology showed irregular sizes between both testes in agricultural sites, and a great variation in the testicular pigmentation was also observed in *L. limellum*. Limb abnormalities (syndactyly and ectromelia) were observed in three *R. bergi* individuals from RC 2. In *L. limellum* from RC 1, the histological analysis revealed a higher proportion of cysts with early spermatogenic cell stages and a greater proportion of seminiferous tubules without or little amount of free spermatozoa, than Ref 1. *Rhinella bergi* from RC 2 had a higher proportion of cysts with early spermatogenic cell stages than in Ref 2, but the proportion of cysts with late spermatogenic stages did not differ between sites. The BO of *R. bergi* from RC 2 presented enlarged follicles and a bilobed appearance. Furthermore, pigmentary cells, atretic follicles, and vacuoles in follicles were observed through histological analysis, but in low proportion. Sinusoid enlargement, dilated veins, hepatocyte vacuolization and hypervascularization in frogs liver tissue from agricultural sites were observed by histological analysis. The MM number did not show significant differences in *L. limellum* between sites ($P>0.05$). However, the MM number was higher in *R. bergi* from RC 2 than Ref 2 ($P<0.05$).

The male individuals of the selected anuran that inhabit the rice fields presented morphological abnormalities in limbs, gonadal morphological alterations, and histological hepatic injuries. In *L. limellum* altered spermatogenesis was recorded compared to individuals of Ref 1.

For the second purpose, the Lethal concentration 50 (LC50) was calculated after the acute exposure for 96 h at different concentrations of 2,4-D Amina Zamba® (350, 700, 1400 and 2400 mg/l). The sub-lethal effects were evaluated after chronic exposure to four concentrations corresponding to 12.5, 25, 50 and 75% of the LC5096h and control (43.7, 87.5, 175 and 262.5 mg/l

2,4-D). The different biological responses analyzed were: survival, growth (Weight (We), total length (TL), snout-vent length (SVL)) and development (time to reach the 38 and 42 stages and metamorphosis), abnormalities in larval morphology and histological abnormalities in liver and gonads in metamorphic individuals. The LCs50 for 2,4-D Amina Zamba® at 48, 72 and 96 h were 1040.2, 754.2 and 360 mg/l, respectively. The chronic exposure to the herbicide altered long-term survival, caused larval morphology abnormalities being the oral and intestinal disc the most frequent malformation at the highest concentrations. The growth (We, TL and, SVL) of the tadpoles did not show significant differences between treatments ($P > 0.05$). Tadpoles exposed to 2,4-D showed an acceleration in development, reaching the 38 and 42 stages and metamorphosis significantly before controls. A significant increase in the number of MM was observed in the hepatic tissue of tadpoles exposed to 87.5, 175 and 262.5 mg/l of 2,4-D compared to the control ($P < 0.05$). In addition, hepatocyte vacuolization, enlargement of sinusoid and blood vessel dilation were observed in treated tadpoles. No histological alteration was observed in *P. albonotatus* testes of tadpoles exposed to the herbicide. By contrast, the ovaries of individuals treated with the highest concentrations (175, 262.5 mg/l) of 2,4-D Amina Zamba® showed a delay in ovarian development compared to control and lower concentrations.

The 2,4-D herbicide formulation had a low acute lethal effect on tadpoles of *P. albonotatus*, a species for which there was no evidence on the toxic effects of acute and chronic exposure to this agrochemical. Based on the results of the laboratory-scale bioassays, severe morphological abnormalities, acceleration in morphological development time, delayed ovarian development, and hepatic melanomacrophage proliferation before exposure to high concentrations of this herbicide were recorded. These biological markers should be evaluated in future studies to understand the mechanisms that underlie these effects.

Finally, the hypotheses raised in chapter one have been sustained with the result obtained here:

The agrochemicals used in rice crops produced alterations in gonadal morphology and histology in adult anuran amphibians and caused histopathologies after chronic exposures in *L. limellum* and *R. bergi* adults.

The commercial formulation 2,4-D Amina Zamba® altered the development, morphology and gonadal histology of *P. albonotatus* tadpoles.

Chronic exposure to commercial formulation 2,4-D Amina Zamba® produced histopathological alterations in hepatic tissues of *P. albonotatus* tadpoles.

The data obtained regarding the effects of the agricultural activities and the applications of pesticides provide evidence of the ecotoxicological risk that has been exposed amphibians in rice crops from Santa Fe and Chaco Provinces.

Keywords: Amphibians, Agroecosystems, agrochemicals, histology, melanomacrophages, gonads, liver.

CAPÍTULO I

“Introducción General”

1. Capítulo I: Introducción general

1.1 Los Anfibios y su uso como organismos modelo en Ecotoxicología

Los anfibios actuales comprenden alrededor de 8030 especies (AmphibiaWeb 2019). En la clase Amphibia, se incluyen los Anuros (Anura), con 7087 especies; Caudata (731 sp) y Gymnophiona (212 sp) (AmphibiaWeb 2019). Según Vaira et al. (2018), Argentina alberga la décima fauna más grande de anfibios, considerando los 40 países incluidos en la región Neotropical. En nuestro país existen 168 especies de anuros, y solo 4 especies de gimnofiones (cecilias) (AmphibiaWeb 2019).

Los anfibios son animales ectotermos, poseen la piel altamente permeable (Pough et al. 2004; Croteau et al. 2008; Knutson et al. 2004) y cumplen variados roles en los ecosistemas tanto acuáticos como terrestres. Estos vertebrados son fundamentales en la red trófica siendo presas de culebras y otras serpientes, aves, y, en su fase adulta, son insectívoros, siendo reconocidos como controladores biológicos de plagas (Blaustein y Kiesecker 2002; Attademo et al. 2005). Una de las causas principales de su vulnerabilidad es que poseen un ciclo de vida complejo que ya que habitan en dos medios diferentes: terrestre y acuático (Stuart et al. 2004). Por lo tanto, en cualquier momento de su ciclo vital, estos organismos presentan una elevada sensibilidad a agentes fisicoquímicos que pueden afectar su homeostasis y normal desarrollo, ya sea durante sus fases embrionarias, larvales y/o en la vida adulta (Boyer y Grue 1995; Herkovits y Pérez-Coll 2003).

Al considerar la importancia de los anfibios en los ecosistemas, el declive de sus poblaciones puede tener consecuencias a gran escala a través de alteraciones en las redes alimentarias o el propio equilibrio de los ecosistemas. Las áreas agrícolas se consideran uno de sus hábitats naturales, a pesar de estar expuestos a pesticidas dentro de ellas (Fig. 1.1 A-D). Según Pyron (2018), hay ciertos linajes de anuros que poseen una fuerte afinidad por hábitats agrícolas, como el género asiático *Fejervarya* (Dicroglossidae) y el género neotropical *Dendropsophus* (Hylidae). Además, muchas especies se reproducen y sus larvas se desarrollan en primavera y verano, coincidiendo con

la aplicación de los pesticidas y fertilizantes (Lorenzatti et al. 2004; Provete et al. 2011). Esta situación realza la vulnerabilidad de estos vertebrados ante la presencia de cualquier sustancia tóxica en el ambiente.

Los contaminantes pueden afectar directamente a los anuros, ya que en su etapa larval viven en los cuerpos de agua de zonas agrícolas, y los adultos pueden estar expuestos directamente o *in situ*, de forma aguda o crónica a los compuestos utilizados en las actividades agroindustriales. O indirectamente, a través de los ítems presas que estos consumen, y que a su vez podrían afectar a los posibles predadores en los que puede ocurrir la bioconcentración de sustancias químicas (Gutiérrez 2007).

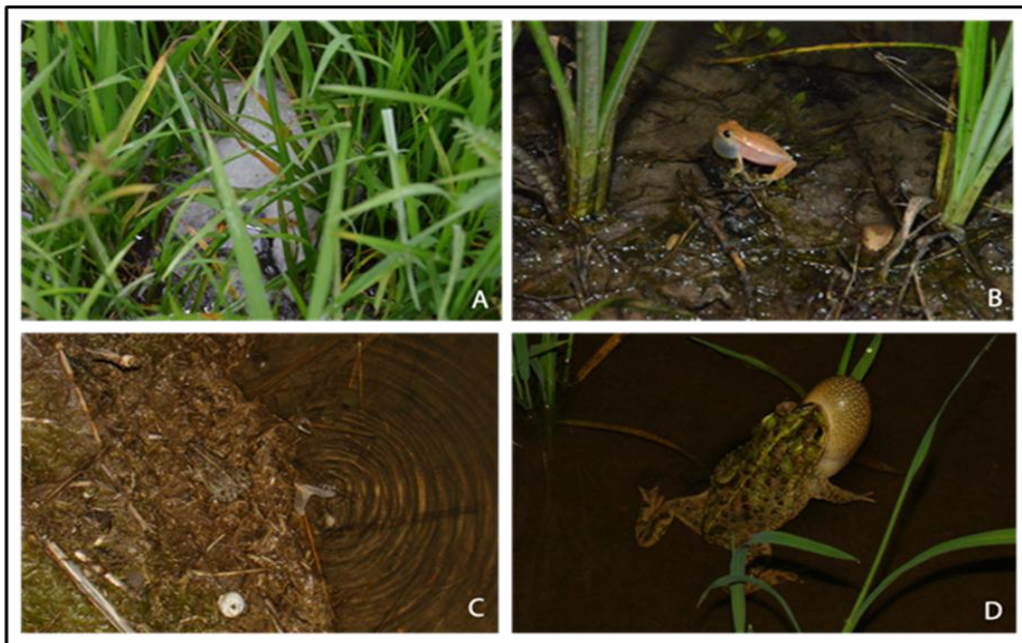


Figura 1.1 Actividad de anuros en arrozceras en la provincia de Santa Fe. Nidos de espuma de *Leptodactylus latrans* (Leptodactylidae) (A); *Dendropsophus nanus* (Hylidae) vocalizando (B); *Rhinella bergi* (Bufonidae) alimentándose (C); *Rhinella fernandezae* (Bufonidae) vocalizando (D). Fotos: Peltzer P.

1.2 Declinación de Anfibios: causas

Las poblaciones de anfibios están siendo altamente diezmadas y muchas de ellas han llegado a extinguirse en las últimas décadas (Stuart et al.

2004). A partir de la década del '80, los herpetólogos de todo el mundo comenzaron a alarmarse y advertir de esta situación en congresos, reuniones y publicaciones científicas (Wake 1991; Stebbins y Cohen 1995; Pounds et al. 1997; Lips et al. 1998,1999). Cabe destacar que la problemática que involucra a los anfibios es de mayor gravedad que lo registrado para especies de mamíferos o aves (BirdLife International 2004). La Lista Roja de especies amenazadas provistas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) muestra que hacia el año 2019 un total de 2200 especies se encontrarán bajo algún grado de amenaza, lo que implica casi un tercio de la diversidad global de anfibios conocida (IUCN 2019). Y esta cifra puede ser mucho más extensa, si son consideradas las especies con datos insuficientes (Vaira et al. 2018; IUCN 2019). Entre estas especies, 632 se encuentran Vulnerables, 924 en Peligro de Extinción, y 597 en Peligro Crítico de Extinción (IUCN 2019). Treinta y cuatro especies de anfibios se han extinto desde 1500, y 9 de esas extinciones han ocurrido desde 1980 (Stuart et al. 2004). Este fenómeno es recurrente en varias regiones de nuestro planeta (Campbell 1999; Carrier y Beebee 2003; Lips et al. 2004; Barrionuevo y Ponssa 2008). Muchos de los casos de extinciones más drásticas, han ocurrido en varios países de Latino América (Pounds y Crump 1994; Lips et al. 2004, 2006).

Diversos son los factores propuestos como causantes de este fenómeno de declinación, ya sean aislados o actuando sinérgicamente (Collins y Storfer 2003; Davidson y Knapp 2007; Hussain y Pandit 2012; Heatwole 2013; Catenazzi 2015). Collins y Storfer (2003) reconocen dos grupos de hipótesis o causas que operarían en el fenómeno mundial de declinación de los anfibios. Las hipótesis del primer grupo se cree que pudieron afectar a las poblaciones desde hace más de 100 años, hasta la actualidad. Entre ellas, se incluyen la invasión de especies exóticas, la sobreexplotación, y los cambios en el uso de la tierra (fragmentación y pérdidas de hábitats). En el segundo grupo se encuentran aquellas menos conocidas y que pudieron haber surgido en los últimos 30 años: cambio climático, contaminantes químicos en el ambiente (xenobióticos), y enfermedades infecciosas emergentes.

La existencia de especies de anfibios invasoras o exóticas o también llamadas “Aliens” son consideradas una de las amenazas a este grupo de animales (Kats y Ferrer 2003; Capdevila-Argüelles et al. 2013). Las evidencias están bien documentadas en la literatura (Measey et al. 2012, 2016; Kraus 2015). Su importancia radica en que la presencia de estas especies puede causar predación (Moyle 1973; Kiesecker y Blaustein 1997; Adams 1999); competencia (Kats y Ferrer 2003) y/o llegada de patógenos (Knapp et al. 2001; Blaustein y Kiesecker 2002) que pueden afectar a las poblaciones locales de anfibios. La rana toro (*Lithobates catesbeianus*), nativa de Norte América, ha sido introducida en más de 40 países para consumo humano. Algunas poblaciones, se han llegado a establecer en la naturaleza a raíz de escapes accidentales, y esto puede ser potencial causa de contagio de enfermedades (Gray et al. 2009; Miaud et al. 2016), competencia por el hábitat y recursos con las especies nativas (Snow y Witmer 2010). También existen evidencias de los efectos de las especies invasoras de peces sobre anfibios (Bradford 1989; Bradford et al. 1993, 1998).

Según datos propuestos por Stuart et al. (2004) y Mann et al (2009) la pérdida del hábitat y la contaminación, son las principales amenazas que sufren las poblaciones de anfibios. (Fig. 1.2).

La pérdida del hábitat o fragmentación del mismo que ocurre debido a la expansión de las actividades agroindustriales, se consideran como una de las actividades antropogénicas que más afectan a las poblaciones de anfibios (Blaustein y Wake 1995; Gallant et al. 2007; Mann et al. 2009).

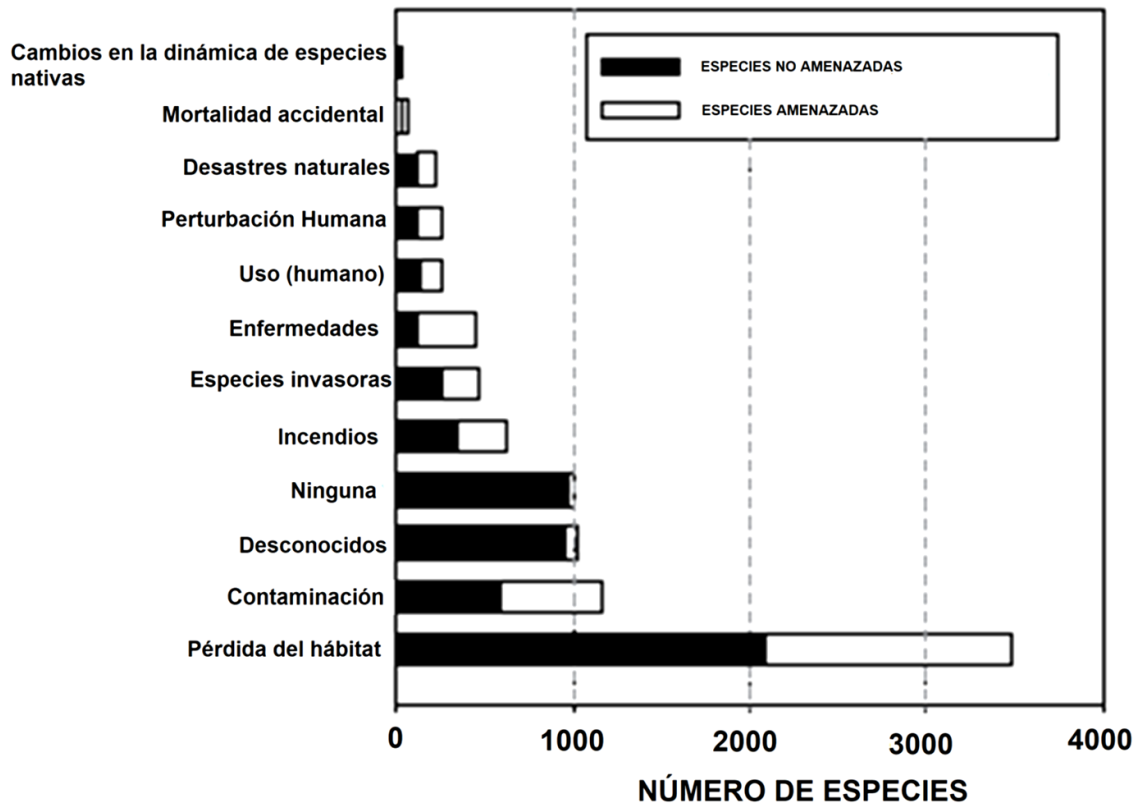


Figura 1.2 Causas y número de especies amenazadas. Imagen tomada de Mann et al. (2009) con datos de IUCN (http://www.iucnredlist.org/amphibians/major_threats).

Las principales causas de la fragmentación son la expansión de metrópolis urbanas e infraestructuras viales, el avance de las fronteras y prácticas agrícolas sobre sitios naturales, la deforestación masiva y tala rasa, los procesos de industrialización, el pastoreo, la ganadería extensiva y el represamiento de cuencas fluviales, entre otros (Burel y Baudry 2002). Existe suficiente evidencia que relaciona este fenómeno, con la disminución en abundancia, distribución y viabilidad de especies de anuros (Vershinin 1995; Bishop et al. 1999; Hazell et al. 2001; Knutson et al. 2004; Peltzer et al. 2006; Piha 2006).

Se cree que la pérdida de hábitats naturales afecta al 60 % de los anfibios (Vié et al. 2009). Diversos son los aspectos que convierten a estos vertebrados, en especies altamente susceptibles a las modificaciones o

perturbaciones de su hábitat (Beebee 1997; Alford y Richards 1999). Debido a sus características ecofisiológicas y su ciclo de vida complejo, estos vertebrados tienen demandas de hábitat múltiples y variadas. Muchas especies requieren de microhábitats específicos con condiciones apropiadas de humedad, temperatura, pH, refugios y recursos alimentarios (Langone 2017), además de poseer limitada capacidad de dispersión “home range” y alta fidelidad a un determinado lugar (Peltzer 2006)

Las actividades agrícolas utilizan una gran proporción del suelo en comparación a otras actividades antrópicas (Devine y Furlong 2007) y contribuyen al fenómeno de pérdida o fragmentación de hábitat en diferentes medidas, y por lo tanto afectan a las poblaciones de anfibios en diferentes grados (Peltzer et al. 2006; Gallant et al. 2007).

Los productos agroquímicos utilizados en la vasta variedad de cultivos de nuestro país hace unos años están recibiendo creciente atención como uno de los causantes del declive de los anfibios (Relyea y Mills 2001; Polo-Cavia et al. 2016). Las prácticas agrícolas cambian continuamente, y en particular los productos químicos (pesticidas, fertilizantes, fungicidas, herbicidas) son aplicados en una amplia variedad de formas y/o combinados, y en grandes cantidades, por lo que representan un grupo importante de contaminantes presentes en el ambiente (Mann et al. 2009).

Los químicos derivados tanto de la agricultura, como la industria y otras actividades antrópicas han tomado una relevancia mayor como causa potencial de la declinación, actuando tanto en forma aislada como conjunta entre ellos y otros posibles factores estresantes (Aronzon et al. 2013). Sin embargo, existe poca información de los efectos a nivel población de anfibios en condiciones naturales (Alford y Richards 1999).

Carey y Bryant (1995) resumen y clasifican el rango de efectos que puede tener la presencia de contaminantes ambientales sobre el crecimiento y desarrollo de los anfibios anuros:

a) Concentraciones subletales pueden causar la muerte indirectamente ya que aumenta la susceptibilidad de huevos o larvas a enfermedades causadas por organismos patógenos.

- b) Concentraciones subletales pueden afectar la supervivencia ya que retardan el crecimiento y desarrollo, y por lo tanto la metamorfosis se altera en tiempo y forma.
- c) Concentraciones subletales pueden inhibir la habilidad de las larvas de evitar predadores.
- d) Los compuestos tóxicos pueden tener función estrogénica, antiestrogénica, disruptor tiroideo, androgénico o antiandrogénico, que pueden alterar o inhibir totalmente la reproducción por alterar el desarrollo del proceso.
- e) Y concentraciones letales del tóxico pueden causar directamente la mortalidad de huevos, larvas o individuos metamórficos.

El cambio climático es reconocido como otra gran amenaza para la biodiversidad a nivel global que actúa en combinación a otros estresores. Urban (2015) postula que el riesgo de extinción debido a esta causa es mayor en América del Sur, Australia y Nueva Zelanda y que este riesgo no es variable de acuerdo al grupo taxonómico del que se trate. Los animales ectotermos, tienen una limitada capacidad de regulación corporal ya que la misma está estrechamente relacionada con la ambiental como es el caso de los anfibios. Las temperaturas y precipitaciones ejercen un papel importante en la regulación de la actividad de los anuros (Toledo et al. 2003; Conte y Machado 2005; Martínez Baños et al. 2011). El cambio climático puede afectar la supervivencia, el crecimiento, la reproducción y la capacidad de dispersión; alterar los hábitats, influir en la disponibilidad de alimentos, la relación depredador-presa y las interacciones competitivas, entre otros (Li et al. 2013).

Las enfermedades infecciosas emergentes en anfibios aparecen cuando el sistema inmunitario de las especies se ve afectado o comprometido debido a diferentes causas (Crawshaw 1992, 1997). Existen evidencias que sugieren que la Quitridiomycosis, una enfermedad causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, afecta a las poblaciones de anfibios en todo el mundo (Berger et al. 1998; Skerratt et al. 2007; Van Rooij et al. 2015). Esta infección fúngica se asoció con la declinación de las especies de anuros en Australia, Centro y Norte América (Lips 1999; Young et al. 2001; Lips et al. 2003). En Argentina, existen registros en ejemplares de *Telmatobius pisanoi* y

Telmatobius atacamensis en Tucumán y Salta, respectivamente (Barrionuevo y Mangione 2006); *Leptodactylus latrans* en Buenos Aires (Herrera et al. 2005); *Boana pulchella* colectadas en Santa Fe (Ghirardi et al. 2014), entre otros registros para varias provincias de nuestro país (Ghirardi 2011; Arellano 2012). Otra enfermedad que afecta a los anfibios es la Ranaviriosis, que es causada por un virus de la familia Iridioviridae (Duffus et al. 2015). Algunas investigaciones sugieren que los ranavirus son una amenaza especialmente alta para las especies con poblaciones pequeñas o en peligro de extinción (Earl et al. 2016).

1.3 Nuevas amenazas

Una gran variedad de productos farmacéuticos (PF), disruptores endócrinos (DEs) y sus metabolitos son comúnmente encontrados en ambientes acuáticos (Kolpin et al. 2002; La Farré et al. 2008; Nebot et al. 2015). Recientemente, el registro de estos compuestos, también denominados contaminantes emergentes (CE), en matrices ambientales, se han convertido en un tópico de creciente interés en investigaciones ambientales actuales (López Pacheco et al. 2019). Los PF son utilizados en grandes cantidades y una importante fracción de los mismos, luego de su ingesta, se elimina vía heces, orina (Zhang et al. 2014, 2015) ya sea de humanos o animales. La importancia de los mismos radica en que muchos de ellos y sus metabolitos son altamente persistentes en el ambiente (Kümmerer 2010).

En general, las concentraciones de fármacos detectados en ambientes acuáticos son relativamente bajas (en el rango de ng/L o µg/L), pero en ciertos países como India y China, se han registrado concentraciones relativamente altas de antibióticos y otras drogas tales como antiácidos, antidepresivos, entre otros, en ambientes acuáticos (Larsson et al. 2007; Carlsson et al. 2009; Gogoi et al. 2018). El uso de remedios de uso veterinarios en ganadería intensiva y/o criaderos de pollos, cerdos (feedlots) constituye la fuente principal de llegada de estos medicamentos a ríos o cuerpos de agua (Zhang et al. 2014). El

ingreso de PF al ambiente acuático, a partir de efluentes de aguas residuales, lixiviación o escorrentía de suelos agrícolas abonados con estiércol, aun en concentraciones bajas, pueden acarrear riesgo ecológico, a mediano o largo plazo para organismos acuáticos y terrestres (Klavarioti et al. 2009; Rico et al. 2014; Curi et al. 2017).

En los últimos años, se han registrado efectos adversos en organismos acuáticos (peces, cladóceros, crustáceos, algas) que se encuentran continua y crónicamente expuestos a estos compuestos. Por ejemplo, la exposición crónica a ciertos PF provoca cambios en proporción de sexos y fecundidad de *Daphnia magna* (Flaherty y Dodson 2005). Así también, 5-6 ng/L de 17 α -etinilestradiol, causa feminización en machos de *Pimephales promelas*, evidenciándose individuos intersexo, y alteraciones en la ovogénesis en hembras (Kidd et al. 2007). Mimeault et al. (2005) demostraron la bioacumulación de un regulador lipídico (gemfibrozil) en *Carassius auratus* y reducción de niveles plasmáticos de testosterona.

En anfibios existen pocas investigaciones al respecto. Se ha investigado el efecto de la exposición a diluciones de efluentes provenientes de una planta de tratamiento en *Xenopus laevis* y encontraron reducción del crecimiento (longitud y peso corporal) en concentraciones menores a 2% de efluente (Carlsson et al. 2009). Además, Peltzer et al. (2017) demostraron que concentraciones de 10 μ g/L o mayores de Ciprofloxacina y Enrofloxacin produce ecotoxicidad y efectos en desarrollo, crecimiento y altera enzimas de estrés oxidativo (GST y CAT) en larvas de *Rhinella arenarum*. La exposición a diclofenac produce teratogénesis, malformaciones en cola, notocorda, edemas, e inhibición del crecimiento en *Xenopus laevis* y *Litobates catesbeianus* (Chae et al. 2015; Cardoso-Vera et al. 2017). Recientemente, Peltzer et al. (2019), describieron similares anomalías morfológicas en renacuajos de *Physalaemus albonotatus* y *Trachycephalus typhoni* afectando el condrocraáneo y esqueleto hiobranquial, vísceras, y organogénesis (ej. corazón). Estos autores, concluyeron además, luego de evaluar la actividad de la enzima acetilcolinesterasa y la actividad natatoria, que dicho analgésico

produce efecto neurotóxico. En otro trabajo, se ha demostrado que las larvas de *Rana pipiens* expuestas a etinilestradiol desde la mitad de la metamorfosis tuvieron un retraso en el desarrollo de dos semanas en alcanzar el climax metamórfico. Asimismo, en las larvas no expuestas y luego de inspecciones gonadales hubo una baja proporción de individuos intesersexos, mientras que en aquellas expuestas mostraron una alta proporción de hembras en comparación a los controles (Hogan et al. 2008).

1.4 Uso de Anuros (Amphibia) como organismos modelo

En el contexto ecotoxicológico, los anuros han sido utilizados como indicadores sensibles de cambios en los ecosistemas (Fairweather y Napier 1998; Jansen y Healey 2003) y del estado de salud del ambiente (Sparling et al. 2001; Blaustein y Kiesecker 2002; Blaustein et al. 2003). Los anuros pueden ser utilizados para evaluar la contaminación de distinto origen, y se utilizan como organismos modelo por su fácil crianza y aclimatación en ensayos a escala de laboratorio y/o mesocosmos (Herkovits y Pérez Coll 2003; Boone y James 2005; Peltzer et al. 2013; Curi et al. 2017). Los experimentos en condiciones de laboratorio permiten evaluar de forma aislada los efectos de un compuesto tóxico particular, mientras que experimentos a escala de mesocosmos o a campo están sujetos a condiciones ambientales y son estructuralmente más complejos, permitiendo evaluar efectos en poblaciones naturales a una escala ecosistémica (Skelly y Kiesecker 2001) (Fig. 1.3).

Numerosos trabajos científicos abordaron el efecto de los productos agroquímicos utilizando diferentes biomarcadores de exposición, tanto en larvas como adultos de anuros en nuestro país y a escala global (e.g. Cheek et al. 1999; Mann y Bidwell 1999; Carr et al. 2003; Lajmanovich et al. 2003 a,b, 2009, 2010, 2011, 2012, 2015; Davidson 2004; Relyea 2005 a,b; Casco et al. 2006; Attademo et al. 2007, 2010, 2011, 2015; Boone 2008; Peltzer et al. 2008, 2013; Sparling y Fellers 2009; Brodeur et al. 2009, 2013; Mann et al. 2009; Aronzon et al. 2011, 2013; Lawrence y Isioma 2010; McMahon et al. 2011; Weir et al. 2012; Figueredo y De Jesus Rodriguez 2014; Svartz 2014; Pérez

Iglesias et al. 2014, 2015, 2016, 2019; Pereira de Paiva et al. 2017; Bach et al. 2018; Freitas et al. 2019; Lajmanovich et al. 2019; etc).

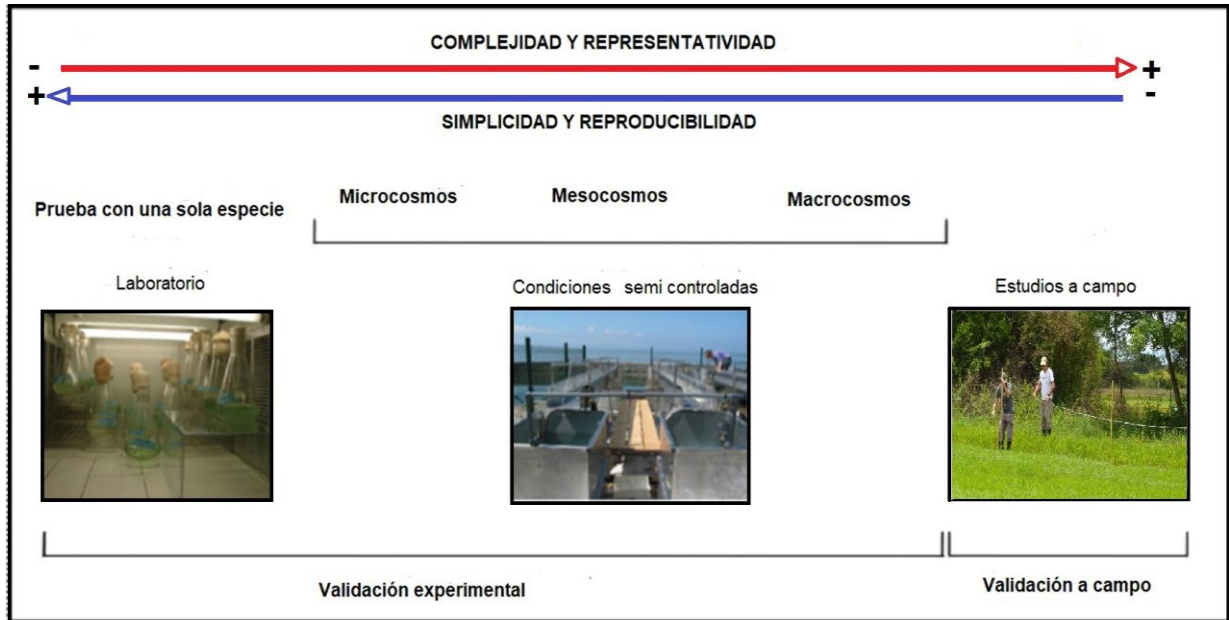


Figura 1.3 Niveles de complejidad biológica en los métodos usados para estudios ecotoxicológicos (Tomado de Villeneuve et al. 2011, basado en Caquet et al. 1996).

1.5 Objetivos de la tesis

1.5.1 Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis fue abordar mediante un estudio ecotoxicológico los efectos de los cultivos de arroz y de uno de los herbicidas tradicionales utilizados en su producción, sobre parámetros morfo-histológicos en órganos blanco en anfibios anuros.

1.5.2 Objetivos particulares

Objetivo 1 (O1): EVALUAR LA MORFO-HISTOLOGÍA DE GÓNADAS E HÍGADOS EN ESPECIES DE ANUROS ADULTOS QUE CO-OCURREN EN CULTIVOS DE ARROZ A ESCALA AGROINDUSTRIAL.

O1a. Analizar y comparar la morfo-histología gonadal en machos de dos especies: *Rhinella bergi* y *Lysapsus limellum* en arrozales y sitios no contaminados.

O1b. Analizar mediante el uso de la histología hepática el daño histopatológico que produce la exposición a productos agroquímicos en los anuros en comparación a los de los sitios sin cultivos.

Hipótesis (H) y predicciones (P)

H_{1.1}: Los productos agroquímicos utilizados en los cultivos de arroz producen alteraciones en la morfo-histología gonadal en anfibios anuros adultos.

P_{1.1}: Se espera encontrar alteraciones en la morfología y la histología testicular (proporción de tipos celulares, organización de cistos de células germinales, pigmentación testicular) en machos de anuros que habitan arrozceras en comparación a sitios de referencias.

H_{1.2}: Los productos agroquímicos utilizados en el cultivo de arroz a escala agroindustrial causan histopatologías hepáticas por exposición crónica a diferentes agroquímicos.

P_{1.2}: Se espera encontrar alteraciones en la histología hepática (Ej. vacuolización de hepatocitos, hipervascularización, agrandamiento de venas, etc) y proliferación de melanomacrófagos en los organismos que habitan los sitios agrícolas.

Objetivo 2 (O2): EVALUAR LOS EFECTOS LETALES Y SUBLETALES DE UN HERBICIDA CON FORMULACION 2,4-D, COMUNMENTE USADO EN ARROZALES, EN RENACUAJOS DE *Physalaemus albonotatus* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE).

O2a: Evaluar la toxicidad aguda de un formulado comercial 2,4-D Amina Zamba® en renacuajos de *Physalaemus albonotatus* bajo condiciones de laboratorio.

O2b: Analizar los efectos subletales sobre desarrollo, morfología larval, y morfología e histología gonadal de *P. albonotatus*.

O2c: Evaluar mediante histología hepática el daño histopatológico que produce este formulado comercial en los renacuajos de *P. albonotatus* en comparación a los del control.

Hipótesis y predicciones (P)

H_{2.1}: El formulado comercial 2,4-D Amina Zamba® altera el desarrollo, morfología e histología gonadal de renacuajos de *P. albonotatus*.

P_{2.1}: Se espera encontrar alteraciones en desarrollo (tiempo en alcanzar el estadio 38-39, estadio 42 y metamorfosis), morfología (anormalidades morfológicas), e histología gonadal (proporción de tipos celulares, organización de cistos de células germinales).

H_{2.2}: La exposición crónica a concentraciones subletales del formulado comercial 2,4-D Amina Zamba® produce alteraciones histopatológicas en el tejido hepático.

P_{2.2}: Se espera encontrar alteraciones en la histología hepática (Ej. vacuolización de hepatocitos, hipervascularización, agrandamiento de venas, etc) y proliferación de melanomacrófagos en los organismos expuestos.

CAPÍTULO II

“Anormalidades en la morfología e histología gonadal y hepática en anuros adultos de cultivos de arroz”

2. Capítulo II: “Anormalidades en la morfología e histología gonadal y hepática en anuros adultos de cultivos de arroz”.

2.1 Introducción

Los ecosistemas agrícolas son sistemas transformados por el hombre con fines productivos (Sans 2007) y representan cerca del 40 % de la superficie terrestre mundial (Tilman 1999; Grupo Banco Mundial 2019, Fig. 2.1 A). Entre los países de América del Sur, Argentina hasta el año 2016 contaba con más de 50 % de su superficie terrestre con áreas cultivadas, siendo soja, maíz y arroz los principales cultivos (Butinof et al. 2014) (Fig. 2.1 B).

El uso del suelo de manera intensiva está modificando los ecosistemas y sus servicios ecosistémicos y provocando pérdida de hábitats silvestres, escurrimiento de nutrientes, sedimentación de vías fluviales, emisión de gases de efecto invernadero, contaminación por pesticidas en humanos y especies no blanco (Foley et al. 2005). La expansión de la frontera agrícola produjo un incremento en la tasa de desmontes y reemplazo de sistemas naturales por áreas extensas de cultivos (Aizen et al. 2009). En estos fragmentos forestales rodeados de agricultura son más frecuentes las extinciones locales y declinaciones poblacionales como consecuencia de la disminución del tamaño de la población y reducción de la colonización y las tasas de inmigración que en fragmentos rodeados de menor actividad agrícola y de deforestación (Fahrig 2003; Ewers y Didham 2006). También se registran en estos ambientes cambios en parámetros poblacionales como abundancia, dispersión, éxito reproductivo y diversidad genética (Fahrig 2003).

Argentina es uno de los principales países productores de Latinoamérica, con una exportación de cereales y oleaginosas que constituye uno de los ejes principales de la economía nacional (Butinof et al. 2014).

El cultivo de arroz (CA) es un recurso alimenticio importante ocupando el 11 % de tierra cultivable de todo el mundo (Kole et al. 2010). En Latino América se produce el 4.1 % de toda la producción mundial (FAO 2011). Según la Asociación Correntina de Plantadores de Arroz (ACPA), en Argentina, la principal zona productora de arroz se localiza en las provincias de Corrientes,

Entre Ríos y Santa Fé (Fig. 2.2). Solamente el 27% de la producción es comercializado en Argentina, el restante 73% es exportado (Moreno 2017). En nuestro país estos cultivos se llevan a cabo desde los meses de Septiembre/Octubre, momento de la siembra, y la cosecha a veces se extiende hasta el mes de Abril (De Bernardi 2017). En la campaña 2018/19 se ha alcanzado más de 1,1 millones de toneladas de producción con 190.800 hectáreas sembradas, abarcando aproximadamente el 90% de la producción nacional (SIIA 2019).

Para una mejora en el rendimiento y calidad de la producción se utilizan una serie de productos para tratamientos pre y posemergencia (Parsons et al. 2016). En distintas partes del mundo los principales herbicidas utilizados para este cultivo son bentazón, molinate, propanil, clomazone, 2,4-D Amina, glifosato (Quayle et al. 2006; Terrado, 2007). En Brasil los más utilizados son clomazone, propanil y quinclorac (Marchesan et al. 2007). Entre los insecticidas más utilizados globalmente se pueden mencionar dimetoato, paration, imidacloprid, carbofuran, entre otros (Parsons et al. 2016).

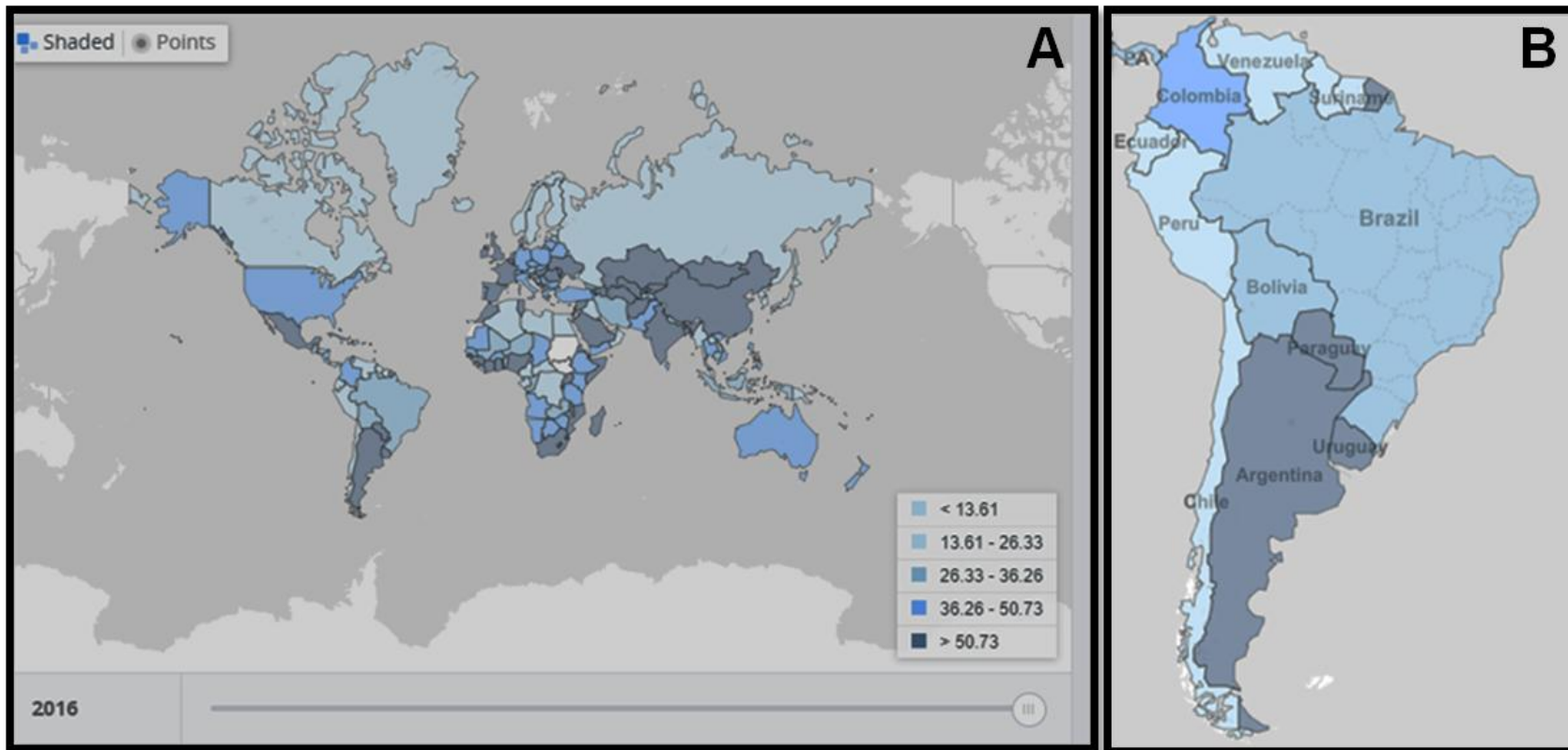


Fig. 2.1 Porcentajes de tierra con áreas cultivadas hasta el año 2016. A) A nivel mundial; B) Detalle de América del Sur. Imagen y datos tomados de <https://datos.bancomundial.org/indicador/AG.LND.AGRI.ZS?end=2017&start=2017&type=shaded&view=bar>.



Figura 2.2 Porcentajes de superficie sembrada a nivel nacional. Fuente: http://www.acpaarrozcorrientes.org.ar/El_arroz_estadisticas/Estadistica_del_Arroz_en_Argentina.pdf

En la zona productora de Argentina se utilizan una gran variedad de compuestos agroquímicos. Y en muchas zonas, es la única herramienta utilizada por los productores para contrarrestar el ataque de insectos y enfermedades y aumentar la fertilidad del suelo (Vizgarra 2018). Medina et al. (2019) menciona como los plaguicidas más utilizados en las dos últimas temporadas de cosecha en la provincia de Entre Ríos a los fungicidas penconazol, kresoxim metil, ciproconazol, epoxiconazol, azoxistrobina y el insecticida deltametrina. Para el manejo general de los cultivos se utilizan los herbicidas glifosato (antes de la siembra) o bentazón, clomazone, 2,4-D, la aplicación del organofosforado clorpirifos y el piretroide Lamda cialotrina para el control de artrópodos durante la floración, entre otros compuestos (Attademo et al. 2015, 2018; Rujana et al. 2015). Vizgarra (2018) menciona en su estudio realizado en las localidades productoras de La Leonesa y Las Palmas (Chaco), que entre los agroquímicos identificados se encuentran glifosato, endosulfán metamidofos, picloram y clorpirifós.

Estos contaminantes pueden ingresar al ambiente por distintas vías: luego de aplicaciones directas, por escorrentía desde cultivos, deposición atmosférica, entre otras (Gilliom et al. 2007; Egea-Serrano et al. 2012). Las reservas de aguas dulces superficiales son vulnerables a la contaminación y al deterioro, ya que el ingreso de contaminantes de diferentes fuentes altera la calidad del agua (Días y Contreras, 2013). Por ejemplo se ha registrado glifosato (Ronco et al. 2016) e insecticidas organoclorados (Lenardon y Enrique 1998) en muestras del Río Paraná. Además en el 80% de las muestras de agua proveniente de precipitaciones en la región pampeana también se ha registrado glifosato y atrazina (Alonso et al. 2018).

La agricultura convencional que viene desarrollándose intensivamente desde 2006, representa una amenaza para estos vertebrados, de forma directa sobre la alteración, modificación y fragmentación de ambientes naturales para la supervivencia, refugio y reproducción de anuros (Peltzer et al. 2006; Firbank et al. 2008), y de forma indirecta por la contaminación por agroquímicos (herbicidas, insecticidas, fungicidas, fertilizantes) afectando la biología y ecología de las especies (Sparling et al. 2001; Davidson 2004; Pérez-Coll y Herkovits 2006; Attademo 2010; Hayes et al. 2010a; Lajmanovich et al. 2010; Sánchez 2011; Svartz 2014; Bach et al. 2018).

Entre los vertebrados, los anfibios constituyen un taxón particularmente afectado por la aplicación de muchos plaguicidas en los campos agrícolas, ya que éstos se acumulan en charcas temporarias y en general su concentración aumenta durante la primavera y el verano, coincidiendo con la época reproductiva y las etapas altamente susceptibles del ciclo de vida de estos organismos (Peltzer y Lajmanovich 2007; Mann et al. 2009).

Se han registrado en diversos trabajos la presencia de anfibios anuros asociados a paisajes agrícolas (Attademo et al. 2005, Duré et al. 2008; Knutson et al. 1999; Sánchez 2011; Attademo et al. 2018). Peltzer et al. (2006) han demostrado que la diversidad y composición de los anuros en paisajes agrícolas responde a distintas variables espaciales (área y profundidad de las charcas, composición de la vegetación circundante a cultivos, etc.), y por ello

es de importancia que se conserven los remanentes o parches de vegetación natural que se encuentran entre dichos ambientes. En relación a esto, Piatti et al. (2010) proponen que las especies generalistas o altamente resilientes podrán sobrevivir en los ambientes naturales transformados en cultivos, ya que son hábitats con baja heterogeneidad. Pyron (2018) menciona que hay especies que se ajustan ecológicamente y presentan una alta ocurrencia en áreas agrícolas y existen otras, que al tener gran especificidad de microhábitats y preferencia climática, son las más afectadas. Bambaradeniya et al. (2004) consideran que la supervivencia en esas áreas va a depender de la tolerancia fisiológica y la capacidad de adaptarse a las modificaciones en su hábitat.

Con el transcurso de los años, se han incrementado los estudios ecotoxicológicos y toxicológicos que proporcionan evidencias concernientes a los efectos adversos de los agroquímicos (herbicidas e insecticidas) sobre el crecimiento, desarrollo, reproducción y comportamiento de los anfibios (Hayes et al. 2002, 2003, 2006 a,b, 2010 a,b; Lajmanovich et al. 2003a,b, 2010a, 2011; Lenkowski et al. 2008,2010; McDaniel et al. 2004,2008; Metts et al. 2012; Peltzer et al. 2008, 2013; Pérez-Iglesias et al. 2014, 2015, 2016, 2019; Relyea et al. 2005a, b, Lajmanovich et al. 2019, Sievers et al. 2019). Así como también las evidencias sobre los efectos que tienen las actividades agrícolas sobre el estado de salud de las especies que habitan dichos sitios (Peltzer et al. 2008; Piatti et al. 2010; Thammachoti et al. 2012, Babini et al. 2015).

Debido a que muchos plaguicidas se acumulan en sistemas acuáticos, pueden afectar negativamente los procesos reproductivos y por lo tanto constituyen un factor importante en la declinación global de los anfibios (Hayes et al. 2002; Tamschick et al. 2016). Se han identificado químicos que interfieren con el sistema endócrino imitando a las hormonas o bloqueando la acción de las mismas y que han sido implicados en la disfunción reproductiva y desarrollo anormal en varias especies (Sower et al. 2000). Un número creciente de estudios muestran que los disruptores endócrinos ambientales tienen un potencial para alterar el desarrollo reproductivo en anuros (Hayes et al. 2003; Sanchez et al. 2014), así como también en peces (Jobling et al. 2006), reptiles

(Guillette y Iguchi 2003; Khan y Law 2005), y otros vertebrados (Armenti et al. 2008).

En anuros, se han publicado numerosos trabajos que vinculan la exposición a agroquímicos con efectos tales como disgénesis en machos, presencia de gónadas intersexo, presencia de ovocitos testiculares, alteraciones morfológicas en gónadas (Sower et al. 2000; Tavera-Mendoza et al. 2002 a,b; Fort et al. 2004; Hayes et al. 2002, 2003, 2006 a,b; Edward et al. 2006; McCoy et al. 2008, 2017; McDaniel et al. 2008; Sanchez 2011; Sánchez et al. 2014). En cambio, hay estudios en condiciones de laboratorio o a campo en los que no encuentran relación entre la exposición a agroquímicos y la diferenciación sexual (porcentajes de machos y hembras, ocurrencia de intersexos, presencia de ovocitos testiculares) (Carr et al. 2003; Coady et al. 2004, 2005; Du Preez et al. 2008; Oka et al. 2008; Kloas et al., 2009).

Estos datos controversiales, realzan la necesidad de estudios que vinculen las prácticas agrícolas con alteraciones en la histoarquitectura de gónadas y sus efectos sobre la reproducción de anuros. Dada la declinación de este grupo de vertebrados, el análisis de los efectos del uso masivo de agroquímicos en los cultivos, y su influencia sobre algunos parámetros reproductivos resulta de suma importancia frente al actual escenario de expansión agrícola y los volúmenes cada vez mayores de plaguicidas utilizados en dichas actividades. Este tipo de investigaciones constituye una útil herramienta para evaluar el estado reproductivo de las poblaciones de anuros silvestres, y su respuesta ante el uso indiscriminado de agroquímicos en situaciones naturales.

Además de las gónadas, el hígado representa un órgano útil y comúnmente considerado en estudios ecotoxicológicos ya que es un órgano esencial para los procesos de detoxificación, ante la presencia de sustancias químicas extrañas o nocivas (Steinel y Bolnick 2017; Bach 2018). En relación a la función del hígado, algunos autores encuentran una correlación entre la abundancia de melanomacrófagos (MMs) en el parénquima hepático con la exposición a ciertos xenobióticos y otros contaminantes (Johnson et al. 2004;

Loumbourdis y Vogiatiz 2002; Agius y Roberts 2003; Bernabó et al. 2014; Cakici 2015; De Oliveira et al. 2016;). Estos efectos se observaron ante la presencia de ciertos herbicidas y plaguicidas en anuros adultos en condiciones controladas (Paunescu et al. 2010; Cakici 2015; De Oiveira et al. 2016; Pérez Iglesias et al. 2016; Curi et al. 2019).

2.1.1 Objetivos

O1a. Analizar y comparar la morfo-histología gonadal en machos de dos especies: *Rhinella bergi* y *Lysapsus limellum* en arrozales y sitios no contaminados.

O1b. Analizar mediante el uso de la histología hepática el daño histopatológico que produce la exposición a productos agroquímicos en los anuros en comparación a los de los sitios sin cultivos.

2.2 Metodología

2.2.1 Área de estudio

Se seleccionaron dos cultivos de arroz (CA 1, CA 2) con sus respectivos sitios de referencias (Ref 1, Ref 2). El primer cultivo de arroz (CA 1) se localizó en el departamento de San Javier, en el centro-este de la provincia de Santa Fe (30°05'13,56"S-59°53'19,98"O) (Fig. 2.3 A-B) y cuenta con una extensión de aproximadamente 120 hectáreas. En estudios previos realizados en ésta área cultivada, se han utilizado diversos biomarcadores (enzimáticos, sanguíneos e histológicos) para evaluar el impacto de los agroecosistemas sobre especies de anuros nativas de dicho sitio (Attademo et al. 2011; Attademo et al. 2015; Huespe et al. 2017). Además, se ha registrado la mortalidad de peces, y especies de anuros (*Lysapsus limellum*, *Leptodactylus chaquensis*, *Dendropsophus nanus*) durante visitas a dicho sitio luego de una aplicación del insecticida organoclorado clorpirifos (Lajmanovich et al. 2012).

El sitio Ref 1 corresponde a un área no cultivada, localizada en humedales asociados al río Paraná cercano a remanentes forestales en el departamento Garay (Santa Fe). El mismo está localizado a aproximadamente 50 km del otro sitio (31°10'21,1"S, 60°15'31,73"O) (Fig. 2.3 C-D).

De cada sitio (CA 1 y Ref 1) se tomaron muestras de agua para la determinación de parámetros físico-químicos y agroquímicos, y muestras de suelo para la determinación de agroquímicos (Ver ANEXO).

Dentro de la provincia de Santa Fe, los cultivos de arroz (*Oryza sativa*) están ampliamente extendidos por toda la región. Los bordes de campo son escasos y presentan elementos de vegetación nativa de la Eco-región Delta e Islas del Paraná y Eco-región del Espinal (Burkart et al. 1999). Esta área presenta una estación lluviosa que se extiende desde Octubre a Marzo y la estación seca desde Abril a Septiembre. Las temperaturas medias anuales oscilan entre 15-20°C (Apodaca et al. 2015).

El segundo cultivo de arroz (CA 2) se localizó en la localidad de Las Palmas, en el departamento Bermejo, en el noreste de la provincia de Chaco (27°5'35,45''S, 58°45'19,81''O) (Fig. 2.4 A-B). El sitio de referencia (Ref 2) se localizó en el departamento de Presidencia de la Plaza, Chaco (27°07'36,80''S, 59°36'7,39''O), a una distancia aproximada de 83.02 km del CA 2 (Fig. 2.4 C-D). Este sitio conserva ambientes con presencia de bosques nativos sin agricultura ni escorrentía directa de químicos agrícolas, pero aledaño a zonas con ganadería. La vegetación arbórea dominante consiste en quebracho colorado, quebracho blanco, espinillos, caranday, entre otros. Ambos sitios pertenecen a la Eco-región Chaco Húmedo, caracterizada por un clima subtropical cálido, con lluvias concentradas en verano (Burkart et al. 1999). La única actividad antrópica observada en dicho sitio corresponde a cría de ganado vacuno.

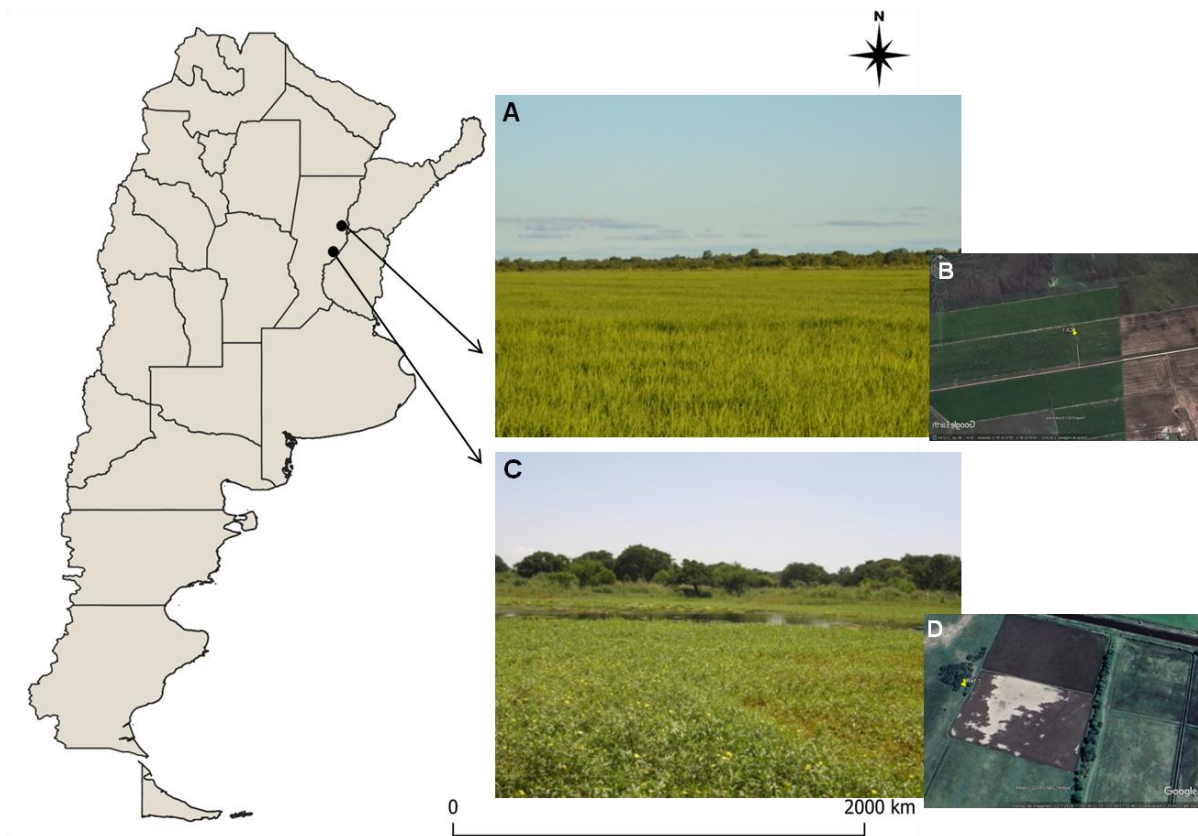


Figura 2.3 Sitios de muestreo en la provincia de Santa Fe (Argentina). Vista general (A) y satelital (B) del cultivo de arroz en el departamento de San Javier (CA 1); vista general (C) y satelital (D) del sitio de referencia (Ref 1) en el departamento Garay. Fotos: Curi, L.

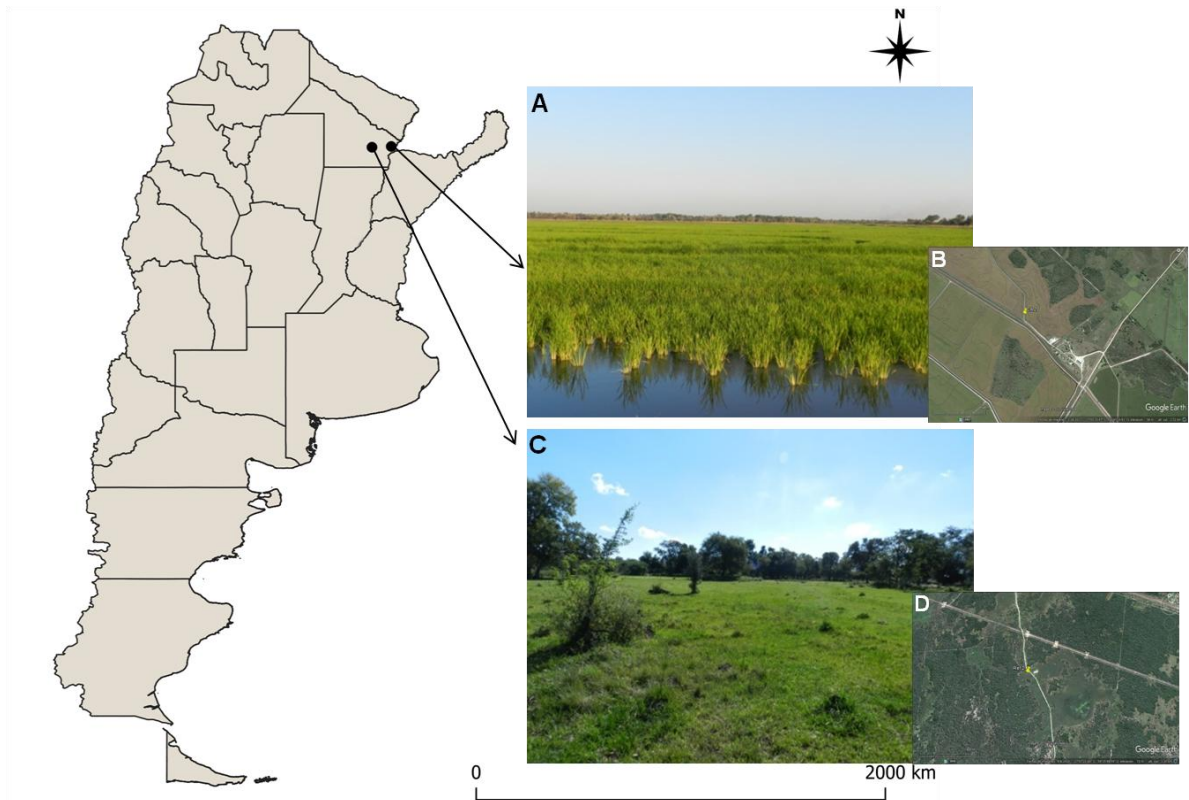


Figura 2.4 Sitios de muestreo en la provincia de Chaco (Argentina). Vista general (A) y satelital (B) del Cultivo de arroz tradicional en Las Palmas, departamento Bermejo (CA 2); vista general (C) y satelital (D) del sitio de referencia en el departamento Plaza (Ref 2). Fotos: Curi, L.

2.2.2 Especies seleccionadas

***Lysapsus limellum* (Cope, 1862)**

Es una especie categorizada como de “No Amenazada” (IUCN 2018; Vaira et al. 2012), también conocida como “rana nadadora chica” (Fig 2.5 A). Es común registrar su presencia en cultivos de arroz de la provincia de Santa fe y otras provincias de nuestro país (Duré et al. 2008). Esta especie puede alcanzar los 20 mm de longitud hocico cloaca (LHC). Con su cuerpo completamente adaptado a la vida acuática, habitan lagunas permanentes o semi-permanentes con abundante vegetación sumergida o flotante (Zaracho et al. 2011). En los cultivos de arroz se los encuentran entre la vegetación o sobre la misma, siempre en contacto con el agua (Duré et al. 2008; Attademo et al. 2015). En Argentina, esta especie está ampliamente distribuida por las regiones Chaqueña, Espinal y Paranaense. Se alimentan de dípteros, ortópteros, además de arácnidos y peces (Duré y Kehr 2001).

***Rhinella bergi* (Céspedes, 2000)**

Es una especie categorizada como “No Amenazada” (Vaira et al. 2012; IUCN 2018). También es conocida como “sapito granuloso chico” (Fig. 2.5 B). Se la seleccionó porque juveniles y adultos son observados en caminos internos sin pavimentar o bordes de los cultivos de arroz. Puede alcanzar los 50 mm de LHC, presentan hábitos terrestres, y se distribuyen por las regiones Chaqueña y Espinal en Argentina. Los machos vocalizan entre la vegetación, o apoyados en fondo de charcos con poca cantidad de agua. Son anuros insectívoros, principalmente se alimentan de formícidos y coleópteros (Duré y Kehr 2006).

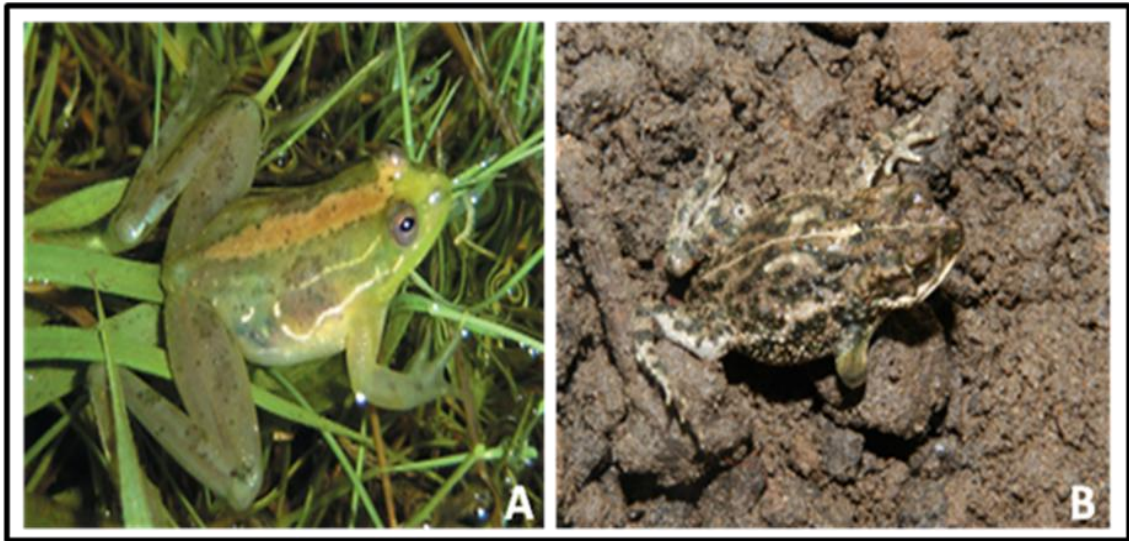


Figura 2.5 *Lysapsus limellum* (Anura: Hylidae) (A); *Rhinella bergi* (Anura: Bufonidae) (B). Foto: Curi, L.

2.2.3 Muestreo de anuros

Lysapsus limellum se muestreó en la provincia de Santa Fe, en CA 1 y Ref 1, y *Rhinella bergi* en la provincia de Chaco, en CA 2 y Ref 2. Los muestreos fueron realizados durante dos periodos anuales en la estación de verano (2015-2016; 2016-2017) entre los meses de Noviembre y Marzo, en ambos sitios de muestreo (CA 1 y CA 2) y sus respectivos sitios controles (Ref 1 y Ref 2). Dicho periodo comprende la siembra de las semillas y la cosecha del arroz, y además coinciden con la época en que las especies de anuros se encuentran reproductivamente activas (Schaefer 2006; Peltzer y Lajmanovich 2007; Sánchez et al. 2009; Curi et al. 2014). Los muestreos consistieron en inspecciones diurnas y nocturnas en las que se aplicaron las técnicas de encuentro visual (Crump y Scott 2001) y de encuentro auditivo (Zimmerman 1994) para el registro de anuros. Las dos especies se colectaron de forma manual, y en cada muestreo se colectó un número máximo de 10 individuos machos adultos por especie.

2.2.4 Mediciones generales y disección

Los individuos colectados fueron eutanasiados luego de su traslado al laboratorio mediante aplicación tópica en vientre de gel de Benzocaina (10%) conforme a protocolo de ASIH et al. (2004). Las medidas morfológicas se calcularon utilizando machos y hembras de ambas especies. Una vez sacrificados los individuos se pesaron (P_e) con una balanza digital Ohaus Traveler™ (0.01 g de precisión) y se midió a cada uno la longitud hocico cloaca (LHC) con un calibre digital (0.01 mm de precisión). Para cada ejemplar se calculó el factor de condición animal (FCA) de acuerdo a Bagenal y Tesch (1978), con la siguiente fórmula:

$$\text{FCA: } [P \text{ (g)} / \text{LHC (mm)}]^3 * 100$$

Se examinó a cada espécimen en búsqueda de anomalías morfológicas externas de acuerdo a lo propuesto por Johnson et al. (2001) y Peltzer et al. (2011).

Se realizó la disección de cada individuo para observar y fotografiar bajo lupa de los órganos de la cavidad abdominal. En la mayoría de los casos se procedió a extraer el sistema digestivo (principalmente estómago e intestino), por interferir con la correcta visualización. Posteriormente, los individuos fueron fijados en solución de Bouin durante 24 h. y conservados en alcohol 70 %. Los especímenes fueron numerados e ingresados a la colección herpetológica de la UNNE.

2.2.5 Evaluación de la morfológica gonadal externa de machos

El Sistema Urogenital (testículos y riñones) de los individuos fueron fotografiados bajo lupa utilizando una cámara digital Canon EOS 80D. La longitud (L) y ancho (A) de los testículos se midieron con el *software* libre Image J. Posteriormente el volumen testicular se calculó con la fórmula del esferoide (Dunham 1981):

$$V = 4/3 \pi (Lar/2) (A/2)^2$$

Se examinó la morfología externa de los testículos en ambas especies de Anfibios en busca de anomalías, tales como tamaños y formas irregulares (Coady et al. 2004; 2005; Sánchez et al. 2014), pigmentación atípica en caso de *L. limellum*, presencia de órgano de Bidder con folículos vitelogénicos en *R. bergi*, o con alguna otra alteración morfológica (Hecker et al. 2006).

2.2.6 Procesamiento histológico de gónadas en machos

El Sistema Urogenital (testículos y riñones) extraído de seis individuos provenientes de CA 1-2 y Ref 1-2 que se encontraban conservados en alcohol 70 % se utilizaron para el análisis histológico. En el caso de *R. bergi* se diseccionaron testículos con el Órgano de Bidder y los riñones en forma conjunta, por el pequeño tamaño de la muestra a incluir. Y en el caso de *L. limellum* se extrajeron testículos con riñones. Los tejidos fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol (70, 80, 96 (1 y 2), 100 %, alcohol butílico (1 y 2). Luego aclarados en butilo-parafina e incluidos en parafina para la confección de tacos (Humason 1979) (ver figura 2.6). Se realizaron cortes histológicos transversales de 4-5 μm con un micrótopo rotatorio manual correspondientes a la región central de la gónada. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y Tricrómica de Gomory. Los cortes se observaron y fotografiaron bajo un microscopio Óptico Leica DM500 equipado con una cámara digital Leica LCC50HD.



Figura 2.6. Etapas del procesamiento histológico convencional. Deshidratación (A); cofección de tacos (B); cortes con micrótopo (C); coloración (D); observación y análisis (E).

2.2.7 Análisis histológico de gónadas, Órgano de Bidder y variables analizadas

En cada túbulo seminífero se encuentran numerosos cistos, que son conjuntos de células germinales en el mismo estadio de desarrollo celular unidos a Células de Sertoli (De Oliveira et al. 2003; De Souza Santos y Oliveira 2008). Los cistos pueden contener las siguientes células de la línea germinal: espermatogonias (Epg), espermatocitos primarios (EI), espermatocitos secundarios (EII), espermátidas en distintas fases de maduración (Ep) y espermatozoides unidos a células de Sertoli o libres (Epz, Epz libres). Los tipos celulares se clasificaron de acuerdo a De Souza Santos y Oliveira (2008) y Ferreira et al. (2008).

En cada testículo se examinaron 10 túbulos seminíferos de una sección medial de la gónada derecha. Dentro de cada túbulo se contabilizaron el número de cistos con células en estadios tempranos (Epg, EI, EII) y de cistos con células en estadios tardíos de la espermatogénesis (Ep, Epz). A su vez a cada túbulo se los clasificó de acuerdo a la presencia y cantidad de espermatozoides en el lumen (Epz libres), de la siguiente manera: túbulos sin espermatozoides libres en el lumen (0), con poca cantidad de espermatozoides libres en el lumen (1), con moderada (2) o abundantes cantidad de espermatozoides libres en el lumen (3). Además las secciones fueron analizadas bajo microscopio óptico para identificar anomalías testiculares (Hayes et al. 2003; Hecker et al. 2006; Jooste et al. 2005; Kloas et al. 2009; McCoy et al. 2008, 2017).

En el caso de *L. limellum*, se clasificó la intensidad de pigmentación externa de las gónadas de acuerdo a Franco-Belussi et al. (2017) como 0 (despigmentado), 1 (poca pigmentación, 25% aproximadamente), 2 (parcialmente pigmentado, 50% aproximadamente), 3 (muy pigmentado).

En la mayoría de los Bufónidos, durante la fase larval, la región anterior del primordio gonadal se diferencia en el Órgano de Bidder, y en la región

posterior se diferencia en el ovario o testículo (Petrini y Zaccanti 1998). El OB se desarrolla en ambos sexos durante la etapa larval; no obstante en los machos se conserva en la edad adulta, mientras que en las hembras, en la mayoría de los casos, reduce su tamaño y se atrofia (Piprek et al. 2014). La caracterización del Órgano de Bidder para el caso de *R. bergi* se realizó de acuerdo a Scaia et al. (2011); Piprek et al. (2014), y Freitas et al. (2015).

2.2.8 Procesamiento histológico del hígado

El hígado de seis individuos provenientes de CA 1-2 y Ref 1-2 fueron destinados a la preparación de preparados histológicos, tal como fue descrito en la sección 2.2.6. Se realizaron cortes seriados de 4-5 μm con micrótomo rotatorio manual correspondientes a la región central del hígado. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina (H-E) y Tricrómica de Gomory (TG). Los mismos se observaron y fotografiaron bajo un microscopio óptico Leica DM500 equipado con una cámara digital Leica LCC50HD.

2.2.9 Análisis histológico del hígado y variables analizadas

Se analizaron seis fotografías que corresponden a campos de 40 x de magnificación de secciones hepáticas no consecutivas tomadas bajo microscopio óptico de cada individuo seleccionado para el análisis. En cada una de las 6 secciones se cuantificó el número de MMs utilizando el *software* Image J (De Souza Santos et al. 2014). Otras alteraciones en la histología hepática se evaluaron en las secciones analizadas y se clasificaron como hipervascularización, agrandamiento de sinusoides, dilatación de vasos sanguíneos, vacuolización o necrosis de hepatocitos, etc. de acuerdo a Cakici (2015), Sayed y Younes (2017).

2.2.10 Análisis estadísticos

Previo a cada análisis estadístico, se realizaron los tests de Kolmogorov-Smirnov y de Levene para probar la normalidad y homogeneidad de varianzas, respectivamente (Zar 1999). Para determinar si existen diferencias en los parámetros morfológicos (LHC, FCA, P) entre individuos de ambos sitios se utilizó un ANOVA (F) o Kruskal Wallis (KW) de acuerdo a la naturaleza de los datos. El VTM no cumplió los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo que se transformó dicha variable por la aplicación de logaritmo natural. Luego para comparar el volumen testicular se utilizó un ANCOVA (F) utilizando la LHC como covariable. Para comparar el número promedio de cistos con células en estadios tempranos (Epg, EI, EII) y de cistos con células en estadios tardíos de la espermatogénesis (Ep, Epz) en testículos de individuos de ambos sitios, se utilizó un análisis de la varianza no paramétrico (Kruskal Wallis, H). Y por otro lado la proporción de túbulos seminíferos con abundante, moderada, poca y nula cantidad de espermatozoides libres en el lumen se contrastó con un Chi Cuadrado. El número de MMs en las secciones hepáticas analizadas por sitios se comparó con un Kruskal Wallis (H).

Los análisis estadísticos se realizaron con el *software* Infostat /P version 1.1 (Grupo InfoStat Profesional, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Se utilizó un nivel de significancia de $P < 0.05$.

2.3 Resultados

2.3.1 *Lysapsus limellum*

2.3.1.1 Parámetros morfológicos generales

Los individuos colectados y analizados de *L. limellum* en CA 1 $n = 31$ (26 ♂, 5 ♀) y $n = 23$ en Ref 1 (13 ♂, 10 ♀) no mostraron diferencias en la LHC promedio ($F = 0,001$; $P = 0,978$), Pe ($F = 2,284$; $P = 0,138$), ni FCA ($F = 3,308$; $P = 0,076$) (Tabla 1).

2.3.1.2 Evaluación de la morfología gonadal externa de machos

El sistema reproductor en machos de *L. limellum* consiste en testículos ubicados ventralmente respecto a los riñones (Fig. 2.6 A). Los testículos están cubiertos por una cápsula de tejido conjuntivo o túnica albugínea. En esta especie los testículos son de forma ovoidea con una pigmentación externa que en general es intensa y de color negro y se encuentran asociados a cuerpos grasos, los cuales esta compuestos por células adiposas. (Fig. 2.6 A). El In del VTM no mostró diferencias significativas entre sitios (ANCOVA, $F= 0,05$; $P=0,8164$) (Tabla 1). Morfológicamente se pudo distinguir en ejemplares de *L. limellum* la presencia de tamaños irregulares entre ambos testículos (18,51% en CA 1, 0% en Ref 1; Fig. 2.6 B).

En los individuos de CA 1 se observaron solo dos individuos con testículos pigmentados (3), dos con testículos parcialmente pigmentados (2), uno con testículo con poca pigmentación (1) y uno con testículos despigmentados (0). En los de Ref 1, cinco individuos tenían los testículos pigmentados (3), y uno parcialmente pigmentados (2) (Fig. 2.6 C-D).

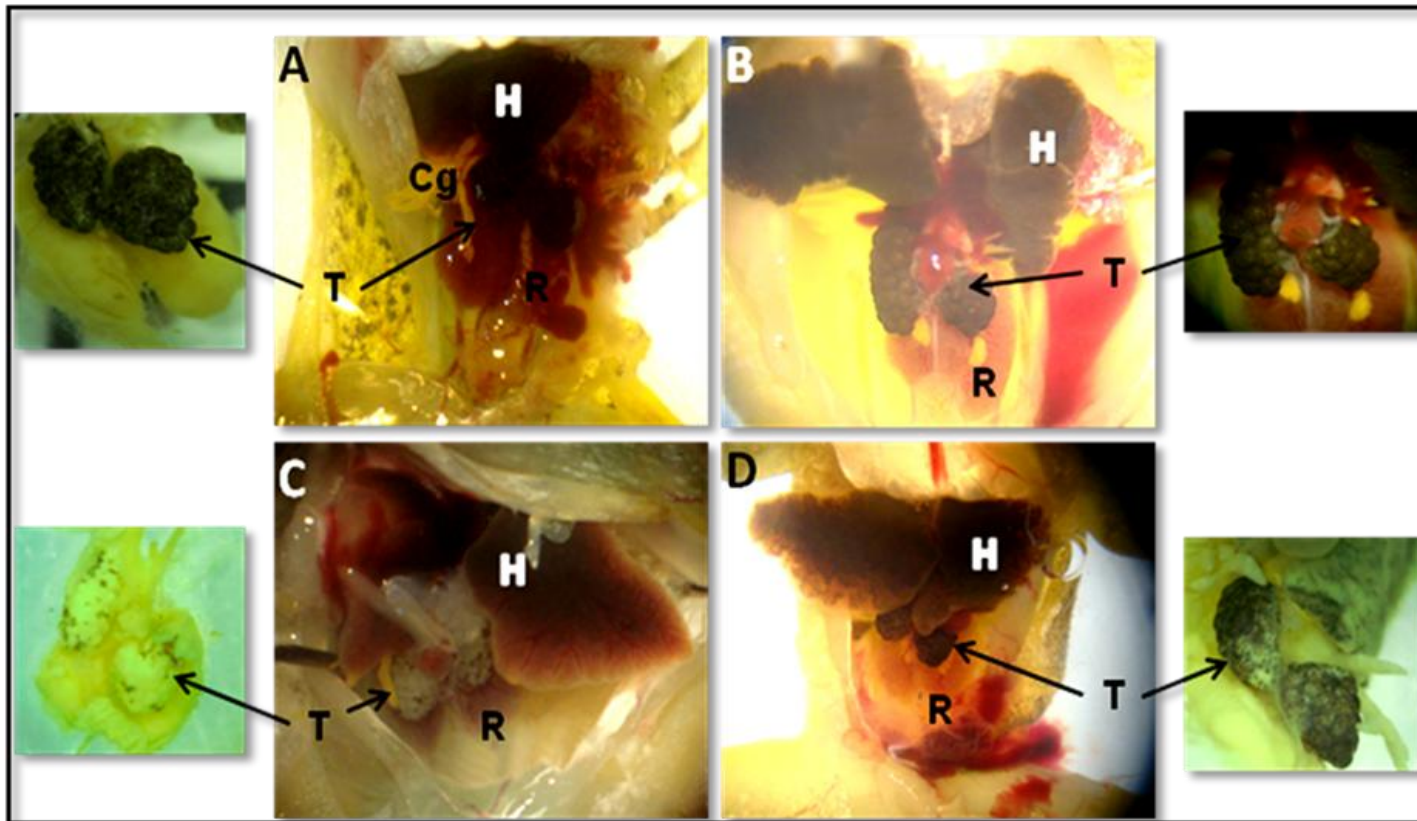


Figura 2.6 Vista general bajo lupa estereoscópica y detalle de sistema reproductor de *L. limellum*. Individuo de sitio de referencia (Ref 1) (A); presencia de tamaño irregular entre testículos (longitud testículo derecho: 2,33 mm, longitud testículo izquierdo: 1,33 mm) en CA 1 (B); despigmentación total (C) y parcial (D) en testículos de individuos de CA 1. Referencias: T (testículos), R (riñon), H (hígado), Cg (cuerpos grasos).

2.3.1.3 Análisis de la histología testicular

Histológicamente, en los testículos se observan los túbulos seminíferos que contienen en su interior cistos con las células de la línea germinal (Epg, EI, EII, Ep, Epz, Epz libres) (Fig. 2.7 A, B). Entre los túbulos se observa tejido conjuntivo que contiene fibras de colágeno (teñidas levemente de color azul en cortes teñidos con Tricrómica de Gomori) y en la mayoría de los casos pigmentos (cromatóforos) (Fig. 2.7 y 2.9 A, B). En dos individuos de CA 1 se observaron pocos cistos de células germinales en los túbulos seminíferos, y por lo tanto se observaron espacios en la luz de los túbulos (Fig. 2.9 C). Mientras que los individuos del sitio Ref 1 no fueron registrados.

El número promedio de cistos con células germinales de estadios tempranos de la espermatogénesis (Epg, EI, EII) difirió entre sitios ($H=11,32$, $P=0,008$), siendo menor en los individuos del sitio de referencia (Fig. 2.8 y 2.9, Tabla 1). En cambio el número de cistos con células germinales en estadios tardíos de la espermatogénesis (Ep, Epz) no mostró diferencias entre sitios ($H=0,80$, $P=0,317$) (Fig. 2.8, Tabla 1).

La proporción de túbulos seminíferos sin espermatozoides libres en el lumen (0), con poca cantidad de espermatozoides libres en el lumen (1), con moderada (2) o abundantes cantidad de espermatozoides libres en el lumen (3) se resumen en la Fig. 2.10. En todos los casos, las diferencias han sido estadísticamente significativas (Chi cuadrado, $P<0.05$). Los individuos del sitio Ref 1 contenían mayor proporción de túbulos con moderada y abundante cantidad espermatozoides libres en el lumen (Chi cuadrado, $gl=1$, $P=0,001$, Tabla 1).

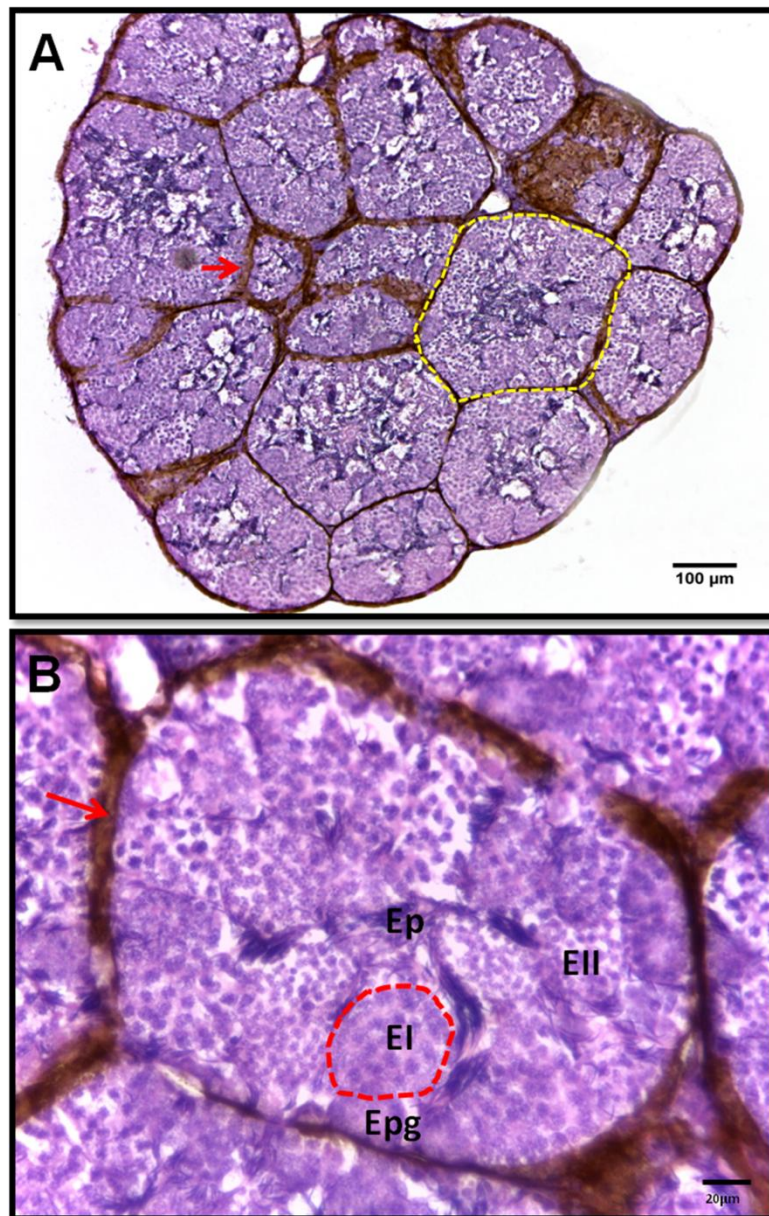


Figura 2.7 Cortes de testículos de *L. limellum* de Ref 1 teñidos con H-E. Vista general de testículo con 10 x de magnificación (A); detalle de un túbulo seminífero visto con 40 x de magnificación (B). Referencias: Líneas discontinuas amarillas (túbulos seminíferos), líneas discontinuas rojas (cistos), flechas (tejido intersticial con pigmentos), EI (espermatoцитos primarios), EII (espermatoцитos secundarios), Ep (espermátidas), Epg (Espermatoгонias).

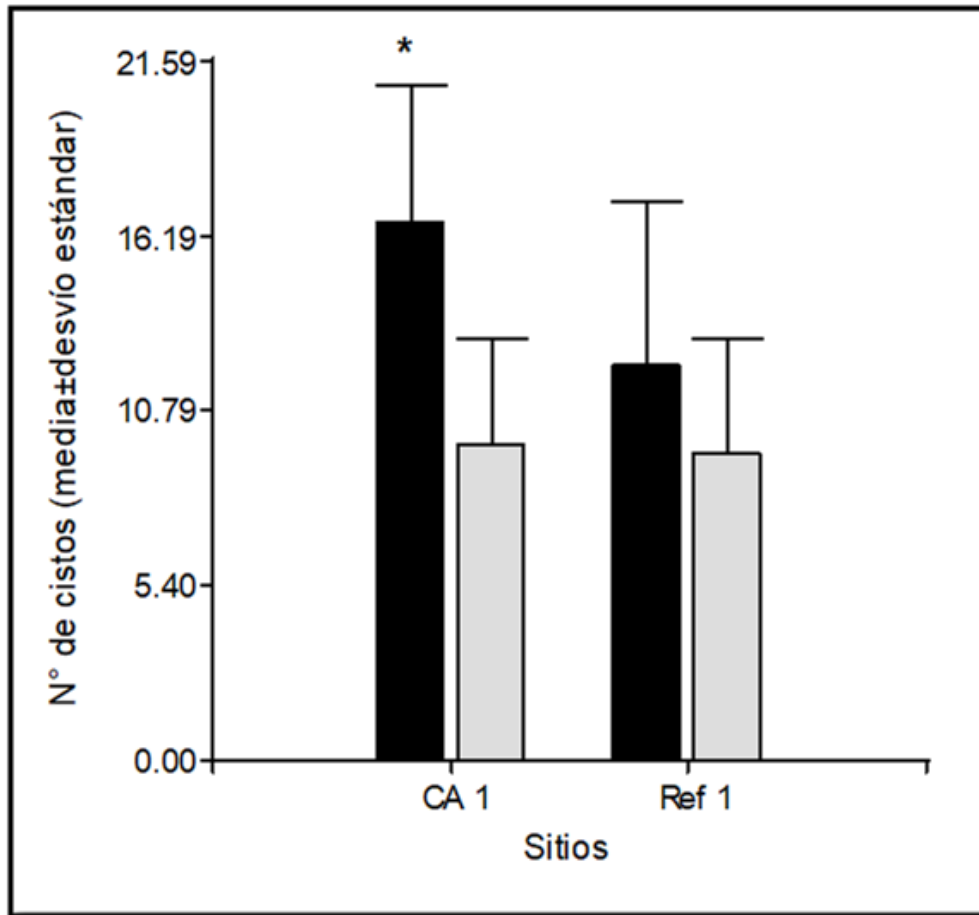


Figura 2.8 Número promedio de cistos con células en estadios tempranos de la espermatogénesis (barras negras) y con células en estadios tardíos de la espermatogénesis (barras grises) expresado como media \pm desvío estándar, analizado en individuos de *L. limellum* colectados en el cultivo de arroz (CA 1) y sitio de referencia (Ref 1) en la provincia de Santa Fe. El asterisco indica diferencia estadística significativa respecto al control ($P < 0.05$).

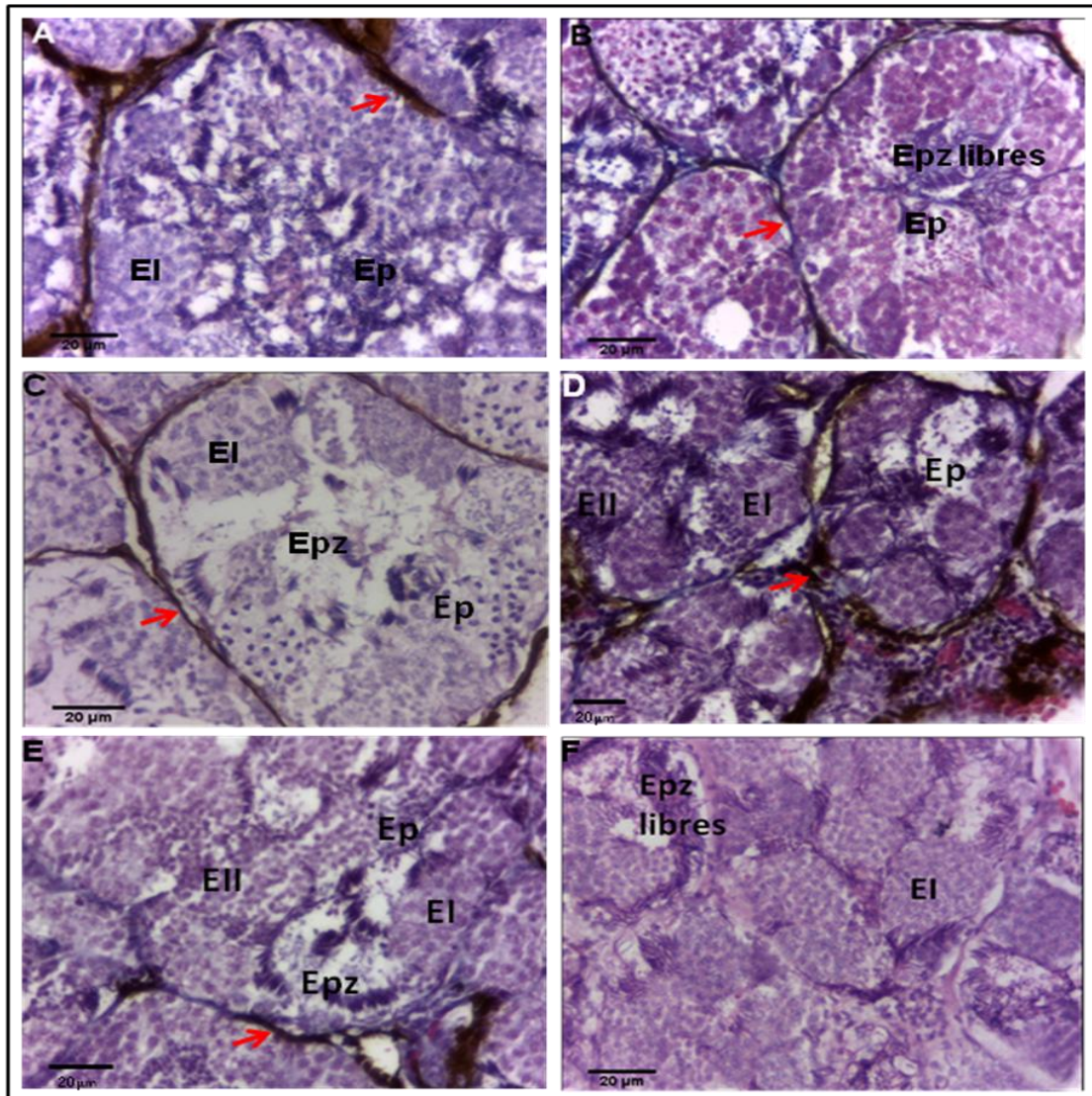


Figura 2.9 Histología de testículos de *L. limellum* (40x). Testículos de individuos del sitio Ref 1 teñidos con H-E (A) y TG (B); del sitio CA 1 donde se observa túbulo seminífero con pocos cistos de células germinales (C); de CA 1 con testículo parcialmente pigmentado (D), con poca pigmentación (E), y con ausencia total de pigmentos en tejido intersticial y predominio de cistos con células en estadios tempranos de la espermatogénesis (F). Referencias: EI (espermatoцитos primarios), Ep (espermátidas), Epz (espermatozoides), Epz libres (espermatozoides libres) flecha roja (tejido intersticial con pigmentos).

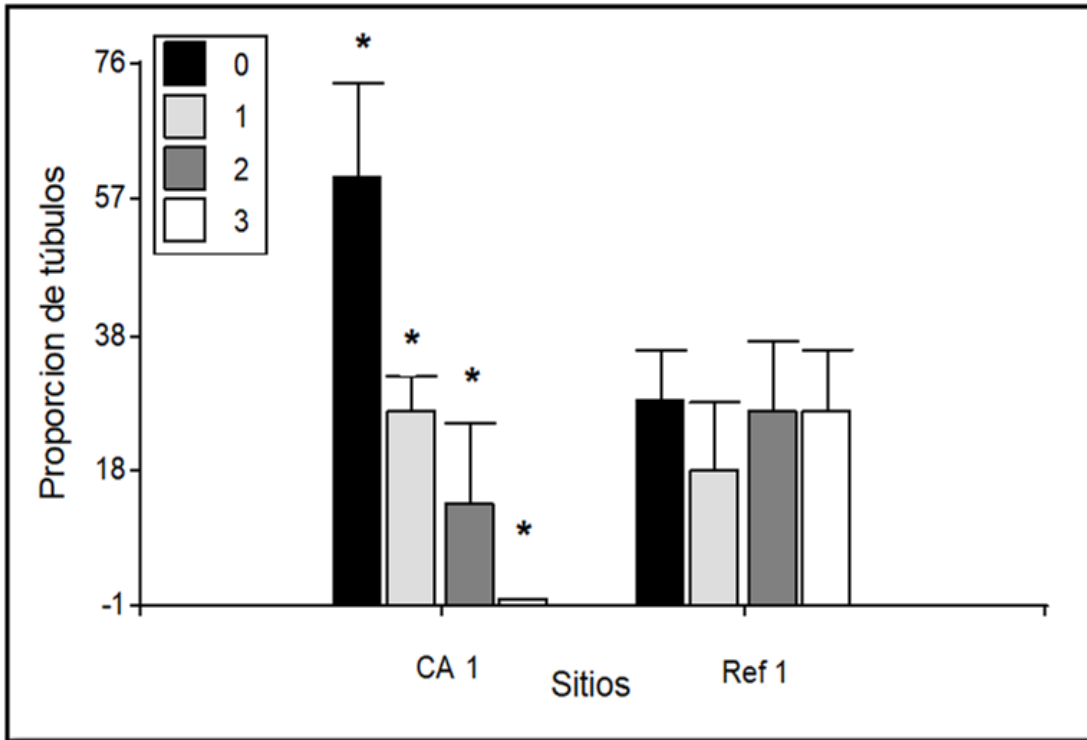


Figura 2.10 Evaluación histológica de la proporción de túbulos con nula (0), poca (1), moderada (2) y abundante (3) cantidad de espermatozoides en la luz tubular de testículos de individuos colectados en el cultivo de arroz (CA 1) y sitio de referencia (Ref 1) de la provincia de Santa Fe. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

2.3.1.4 Análisis de la histología hepática

El hígado consiste en un parénquima organizado en hepatocitos ubicados en cordones entre los que se encuentran los capilares sinusoides. En el tejido hepático se identificaron venas o vasos y melanomacrófagos dispersos por todo el parénquima (Fig. 2.11). En hígados de individuos del CA 1 en el 35,71 % de los campos analizados se encontraron agrandamientos de sinusoides (Fig. 2.11 E) y en 5,55 % venas o vasos sanguíneos dilatados, en los individuos del sitio Ref 1 la proporción fue de 0% (Fig. 2.11 F) (Tabla 1). El número de MM registrado en el tejido hepático en individuos de CA1 no mostró una diferencia significativa respecto a los del sitios Ref 1 ($H=0,01$, $P=0,914$, Fig. 2.12, Tabla 1).

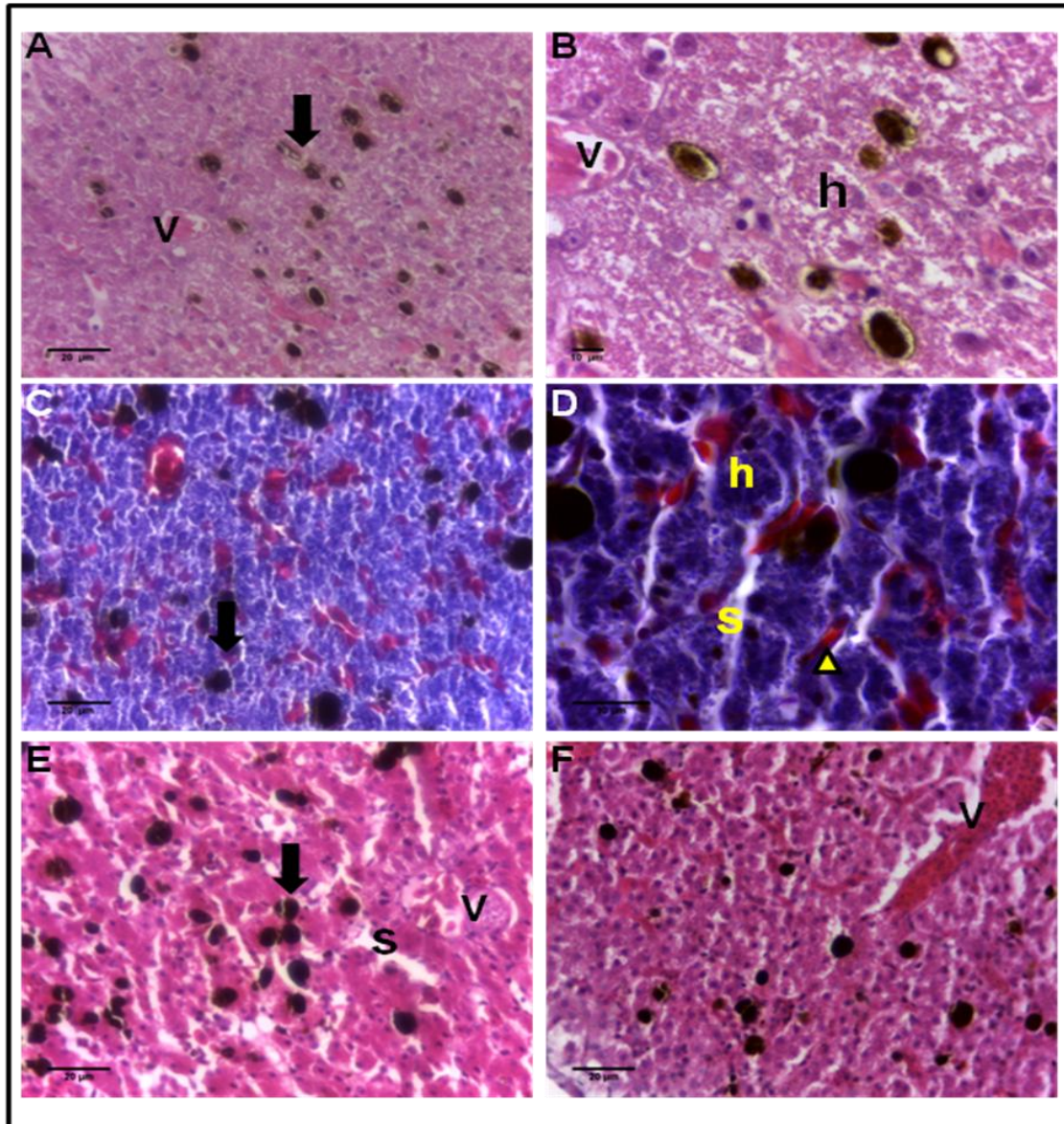


Figura 2.11. Estructura hepática de ejemplares de *L. limellum*. Cortes histológicos en 40x (A) y 100x (B) teñidos con coloración de H-E; y en 40x (C) y 100x (D) teñidos con TG de individuos de Ref 1; cortes en 40x teñidos con H-E donde se observa la dilatación o agrandamiento de los sinusoides (E) y venas o vasos sanguíneos dilatados (F) de individuos de CA 1. Referencias: s (sinusoides), h (hepatocitos), v (vasos/vens), flecha egra (melanomacrófagos), cabeza de flecha (eritrocitos).

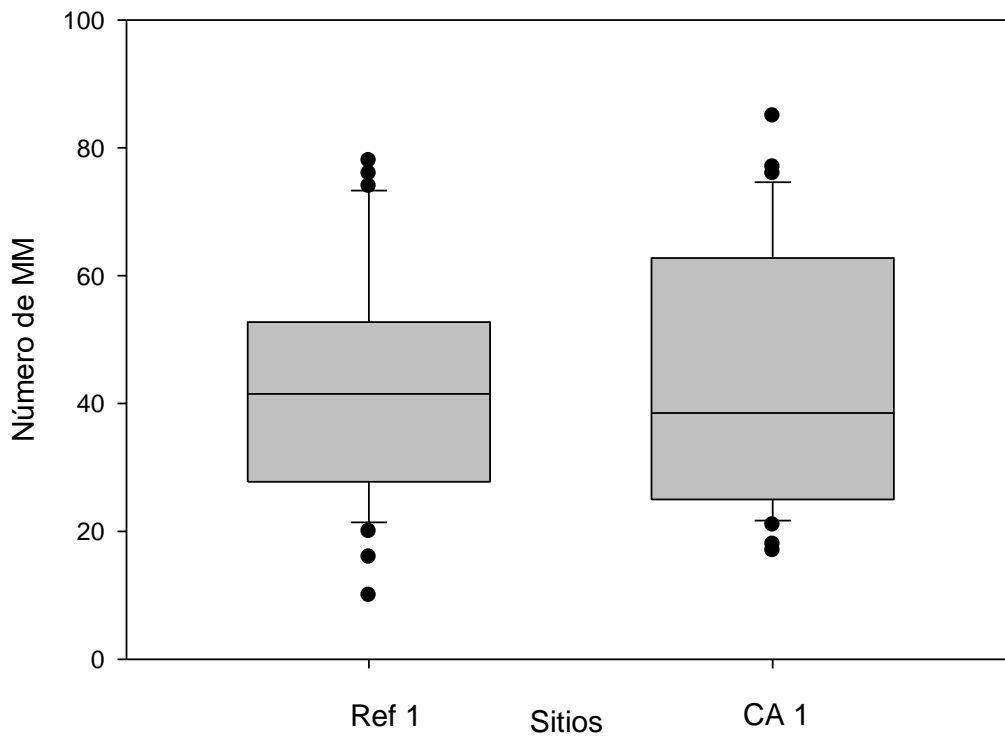


Figura 2.12 Número promedio de melanomacrófagos en hígados de *L. limellum* expresado como media \pm desvío estándar en individuos colectados en el cultivo de arroz (CA 1) y en el sitio de referencia (Ref 1) de la provincia de Santa Fe.

Tabla 1. Resumen de valores obtenidos de los parámetros morfológicos e histológicos medidos en *Lysapsus limellum* del cultivo de arroz (CA 1) y sitio de referencia (Ref 1) en la provincia de Santa Fe. Referencias: LHC (longitud hocico cloaca), Pe (peso), FCA (Factor de Condición Animal), VT (Volumen testicular), Epz (Espermatozoides), MMs (Melanomacrófagos).

PARÁMETROS MORFOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS	<i>Lysapsus limellum</i>	
	CA 1	Ref 1
<i>Parámetros morfológicos</i>		
LHC (mm)	16,90 ±1,95	17±2,09
Pe (g)	0,62±0,12	0,67±0,11
FCA	0,0005	0,0006
VT (cm ³)	0,93±0,77	0,80±0,44
<i>Parámetros histológicos de testículos</i>		
Nº de cistos con células en estadios tempranos	16,61±8,10	12,21±6,59
Nº de cistos con células en estadios tardíos	9,21±7,33	9,51±5,64
<i>Proporción de túbulos con:</i>		
Nula cantidad de Epz en la luz tubular	60±32,86	28,33±17,22
Poca cantidad de Epz en la luz tubular	26,66±12,11	18,33±23,16
Moderada cantidad de Epz en la luz tubular	13,33±28,04	26,66±24,22
Abundante cantidad de Epz en la luz tubular	-	26,66±21,60
<i>Parámetros histológicos de hígados</i>		
Ateraciones histológicas	AS, DVS	-
Número de MMs	43,33±19,69	42,19±17,63

*Valores expresados como media±desvío estándar

* Los números en **negrita** indican valores significativamente diferentes entre sitios.

2.3.2 *Rhinella bergi*

2.3.2.1 Parámetros morfológicos generales

Los individuos colectados y analizados de *R. bergi* en CA 2 n= 36 (24 ♂, 12 ♀) y n= 21 en Ref 2 (8 ♂, 13♀), no mostraron diferencias en la LHC promedio (H= 3,34; P= 0,067), Pe (H= 3,26, P=0,070), ni FCA (H=2,73, P=0,09) (Tabla 2). Tres de los individuos colectados en CA 2 tenían anomalías en sus miembros que pueden ser clasificadas en dos casos como sindactilia (5,55%) y un caso de ectromelia (2,77%) (ANEXO, Figura A1).

2.3.2.2 Evaluación de la morfología gonadal externa de machos

El sistema reproductor de *R. bergi* consta de testículos de forma cilíndrica y color blanco-amarillento. Acompañando a los testículos se observan cuerpos grasos de color amarillo y entre los testículos y los cuerpos grasos, se encuentra un órgano de aspecto granuloso, el Órgano de Bidder (OB) (Fig. 2.13).

El In del VTM no mostró diferencias significativas entre sitios (ANCOVA: F= 2,09; P=0,16) (Tabla 2).

Morfológicamente se pudo distinguir ejemplares con tamaños irregulares entre ambos testículos (16,66%, Fig. 2.13 B, D) y órganos de Bidder con folículos agrandados (8,33%, Fig. 2.13 C-D) y un individuo con OB bilobulado (8,33 %, Fig. 2.13 E) en individuos de CA 2. En individuos de Ref 2 no se han registrado estas alteraciones.

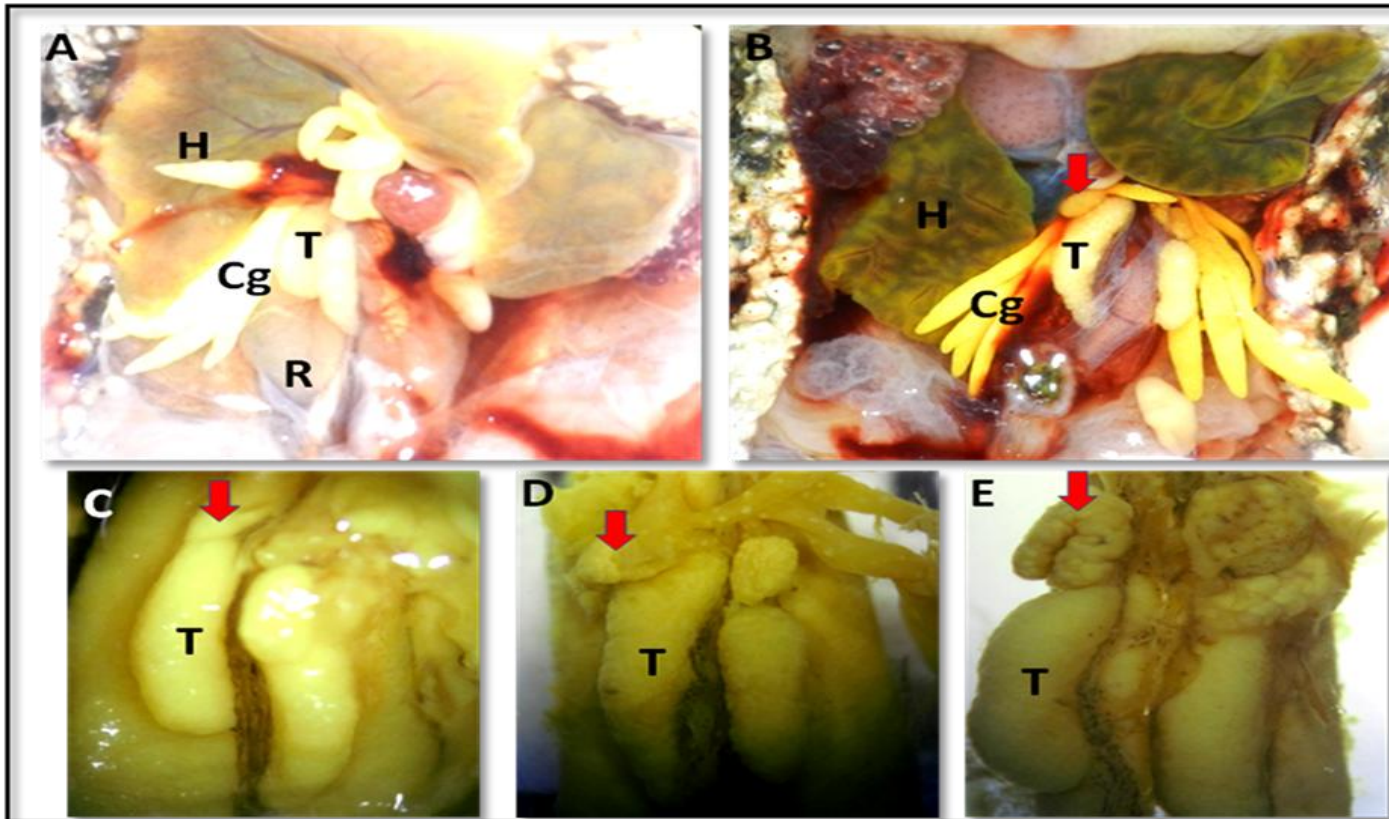


Figura 2.13 Vista general y detalle bajo lupa estereoscópica del sistema reproductor de *R. bergi*. Individuo del sitio Ref 2 (A), y de CA 2 donde se observan testículos con tamaños irregulares (B); detalle de órgano de Bidder de individuo de Ref 2 (C), y de individuos colectados en CA 2 donde se pueden observar los folículos agrandados (D-E). Referencias: T (testículos), R (riñón), H (hígado), Cg (cuerpos grasos), Flechas (Órgano de Bidder). Note además la particular coloración del hígado en individuos de CA 2.

2.3.2.3 Análisis de la histología testicular y del Órgano de Bidder

La configuración histológica de los testículos de *R. bergi* es similar a la descrita para *L. limellum*. En los túbulos seminíferos se pueden distinguir con facilidad las células germinales en las diferentes fases de la espermatogénesis (Epg, Epl, EpII, Ep, Epz y Epz libres) (Fig. 2.14, 2.15). Los túbulos seminíferos están bien delimitados a pesar de no contener células pigmentarias como en *L. limellum* (Fig. 2.14 A, 2.15 A). Dentro de los túbulos se visualizan con claridad los cistos de células germinales y en algunos casos se puede observar la célula de Sertoli (2.15 D). Entre los EI se puede distinguir células en distintas fases de la Profase I de la meiosis como en la figura 2.14 D. Los EII no son fácilmente distinguibles de los EI. Y también se distinguen Ep en distintas fases de maduración.

El número promedio de cistos con células germinales de estadios tempranos de la espermatogénesis (Epg, EI, EII) difirió entre sitios ($H= 12,04$, $P= 0,0005$), siendo menor en los individuos del sitio de referencia (Fig. 2.16, Tabla 2). En cambio el número de cistos con células germinales en estadios tardíos de la espermatogénesis (Ep, Epz unidos a células de Sertoli) no mostró diferencias entre sitios ($H= 2,82$, $P= 0,0925$) (Fig. 2.16, Tabla 2). La proporción de túbulos sin espermatozoides libres en el lumen (0), con poca cantidad de espermatozoides libres en el lumen (1), con moderada (2) o abundante cantidad de espermatozoides libres en el lumen (3) se resumen en la Fig. 2.17. Al comparar las proporciones, las diferencias han sido estadísticamente significativas entre sitios solamente para la proporción de túbulos con nula y moderada cantidad de espermatozoides libres en el lumen del túbulo (Chi cuadrado, $P<0.05$) (Tabla 2).

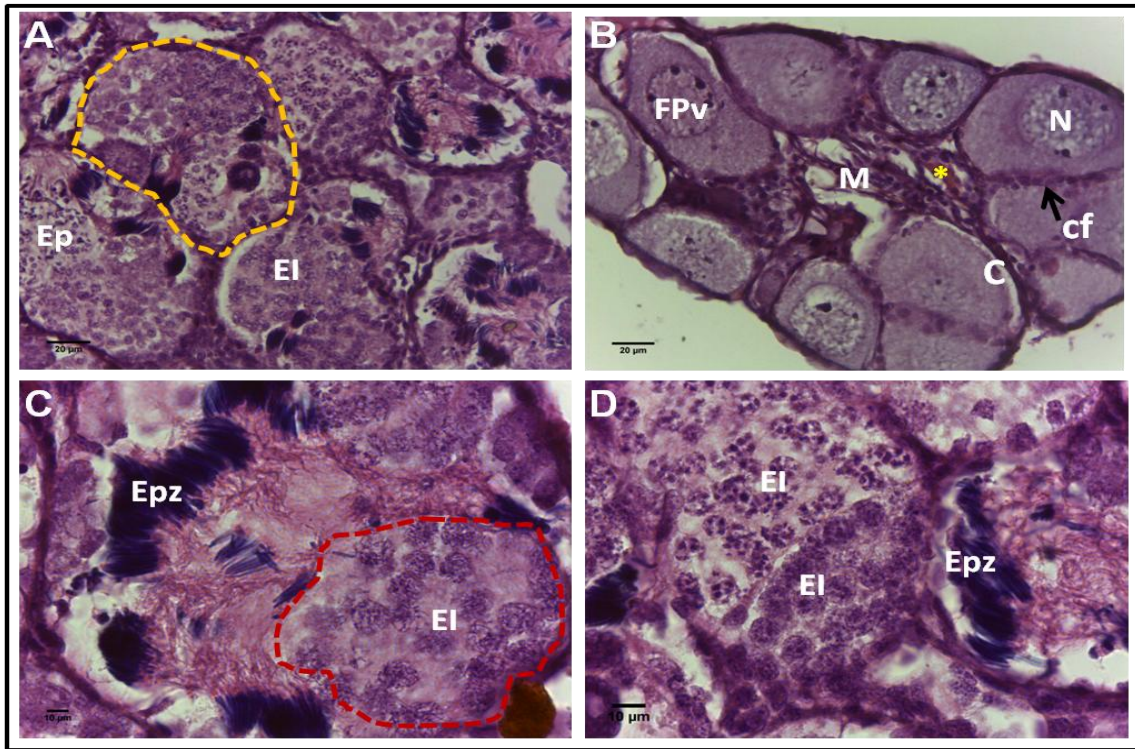


Figura 2.14 Histología de testículos y Órgano de Bidder en *R. bergi* del sitio Ref 2 teñidos con H-E. Estructura del testículo (A) y del Órgano de Bidder (B) en 40x; detalles de testículos en 100x para observar cistos de células germinales (C, D). Referencias: Líneas discontinuas naranjas (túbulos seminíferos) y rojas (cistos), Epg (espermatogonias) EI (espermatocitos primarios), Ep (espermátidas), Epz (espermatozoides unidos a células de Sertoli), M (médula), C (corteza), N (núcleo), cf (células foliculares), Fpv (folículo previtelogénico), asterisco (vasos sanguíneos). Escala: A, B (20 μ m) y C,D (10 μ m).

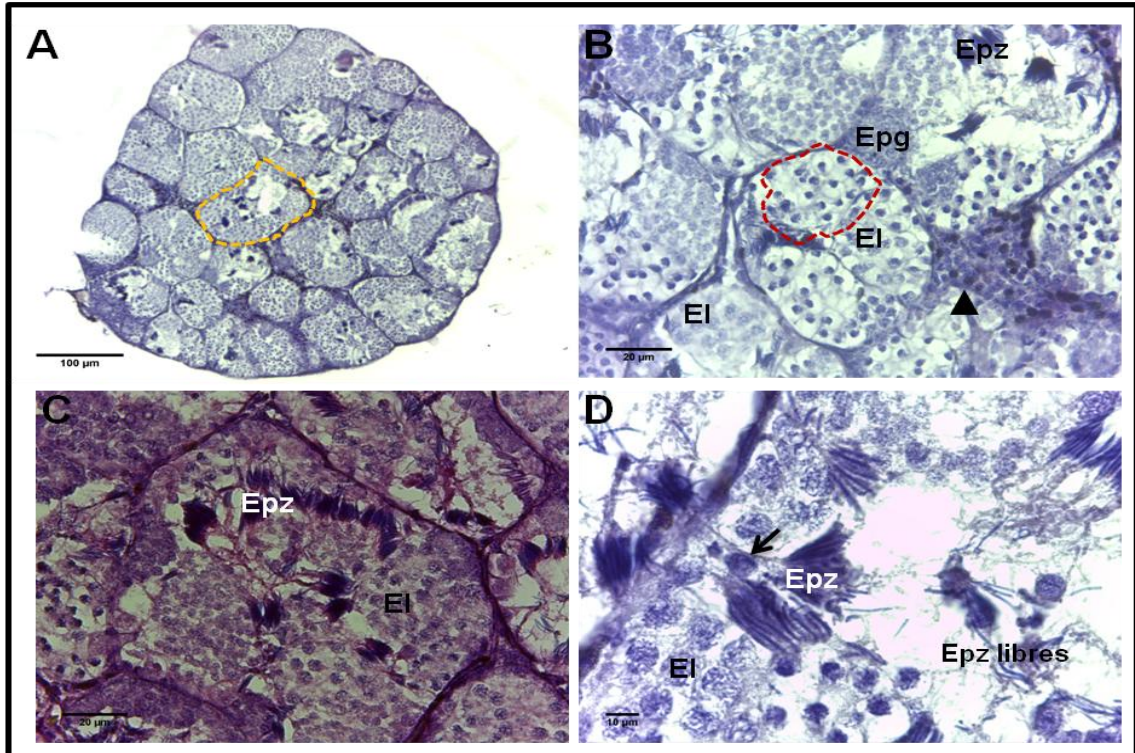


Figura 2.15 Histología de testículos de individuos del sitio CA 2 teñidos con H-E. Estructura general del testículo (A); detalle de los túbulos seminíferos vistos en 40x para observar los cistos de células germinales y el predominio de cistos de células en estadios tempranos (B, C); detalle de testículo en 100x para observar cistos de espermatozoides unidos a célula de Sertoli (D). Referencias: Líneas discontinuas naranjas (túbulos seminíferos) y rojas (cistos), Epg (espermatogonias); EI (espermatoцитos primarios), Epz (espermatozoides unidos a células de sertoli), Epz libres (Espermatozoides libres), flecha (Célula de Sertoli), triángulo (células pigmentadas).

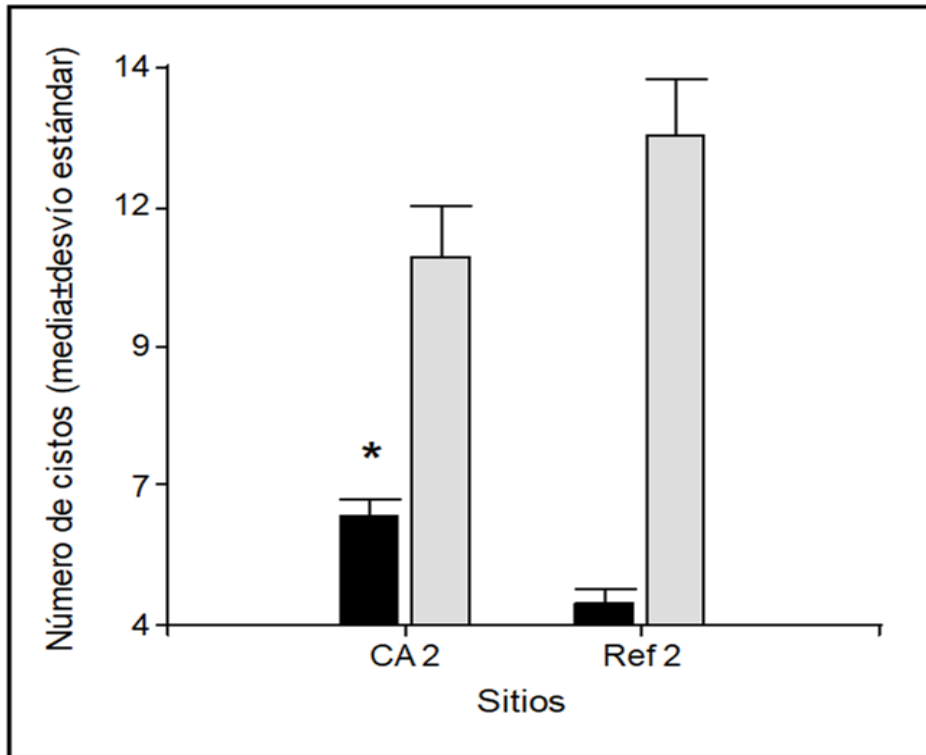


Figura 2.16 Número promedio de cistos con células en estadios tempranos de la espermatogénesis (barras negras) y con células en estadios tardíos de la espermatogénesis (barras grises) expresado como media \pm desvío estándar, analizado en individuos de *R. bergi* colectados en el cultivo de arroz (CA 2) y sitio de referencia (Ref 2) de la provincia de Chaco. El asterisco indica diferencia estadística significativa respecto al control ($P < 0.05$).

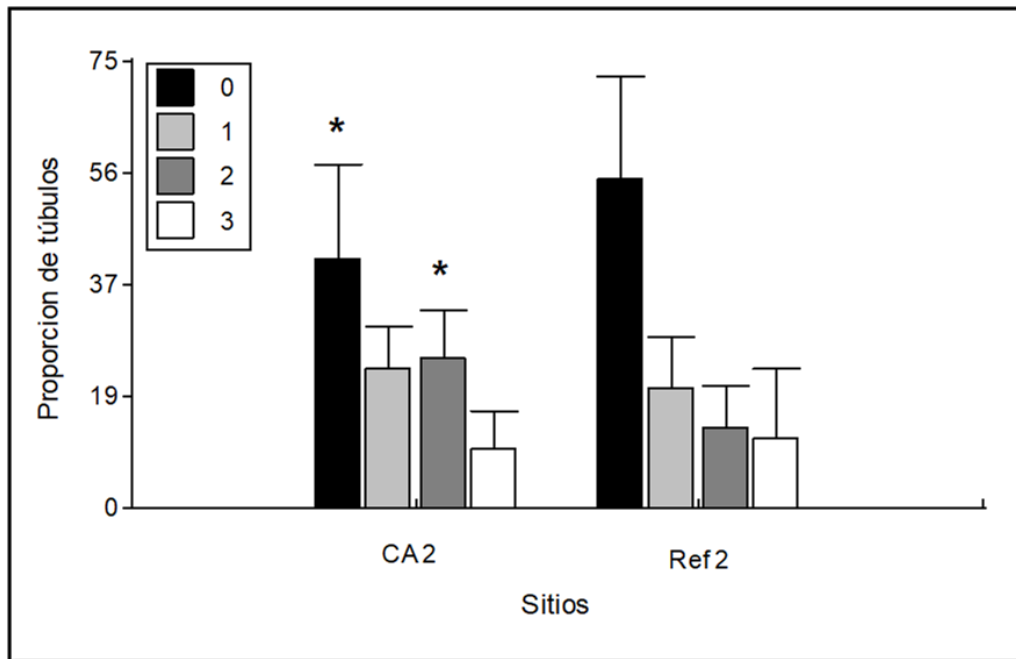


Figura 2.17 Evaluación histológica de la proporción de túbulos con nula (0), poca (1), moderada (2) y abundante (3) cantidad de espermatozoides en la luz tubular de testículos de individuos colectados en el cultivo de arroz (CA 2) y sitio de referencia (Ref 2) de la provincia de Chaco. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Histológicamente el OB, consiste en dos regiones bien delimitadas, una corteza y una región medular. En la corteza se observan ovocitos rodeados por células foliculares que se los conocen como folículos bidderianos que están en estadios previtelogénicos. En la región medular, se observa vasos sanguíneos y tejido conjuntivo con contenido de fibras y en algunos casos células pigmentarias (Fig. 2.14 B). Se pudo identificar en ciertas secciones histológicas la unión del tejido testicular con el OB (Fig. 2.18 E). Y en ciertos casos, se ha observado la presencia de oocitos testiculares (OT) dentro de los testículos de 3 individuos de Ref 2 (Fig. 2.17 A, B, D, F).

En los cortes histológicos de OB de individuos de CA 2, se observó la presencia de vacuolas en folículos de dos individuos (Fig. 2.19 A, B) y OB con folículos atrésicos en 4 individuos (Fig. 2.19 C, D). En un individuo se observó la presencia de células pigmentarias en la región medular del OB (Fig. 2.19 A, B).

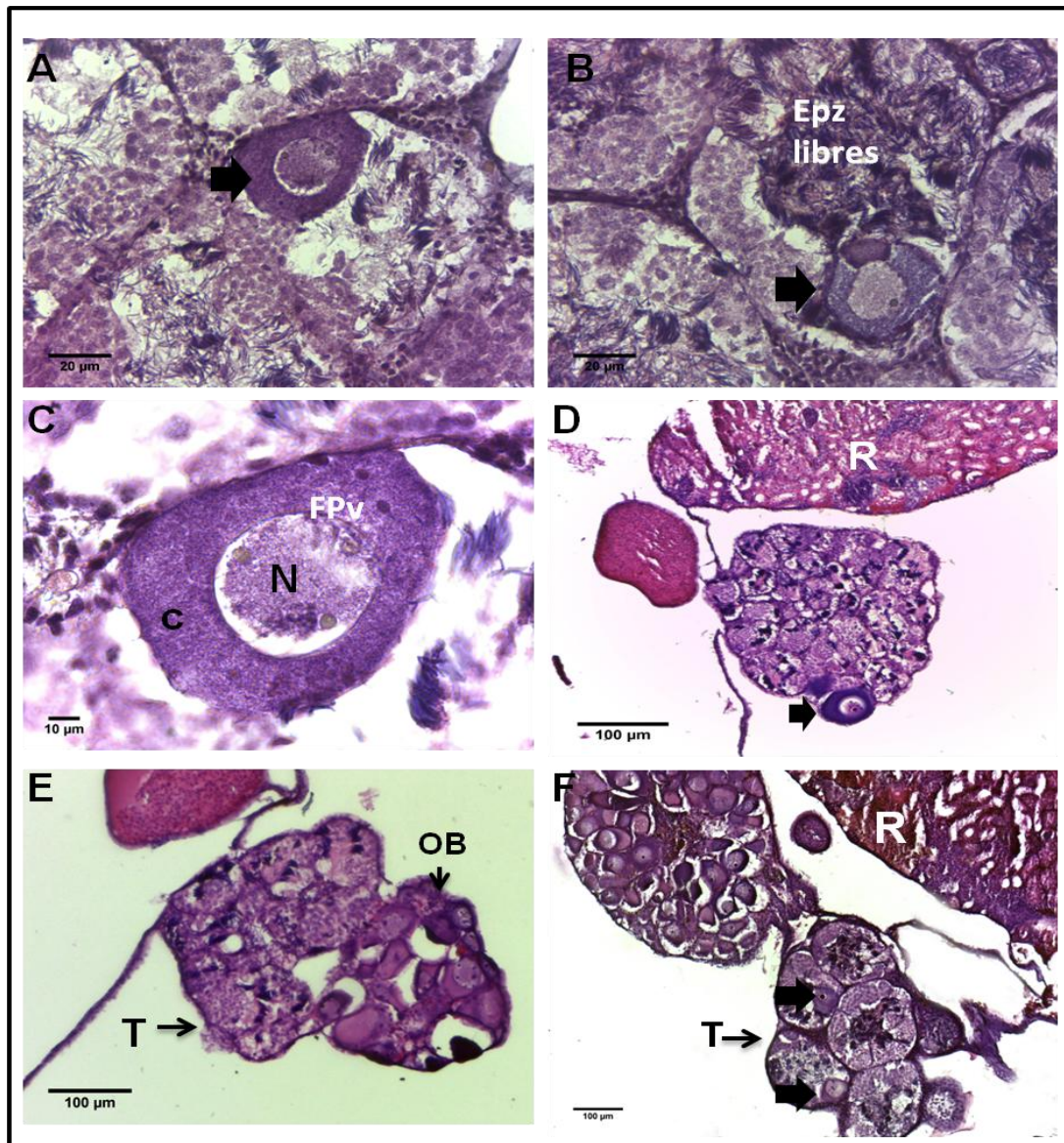


Figura 2.18 Cortes histológicos de testículos y OB en *R. bergi* de sitio Ref 2. Testículo con 2 ovocitos dentro de los túbulos (A, B); detalle en mayor aumento de un folículo testicular (C); vista general de testículo con un folículo (D); detalle de zona de unión entre testículo y OB (E); detalle de testículo junto al OB, con 2 folículos dentro del tejido testicular (F). Referencias: Epz libres (Espermatozoides libres), Fpv (Folículos previtelogénicos), N (núcleo), C (citoplasma), T (testículo), R (riñón), OB (Órgano de Bidder), flechas negras (folículos). A, B (40x), C (100x), D, E, F (10x).

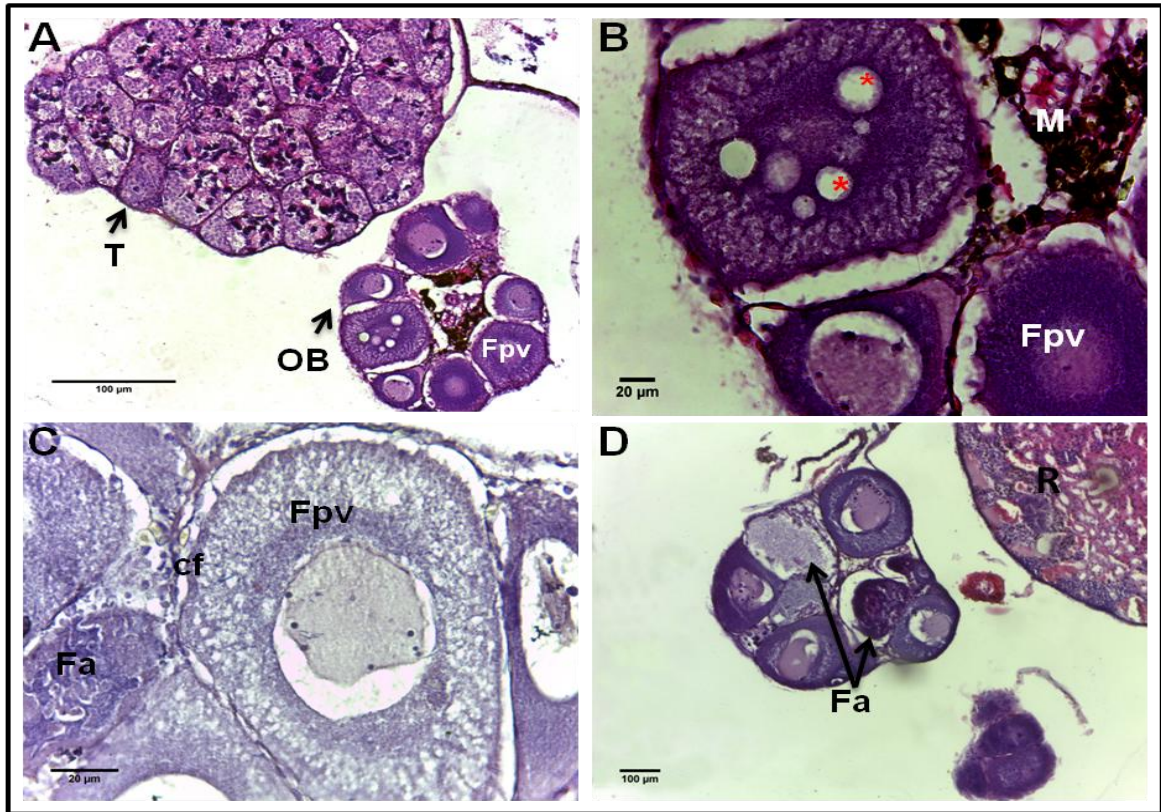


Figura 2.19. Cortes histológicos de OB en *R. bergi* de sitio CA 2. Vista general de testículo y OB (A); detalle de folículo con acuolas en citoplasma y núcleo y la médula con células pigmentarias (B); detalle de OB donde se observa folículo atrésico (C); vista general de OB con folículos atrésicos (D). Referencias: Fpv (Folículos previtelogénicos), Fa (folículos atrésicos), T (testículo), R (rinón), OB (Órgano de Bidder), M (médula), asteriscos (vacuolas), cf (células foliculares). A (10x), B, C, D (40x).

2.3.2.4 Análisis de la histología hepática

La configuración histológica del hígado en individuos de Ref 2 se muestra en la Fig. 2.20, y es similar a la descrita en la sección 2.3.1.4 para *L. limellum*.

En el tejido hepático de los individuos del CA 2 en el 41,66 % de los campos analizados se observó vacuolización de los hepatocitos (Fig. 2.21 B-D-E), en el 33,33 % agrandamiento de sinusoides hepáticos (Fig. 2.21 F), en el 11,11 % hipervascularización (Fig. 2.21 C) y en 5,55 % dilatación de vasos sanguíneos (Fig. 2.21 B). En cambio, en los individuos de Ref 2 se encontró un 14,28 % de los campos con hipervascularización y 4,76 % con agrandamiento de sinusoides (Tabla 2).

El número de MM contabilizado en el tejido hepático de individuos de CA 2 fue significativamente mayor que en los individuos del sitio Ref 2 ($H=4.13$, $P=0.0417$, Fig. 2.22, Tabla 2).

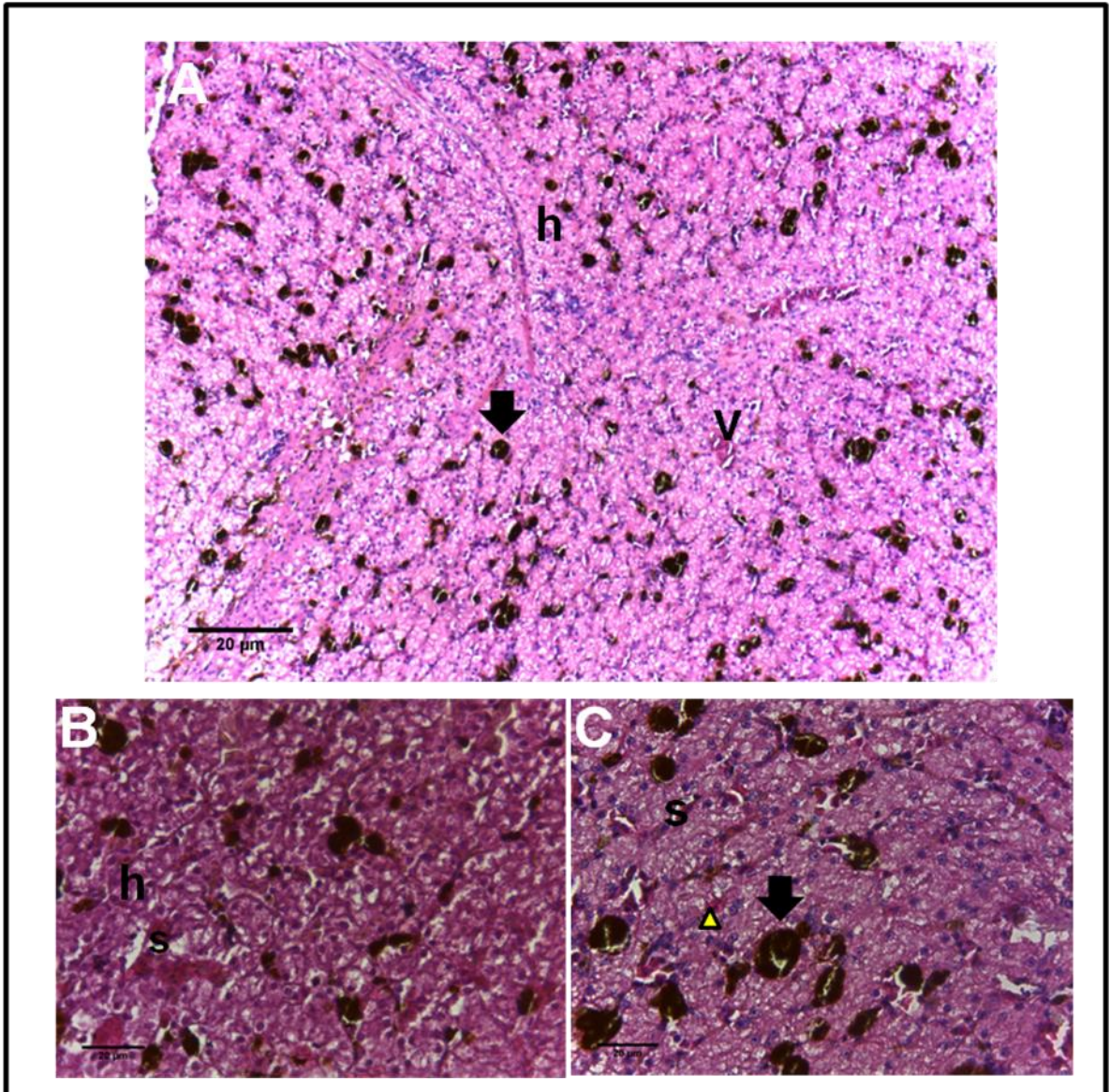


Figura 2.20 Estructura hepática de individuos de *R. bergi* del sitio Ref 2 teñidos con H-E. Cortes histológicos en 10x (A); y 40x (B y C). Referencias: s (sinusoides), h (hepatocitos), v (vasos/venas), flecha negra (melanomacrófagos), cabeza de flecha (eritrocitos).

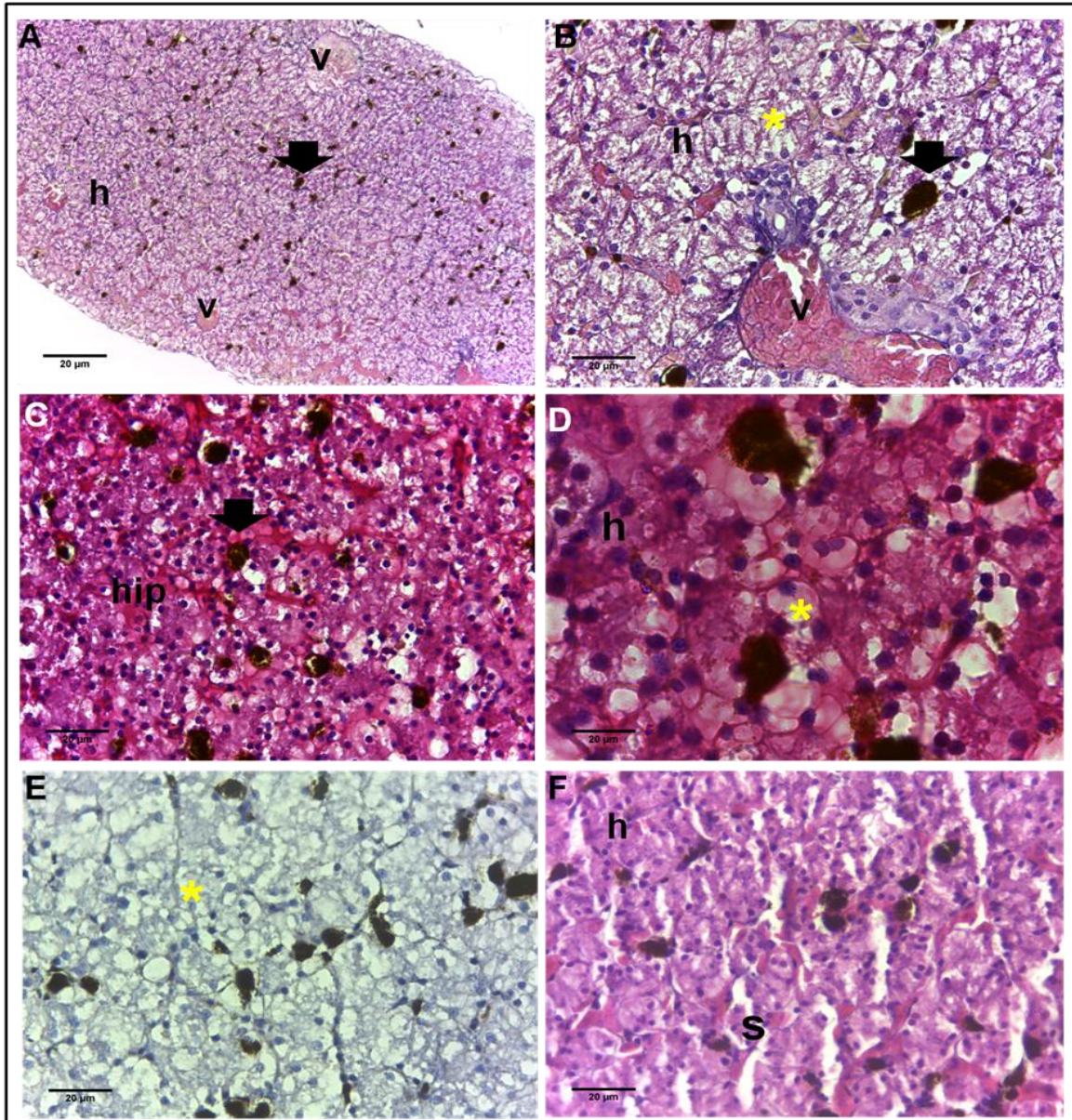


Figura 2.21 Estructura hepática de *R. bergi* de CA 2 teñidos con H-E. Estructura general vista en 10x (A) y 40x (B) donde se observan hepatocitos con vacuolas en su citoplasma y una vena dilatada; corte histológico en 40x (C) y detalle del mismo en 100 x (D) para observar las vacuolas en los hepatocitos; detalle en 40x con vacuolas en hepatocitos (E) y agrandamiento de sinusoides visto en 40x (F). Referencias: s (sinusoides), h (hepatocitos), v (vasos/venas), asteriscos (vacuolización de hepatocitos), flecha negra (melanomacrófagos), Hip (hipervascularización).

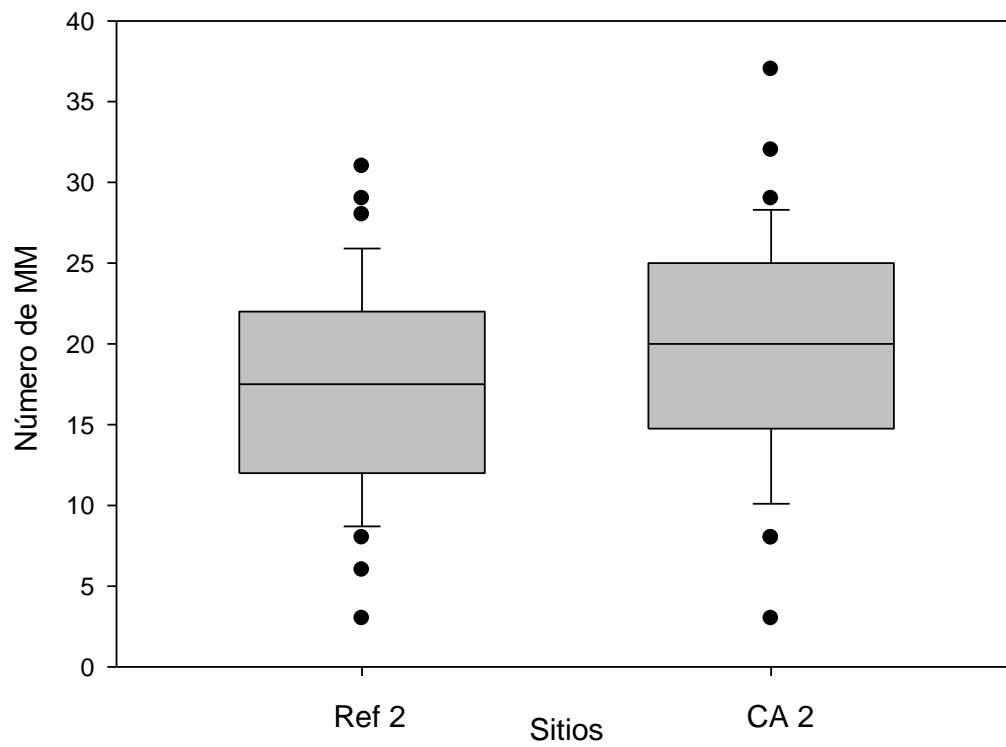


Figura 2.22 Número promedio de melanomacrófagos en hígados de *R. bergi* expresado como media \pm desvío en individuos colectados en el cultivo de arroz (CA 2) y en el sitio de referencia (Ref 2) de la provincia de Chaco.

Tabla 2. Resumen de valores obtenidos de los parámetros morfológicos e histológicos medidos en *Rhinella bergi* del cultivo de arroz (CA 2) y sitio de referencia (Ref 2) en la provincia de Chaco. Referencias: LHC (longitud hocico cloaca), Pe (peso), FCA (Factor de Condición Animal), VT (Volumen testicular), Epz (Espermatozoides), MMs (Melanomacrófagos).

PARÁMETROS MORFOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS	<i>Rhinella bergi</i>	
	CA 2	Ref 2
<i>Parámetros morfológicos</i>		
LHC (mm)	38,35±4,48	36,01±5,74
Pe (g)	4,34±1,44	4,31±2,24
FCA	0,18±0,16	0,21±0,20
VT (cm ³)	4,91±3,28	1,44±0,83
<i>Parámetros histológicos de testículos</i>		
N° de cistos con células en estadios tempranos	6,23±2,4	4,65±2,07
N° de cistos con células en estadios tardíos	10,95±7,10	13,15±7,85
<i>Proporción de túbulos con:</i>		
Nula cantidad de Epz en la luz tubular	41,67±38,60	55±42,70
Poca cantidad de Epz en la luz tubular	23,33±17,51	20±20,90
Moderada cantidad de Epz en la luz tubular	25±17,75	13,33±17
Abundante cantidad de Epz en la luz tubular	10±15,49	11,67±28
<i>Parámetros histológicos de hígados</i>		
Ateraciones histológicas	VH, AS, H, DVS	H, AS
Número de MMs	20,19±7,02	17,08±6,63

*Valores expresados como media±desvío estándar

* Los números en **negrita** indican valores significativamente diferentes entre sitios.

2.4 Discusión de resultados

Este estudio evalúa por primera vez la configuración histológica de gónadas e hígado de anuros adultos que habitan cultivos de arroz de la región nordeste de Argentina. Este tipo de investigación es importante en la zona Neotropical, donde la producción de arroz está ampliamente desarrollada y la biodiversidad de la región es alta y única (Ribeiro et al. 2017).

Los Anfibios son reconocidos como uno de los grupos de vertebrados más amenazados en el mundo (Stuart et al. 2004). Los Anuros ocurren en los agroecosistemas, como respuesta a la gran pérdida de hábitat producida por el avance de estas actividades sobre áreas naturales (Bishop et al. 1999; Knutson et al. 2004; McDaniel et al. 2008; Bionda et al. 2011). Estos vertebrados son importantes componentes de estos agroecosistemas, y además resultan muchas veces expuestos directamente a los agroquímicos que se utilizan para combatir especies no deseadas o dañinas para los cultivos, o indirectamente al consumir estos ítems-presa (Attademo et al. 2005; Attademo 2010).

El Factor de Condición Animal (FCA) es comúnmente utilizado para evaluar el estado fisiológico general de las especies (Zhelev et al. 2017). Ya que muchas sustancias químicas introducidas en el ambiente como consecuencia de las actividades humanas tienen la capacidad de perturbar el sistema inmune de la fauna silvestre (Gilbertson et al. 2003). Algunos estudios registran un menor FCA en poblaciones de *Pelophylax ridibundus* que habitan en áreas contaminadas (contaminación de aguas residuales domésticas y contaminación de metales pesados) respecto a poblaciones de áreas no contaminadas (Zhelev et al. 2015); y en poblaciones de la misma especie que habitan en cultivos de arroz en Bulgaria respecto a sitios de referencia (Zhelev et al. 2017). Así como también, en *Fejervarya limnocharis* que habitan cultivos de arroz con uso intensivo de herbicidas respecto a cultivos orgánicos en Tailandia (Thammachoti et al. 2012). En cambio, los resultados de la presente tesis revelan que el FCA de machos de *L. limellum* y *R. bergi* no difirieron significativamente entre los sitios estudiados (CA 1 y Ref 1, CA 2 y Ref 2). Por

lo tanto, según este parámetro, la condición fisiológica general de estos individuos no sería diferente entre ambos sitios, o dicho de otra manera no sería afectada por la actividad agrícola. Probablemente los individuos consumen la gran diversidad de invertebrados existentes en estos ambientes (Bambaradeniya et al. 2004) lo cual provee valor nutricional (Peltzer et al. 2010) para mantener sus parámetros corporales constantes. Resultados similares fueron hallados por Sánchez et al. (2011) con *Rhinella fernandezae* y *Dendropsophus sanborni* en tres ambientes con distinto grado de alteración. En referencia a esto, tampoco se han registrado variaciones significativas en la LHC y Pe, entre sitios en ninguna de las dos especies utilizadas en este estudio en los dos sitios estudiados.

En tres individuos del sitio CA 2, se han registrado anomalías en los miembros (dos casos de sindactilia y un caso de ectromelia). Si bien, no se ha realizado la medición de agroquímicos en dicho sitio, es muy probable que los individuos hayan estado expuestos a diversos plaguicidas en algún momento de su desarrollo, dado que en el agroecosistema se aplican numerosos compuestos químicos para control de plagas (Vizgarra 2018). Muchos de ellos han sido mencionados anteriormente y probablemente sean similares a los registrados en el CA 1 (Ver Anexo, Tabla 2).

Muchos factores son considerados como causantes de las anomalías (radiación UV, traumas, infección parasitaria por tremátodos, xenobióticos y/o otras sustancias químicas) (Ouellet 2000). En este caso, los hallazgos fueron exclusivos del sitio agrícola y no se ha registrado ningún caso en el sitio de referencia. Similares resultados fueron encontrados por Oullet et al. (1997), quienes reportaron anomalías en miembros de anuros que habitan áreas expuestas a la escorrentía de agua con plaguicidas en Canadá. Taylor et al. (2005), también encontraron que en los individuos colectadas en áreas próximas a zonas con agricultura en Estados Unidos, se incrementa el riesgo de poseer anomalías en miembros. En Argentina, Peltzer et al. (2011), registraron diversos casos de anomalías en anuros de la región centro-este colectados en agroecosistemas, suburbios y sitios de referencia

durante 9 años. Como resultados mencionan que en los tres sitios registraron 12, 7 y 3 tipos de anormalidades, respectivamente. Y en todos los casos la ectromelia fue la anormalidad más abundante en esos anuros. En otro estudio realizado en el nordeste de Buenos Aires para determinar el tipo y prevalencia de anormalidades en cinco poblaciones de anuros en zonas agrícolas y áreas de referencia, encontraron mayor prevalencia en las primeras, probablemente en relación al registro de plaguicidas, bajo nivel de oxígeno disuelto y así como también a otros factores de estrés no evaluados en dicho trabajo (Agostini et al. 2013). Las anormalidades pueden afectar la supervivencia, ya que pueden interferir, dependiendo de la especie que se trate, con la natación o salto, forrajeo, alimentación, reducir el escape ante depredadores, entre otros efectos.

El volumen testicular (VT) es una medida morfológica comúnmente utilizada en estudios de biología reproductiva de anuros (Martori et al. 2005). El VT no difirió en *R. bergi* y *L. limellum* entre sitios estudiados. Se podría hipotetizar, tal como proponen Martori et al. (2005) para *R. fernandezae*, que como los individuos de este estudio fueron colectados en periodos en los que están en actividad (Curi et al. 2014), los testículos pueden estar activos y potencialmente preparados para la reproducción de las especies en ambos sitios. Por otro lado, estos resultados también sugieren que éste parámetro no es específico y puede variar por otras causas externas (condiciones climáticas, variaciones intraespecíficas, estado reproductivo, edad, etc.) (Rastogi et al. 1976; Huang et al. 1997). Por lo tanto, no se puede establecer una relación ya sea positiva o negativa entre el volumen testicular con la actividad agrícola que se desarrolla en los sitios. En cambio, en machos de *Xenopus laevis*, expuestos a atrazina por 48 h durante la diferenciación sexual, mostraron una disminución en el volumen testicular y reducción de células germinales primordiales (Tavera-Mendoza et al. 2002a).

Una anomalía gonadal registrada en ambas especies fue el tamaño irregular entre ambos testículos en una proporción de 18,51 % en CA 1 vs 0 % en Ref 1 (*L. limellum*) y 16,66 en CA 2 vs 0% en Ref 2 (*R. bergi*). Esto también ha sido registrado por Sánchez et al. (2011), en *R. fernandezae* y *D. sanborni*,

en áreas agrícolas y áreas de transición respecto a sitio control. Y por Coady et al. (2004) luego de exponer a individuos de *Litobathes clamitans* y por Coady et al. (2005) al exponer a *Xenopus leavis* en condiciones de laboratorio al herbicida atrazina. Sin embargo, las incidencias no pudieron ser consideradas significativamente diferentes entre los tratamientos. Las causas de esta anormalidad no han sido comprobadas, pueden deberse a un retraso en la maduración de los testículos, tal como proponen Jooste et al. (2005) en su estudio.

La pigmentación testicular forma parte de un sistema pigmentario extracutáneo cuya función es poco conocida (Oliveira y Zieri 2005). Dentro de las células pigmentarias, los melanocitos se encuentran en la piel, vísceras, y en las gónadas (Oliveira et al. 2002; 2003a; Oliveira y Zieri 2005). En anuros esta pigmentación es variable y ha sido descrita en algunas especies tales como *Emphemphix (Physalaemus) nattereri* (Oliveira y Zieri 2005; Zieri et al. 2007, 2015); *Physalaemus cuvieri*, *Rhinella ornata* y *Scinax fuscovarius* (Oliveira et al. 2002, 2003a). En las especies utilizadas en este estudio, *L. limellum* posee testículos con una coloración negruzca en la mayoría de los casos, debida a la presencia de melanocitos que están presentes en la túnica albugínea y en el tejido intersticial. Esto también fue descrito por Ferreira et al. (2008) para la misma especie. En cambio, *R. bergi* contiene testículos de color blanco-amarillento, y no se observan pigmentos en su superficie. Hay autores que consideran que los melanomacrófagos y melanocitos pueden modificar la intensidad de pigmentación como respuesta a cambios en temperatura, hibernación, hipoxia, infección, estrés oxidativo, uso exógeno de hormonas, etc (Barni et al. 1999, 2002; Franco-Belussi y Oliveira 2011; De Souza Santos et al. 2014; Zieri et al. 2015). La función fisiológica de la presencia e intensidad de melanocitos en los testículos no está claramente resuelta, aunque se esperaría que los melanocitos presentes en el testículo, cumplan la misma función de los otros tipos de pigmentos extracutáneos, es decir, proteger los tejidos del daño oxidativo y de agentes tóxicos (Franco-Belussi y Oliveira 2011), actuar como un antioxidante y proteger contra el daño en el ADN (Franco-Belussi et al. 2016), protección contra rayos UV (Ortonne 2002). Existen evidencias de que en

Physalaemus nattareri aumenta la pigmentación en testículos luego de tratamientos con testosterona (Zieri et al. 2015), ellos mencionan que los melanocitos testiculares podrían porteger a las gametas del estrés. En este caso, se observó que los ejemplares de *L. limellum* del sitio CA 1 contenían testículos sin pigmentación (1 individuo), con poca pigmentación (1 individuo), parcialmente pigmentados (3 individuos), y con el testículo pigmentado (1 individuo). En cambio, los individuos del sitio Ref 1 contenían el testículo pigmentado (5 individuos), y solo uno con el testículo parcialmente pigmentado. A pesar de encontrar esta variación entre sitios, no podemos asociar firmemente con alguna causa específica, o asumir que se deba al efecto del agroecosistema, posiblemente las variaciones sean intra específicas, así como fue registrado para *Dendropsophus* y *Scinax* en el estudio de Franco-Belussi et al. (2017). Además consideramos importante analizar la pigmentación testicular como respuesta a diferentes condiciones ambientales y en distintos estadios (larvales, juveniles, adultos) o bien en distintos periodos durante el año, para tener un análisis más abarcativo de otros factores que podrían influir.

El análisis histológico de los testículos de las especies utilizadas para este estudio revelan que poseen la misma estructura y composición celular descrita para la mayoría de las especies de anuros (Oliveira et al. 2003b; De Souza Santos y Oliveira 2008). La espermatogénesis y la esteroidiogénesis ocurren dentro de los túbulos seminíferos y tejido intersticial del testículo, respectivamente. El control de la espermatogénesis se realiza mediante hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH), gonadotropinas, y andrógenos (Uribe Aranzábal 2011).

En *L. limellum* y *R. bergi*, se evidenciaron una mayor proporción de cistos con células en estadios tempranos de la espermatogénesis (Epg, Epl, EplI) en los individuos de los sitios agrícolas (CA 1 y CA 2), respecto a los sitios de referencias (Ref 1 y Ref 2). Pero no hubieron diferencias significativas en la proporciones de túbulos con cistos de células en estadios tardíos de la espermatogénesis (Ep, Epz), entre sitios, en ninguna de las dos especies.

En *L. limellum* la actividad espermatogénica es clasificada como continua por Ferrerira et al. (2008) en el Pantanal (Mato Grosso do Sul, Brasil), es decir, los testículos contienen en los túbulos seminíferos células en todos los estadios de maduración a lo largo del año. Respecto a la presencia de espermatozoides libres en el lumen de los túbulos, los individuos de *L. limellum* del sitio Ref 1 contenían mayor proporción de túbulos con moderada y abundante cantidad espermatozoides libres en el lumen, respecto a los del sitio CA 1. Y fue significativamente mayor la proporción de túbulos sin espermatozoides en el lumen en individuos del sitio CA 1. Además, en estos individuos se evidenciaron espacios en la luz de los túbulos seminíferos, lo que indicaría la presencia de menos cistos de células germinales. Estos últimos resultados, podrían indicar que el proceso espermatogénico estaría alterado en estas especies, el mecanismo por el que esto ocurriría debería ser investigado en profundidad incluyendo análisis hormonales, para poder indicar si existe disrupción endócrina en las especies que habitan en agroecosistemas (Rohr y McCoy 2010). Dutta y Meijer (2003) y Dutta et al. (2006) encontraron incremento en el área de el lumen de los túbulos seminíferos luego de la exposición durante 72 h a endosulfan y diazinon, en testículos de *Lepomis macrochirus*, respectivamente. McCoy et al. (2017) también registraron una espermatogénesis reducida en individuos de *Rhinella marinas* colectadas en áreas agrícolas. El número de espermatoцитos primarios, secundarios y espermátidas fue significativamente menor en áreas agrícolas, así como también la cantidad de espermatozoides, respecto a individuos de áreas no agrícolas. Estos últimos autores hipotetizaron que la reducción en el número de células espermatogénicas se deben a alguna alteración en el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis en esos machos. Asimismo, en otro estudio encontraron reducción de la concentración plasmática de testosterona en la misma especie en machos de áreas agrícolas (McCoy et al. 2008). Otros autores también encuentran que la atrazina inhibe la producción de andrógenos y estimula la de estrógenos (Crain et al. 1997; Sanderson et al. 2000; Hayes et al. 2002). Estos datos son importantes porque las disfunciones hormonales

causadas por la exposición a agroquímicos, son responsables de las alteraciones en la espermatogénesis.

Por el contrario, en *R. bergi*, hubo diferencias significativas solamente para los túbulos con nula cantidad de espermatozoides en el lumen, que fue mayor en individuos del sitio Ref 2., y moderada cantidad de espermatozoides libres, que fue mayor en individuos de CA2. *Rhinella bergi*, posee una reproducción explosiva (Schaefer et al. 2006), al igual que otros congéneres: *Rhinella dyptlica*, *R. icterica*, *R. ornata* (Bertoluci y Rodriguez 2002; Dos Santos et al. 2007; Freitas 2013), es decir que la reproducción ocurre en solo algunos días (Wells 1977). Probablemente, por esta razón la cantidad de espermatozoides en el lumen de estos individuos no fue abundante, pero tampoco hubo grandes diferencias entre sitios. Por lo tanto, en estos individuos no se puede determinar que la espermatogénesis este afectada, al menos las fases finales de la misma.

Se ha demostrado mediante análisis de muestras de agua y suelo en CA 1, la presencia de ciertos compuestos (herbicidas, 1 insecticida y 1 fungicida, Ver ANEXO, tabla). Entre los compuestos detectados, existen evidencias de que el herbicida glifosato en cuerpos de agua donde habita *Rhamdia quelen* causa efectos sobre la reproducción, altera los valores esteroideogénicos (disminución de 17- β estradiol) y la viabilidad de los huevos (Soso et al. 2007). Además Howe et al. (2004), propusieron que dos formulados comerciales con glifosato (Roundup Original® y Roundup Transorb®) inducen desarrollo gonadal anormal en *Lithobates pipiens*, e inducción de OT en larvas de anuros, y por lo tanto lo consideran como una sustancia con característica de disruptor endócrino. Respecto al herbicida clomazone, existen pocos estudios sobre sus efectos en Anfibios (De Oliveira et al. 2016). Y a cerca de los otros compuestos registrados (tebuconazole, AMPA, e imidacloprid), no existen referencias de estudios que aborden sus efectos en parámetros reproductivos.

Por otra parte, hay autores que consideran que una gónada intersexo, es aquel testículo que contiene ovocitos identificable en secciones histológicas (Hyne et al. 2009), y otros consideran a un individuo como hermafrodita al

contener ovocitos en los testículos (Hayes et al. 2003). Para el caso de *R. bergi* colectada en el sitio Ref 2, se registró la presencia de ovocitos embebidos dentro del tejido testicular en secciones histológicas de tres individuos. Pero esto no se observó para el caso de *L. limellum* en ninguno de los sitios. En otro estudio similar, Sánchez et al. (2011) registraron un individuo de *R. fernandezae* y tres individuos de *D. sanborni* con ovocitos testiculares, sin ser exclusivo de sitios contaminados. Skelly et al. (2010) evaluaron la presencia de individuos de *R. clamitans* intersexo, en cuatro tipos de ambientes con diferentes tipos de cobertura de tierra (sin desarrollo o cobertura, agrícola, suburbano, urbano), y encontraron en un 30% de los individuos analizados la presencia de OT. En el ambiente suburbano encontraron la mayor frecuencia de OT (21%), y en el área agrícola un 6 %, por lo tanto mencionan que no pudieron hallar una asociación entre la presencia de OT con la cobertura agrícola. Y que habría otros mecanismos que determinan la presencia de intersexos en las poblaciones naturales. Entre ellos mencionan la presencia de compuestos estrogénicos, que son comúnmente encontrados en sitios con gran densidad humana, y de los cuales se conocen sus efectos en anfibios (Mackenzie et al. 2003; Pettersson y Berg 2007). Papoulias et al. (2013) no encontraron asociación estadísticamente significativa entre la presencia de OT entre individuos metamórficos de *Lithobates blairi* colectados en cuatro sitios que recibían escorrentía de áreas agrícolas (dos cercanos y dos a más de 50 m de los cultivos) en Sur de Nebraska. Por otro lado, Murphy et al. (2006), tampoco encontró relación entre la actividad agrícola (presencia de atrazina) con la incidencia de hermafroditismos y OT. Ya que habían OT en ambos sitios (agrícola y no agrícola), y la mayor frecuencia fue registrada en juveniles de *Lithobates pipiens*. En adultos de *Xenopus laevis* que habitan cuerpos de agua de zonas de cultivo de maíz en Sudáfrica, no se encontró diferencias en el desarrollo gonadal y tipos celulares en testículos de especies de dicho sitio en comparación a sitios no cultivados (Smith et al. 2005).

En cambio, McCoy et al. (2008) encontraron que el número y frecuencia de anomalías gonadales por ejemplo individuos intersexos (aquí caracterizados como individuos con gónadas que contienen tejido ovárico y

testicular), en *Rhinella marina*, incrementaron en relación al gradiente de actividad agrícola. El herbicida glifosato también ha sido asociado con la inducción de OT en machos y desarrollo ovárico anormal en concentraciones de 0.6 y 1.8 mg/l (Howe et al. 2004). Tavera-Mendoza et al. (2002a) y Hayes et al. (2003) proponen que la atrazina causa feminización en machos por la inducción de aromatasa que produce una reducción en los andrógenos e incrementa los estrógenos. Ciertos compuestos estrogénicos, como por ejemplo el estradiol, etinilestradiol, nonilfenol, y antiestrogénicos, se lo han utilizado para demostrar que los mismos afectan la diferenciación sexual y desarrollo gonadal en *L. pipiens* y *L. sylvaticus* (Mackenzie et al. 2003).

En los anuros existen tres patrones de diferenciación sexual gonadal (Gramapurohit et al. 2000). El tipo “diferenciado”, un tipo “indiferenciado” y un tipo “semidiferenciado”. Esto implica que sobre todo en el tipo semidiferenciado e indiferenciado existe un momento que puede ser considerado como hermafroditismo o algunos autores lo llaman “ovotestes” (Eggert 2004). Estos datos ponen de manifiesto la importancia de tener en cuenta el tipo de diferenciación que poseen las especies, para no confundir con una posible alteración, como puede ser el caso de la presencia de ovocitos testiculares observados durante el desarrollo (Storrs-Méndez y Semlitsch 2010).

Con respecto a los resultados aquí expuestos, y en relación al registro de OT en los individuos de *R. bergi* del sitio Ref 2, no podemos asumir que se corresponda con una gónada intersexo, o bien a una alteración histológica. En primer lugar, el OB característico de estas especies se encuentra en la parte craneal de la gónada, y morfológicamente se observó que ambos tejidos se hallan uno a continuación de otro como se observó en las secciones histológicas de la figura 2.18. Como se puede ver en la sección histológica de la figura 2.18 D, el ovocito está en la parte más externa del testículo, y puede corresponder a parte del OB. En segundo lugar, estos se registraron en un sitio en el que no se registra actividad agrícola, entonces una asociación con la misma resulta menos probable, aunque no se descarta por completo la

presencia de otros contaminantes (por ej. algún contaminante emergente o compuesto con actividad estrogénica).

La estructura del OB, es similar a la descrita para otras especies tales como *Rhinella dyptchica* (Freitas et al. 2015), *Bufo bufo* (Falconi et al. 2007), *Rhinella icterica* (Farias et al. 2002). En todos los casos, se encontraron dentro del OB ovocitos previtelogénicos, los cuales son identificables por la presencia de un núcleo central claro con varios nucléolos y un citoplasma homogéneo comparables a ovocitos en fase de crecimiento primario (Uribe Aranzábal 2011). Al comparar la estructura del OB en los individuos se encontró la presencia de células conteniendo pigmentos, de color oscuro, en la médula de individuos de *R. bergi* de CA 2, no así en ninguno de los individuos analizados de Ref 2. Freitas (2013) registran lo mismo en el OB de *R. dyptchica* y sugieren que estas células tienen actividad fagocítica, es decir pueden fagocitar material celular residual eliminado, o puede ser una característica adaptativa de las especies a su ambiente (Freitas et al. 2015). En relación a esto, se registró en el mismo individuo que contenía gran cantidad de pigmentos en la médula, la presencia de varios folículos atrésicos. Por otro lado, vacuolas corticales, tal como se observó en *R. bergi* de CA 2, también ha sido observado en folículos del OB de *R. dyptchica* expuestos durante 3 a 7 días a 17β estradiol (Freitas 2013). Scaia (2011) confirman la actividad esteroideogénica del OB, y reportan que hay una reducción significativa en el peso del OB durante el periodo pre-reproductivo y un incremento en el periodo reproductivo. Es decir que su estructura puede variar en respuesta a otros factores, pero en este caso las alteraciones solo han sido registradas en individuos de CA 2.

La utilización del hígado como un órgano blanco, para estudiar los efectos de los agroquímicos u otras sustancias tóxicas es empleada en la rama de la Ecotoxicología. Este órgano juega un rol importante en los procesos de biotransformación de xenobióticos, mediante la función de los hepatocitos y los MMs (Fenoglio et al. 2005). En este sentido, a pesar de que muchos autores mencionan que el uso de los MMs es útil como biomarcador histológico en larvas (Bach et al. 2018; Curi et al. 2019; Pérez Iglesias et al. 2019) y anuros

adultos expuestos a distintos agroquímicos en condiciones de laboratorio (Paunescu et al. 2010; Cakici 2015; De Gregorio et al. 2016; Pérez Iglesias et al. 2016), son escasas las referencias de individuos colectados en ambientes naturales. Se menciona el trabajo de Huespe et al. (2017) en el que encontraron una mayor cantidad y área ocupada por MMs en hígados de ejemplares de *Leptodactylus chaquensis* de un cultivo de arroz colectados 7 días posteriores a la aplicación de clorpirifos, en comparación a un sitio de referencia. De igual manera, Jantawongsri et al (2015), concluyeron que el uso de herbicidas afecta el sistema inmune de *Fejervarya limnocharis* en áreas agrícolas en Nan Province (Tailandia). Además, encontraron que el número de MMs en distintos periodos analizados era mayor en los sitios contaminados con herbicidas que en los controles.

En los individuos analizados para esta tesis, solo en *R. bergi* se encontró diferencia significativa entre el número de MMs en hígado de los individuos de CA 2 respecto a Ref 2, siendo mayor el número en los pertenecientes al cultivo de arroz. Mientras que en *L. limellum*, la diferencia no fue estadísticamente significativa entre sitios.

Además, se han registrado otras alteraciones en las secciones hepáticas analizadas: agrandamiento de sinusoides (35,71 %) y venas o vasos dilatados (5,55 %) en *L. limellum* de CA 1; y vacuolización de hepatocitos (41,66 %), agrandamiento de sinusoides (33,33 %), hipervascularización (11,11 %) y dilatación de venas (5,55 %) en *R. bergi* de CA 2. Y en *R. bergi* de Ref 2, se ha registrado un 8.33 % de los campos con hipervascularización y un 2.77 % con agrandamiento de sinusoides. Muchas de estas alteraciones también se han observado en hígado de *P. albonotatus* expuestos a 2,4-D Amina Zamba® (Curi et al. 2019). En renacuajos de *Leptodactylus latrans* expuestos a Roundup® Ultramax y glifosato (Bach et al. 2018). Y en un estudio reciente, Pérez Inglesias et al. (2019), encontraron en larvas de *Rhinella dyphthica* luego de la exposición a atrazina (SIPTRAN 500SC®) durante 48 y 96 h, un incremento de vascularización y agrandamiento de sinusoides hepáticos.

Según Loumbordis (2007), los organismos están constantemente expuestos a contaminantes naturales o provenientes de actividades humanas. Ellos encontraron que el área ocupada por MMs era alta en individuos de *Phelophylax ridibundus* colectados en un río en el norte de Grecia, y postularon que varios factores ambientales entre ellos la contaminación por metales pesados serían responsables de las alteraciones histológicas observadas.

Como se ha mencionado en el Capítulo I una gran variedad de productos farmacéuticos y sus metabolitos, son comúnmente registrados en ambientes acuáticos (Kolpin et al. 2002; La Farré et al. 2008). Para muchos de estos compuestos, se ha documentado efectos adversos sobre en anuros (Hogan et al. 2008; Carlsson et al. 2009; Cardoso-Vera et al. 2017; Peltzer et al. 2017, 2019). La presencia de muchos de estos compuestos en ambientes acuáticos (Zhang et al. 2014) o zonas donde los anuros se desarrollan pueden explicar la alta presencia de MMs en hígado de los individuos de los cultivos, así como también potencialmente en sitios que uno a priori considera de referencia o forestales, ya que no se puede descartar en estos ambientes la presencia de otros contaminantes que son derivados de actividades humanas (Daughton y Ternes 1999).

Por otro lado, en el sitio CA 1 se registraron en suelo los herbicidas bentazon, clomazone, el insecticida imidacloprid, el fungicida tebuconazole y AMPA (producto de degradación del glifosato); y en el agua (bentazon, glifosato, AMPA) (ver Anexo). Esto podría explicar, la alta cantidad de MMs presentes en el hígado, como así también la mayor cantidad de alteraciones histológicas registradas en estos individuos. Respecto a los productos agroquímicos registrados, existen evidencias que demuestran los efectos deletéreos en diferentes especies de anfibios y sobre distintos aspectos biológicos de las especies (Pérez Iglesias et al. 2014; Menezes Franca et al. 2015; Bernabó et al. 2016; De Oliveira et al. 2016; Hrynyk 2017; Freitas et al. 2017). Se conocen además evidencias de los efectos del clomazone sobre hígados de *Rhombdia quelen* (Crestani et al. 2007) y *Lithobates catesbeianus*

(De Oliveira et al. 2016), observándose que los efectos ocurren entre entre 0.5 y 1 mg/l de este herbicida.

Respecto al sitio Ref 1, al contrario de lo esperado, se ha detectado en el suelo la presencia del herbicida bentazon ($1,1 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$). Para dicho compuesto, Menezes Franca et al. (2015) registraron una CL_{50-96h} para renacuajos de *L. catesbeianus* de 4530 mg/l y mencionan en que la concentración ambiental estimada es 0.96 mg/l. La detección de dicho herbicida, probablemente en conjunto con otros factores no analizados en este trabajo, podría influir en la presencia y cantidad de MMs en hígado de individuos provenientes de Ref 1. Se considera importante, en futuros estudios, evaluar la presencia de MMs en hígado teniendo en cuenta la etapa del desarrollo, por ejemplo analizando renacuajos, juveniles y adultos del mismo sitio, para descartar, por ejemplo, que se trate de una condición fisiológica normal propia de especie.

CAPÍTULO III

“Efectos letales y subletales causados por la exposición a un formulado comercial en base a 2,4-D en renacuajos de *Physalaemus albonotatus* (Anura: Leptodactylidae)”

3. Capítulo III: Efectos letales y subletales causados por la exposición a un formulado comercial en base a 2,4-D en renacuajos de *Physalaemus albonotatus* (Anura: Leptodactylide)

3.1 Introducción

La intensificación de las actividades agrícolas y la contaminación del medio ambiente con pesticidas, fertilizantes y otras sustancias químicas tóxicas se encuentran entre los factores más importantes que afectan a los sistemas ecológicos acuáticos y terrestres (Relyea y Hoverma 2006) y se ha sugerido que desempeñan un papel importante en el fenómeno de declinación de los Anfibios (Carey y Bryant 1995; Davidson et al. 2002).

Los anuros están entre los grupos de vertebrados más vulnerables a los plaguicidas, principalmente debido a sus características biológicas y ecológicas (Marco et al. 2001), y a que durante su metamorfosis como en su etapa adulta dependen de sistemas acuáticos rodeados o inmersos en cultivos (Piha et al. 2004, Knutson et al. 2004; Peltzer et al. 2006). En este sentido, es importante mencionar que las etapas embrionarias y larvales de los anuros se consideran períodos críticos en el desarrollo, ya que los sistemas de órganos se desarrollan y diferencian durante este periodo (Storrs y Semlitsch 2008). Por este motivo estos organismos son considerados buenos indicadores de salud ambiental (Wake y Vredenburg 2008).

La exposición a agroquímicos puede ocurrir de forma directa a partir de las aplicaciones de plaguicidas sobre los cultivos o indirectamente como producto de lixiviación, escorrentía y deriva de estos contaminantes de áreas agrícolas a ambientes acuáticos (Peltzer et al. 2008; Berger et al. 2013; Bruhl et al. 2013) (Fig. 3.1).

Se ha demostrado que la atrazina (triazina), clorpirifós (organofosforado), glifosato (aminofosfonato), cipermetrina (piretroide), carbaril (carbamato), pueden alterar diversos procesos biológicos de los anuros como crecimiento (Metts et al. 2005; Widder y Bidwell 2008), desarrollo y metamorfosis (Boone 2008; Hayes y Wu 1995), metabolismo (Attademo et al. 2007, 2015; Lajmanovich et al. 2011), comportamiento (Punzo 2005; Relyea 2005a; Teplitsky et al. 2005). Otros plaguicidas pueden producir efectos genotóxicos (daño en el ADN), en anuros expuestos a herbicidas basados en

fluorocloridona (Nikoloff et al. 2014) o en aquellos expuestos a la eutrofización por aumento nitrógeno, fósforo y presencia de organoclorados en aéreas agrícolas (Peltzer et al. 2008). Así como también muchos compuestos agroquímicos pueden causar efectos sobre la reproducción tal como fue mencionado en detalle Capítulo II (Hayes et al. 2002, 2003, 2006 a, b; Sánchez et al. 2014).

Los estudios ecotoxicológicos utilizando estadios larvales de anuros, son importantes porque permiten conocer si ciertos procesos que ocurren durante este periodo se ven afectados por exposición a compuestos químicos. Por ejemplo, el desarrollo gonadal masculino y femenino ocurre en la mayoría de los anuros antes del clímax metamórfico (excepto en los bufónidos, Ogielska y Kotusz 2004, Goldberg 2014). Se ha demostrado que ciertas sustancias químicas con actividad estrogénica o androgénica, influyen o afectan el proceso de diferenciación gonadal (Säfholm et al. 2005; Petterson et al. 2006; Duarte-Guterman et al. 2010; Liu et al. 2017). Muchos agroquímicos, incluyendo herbicidas (por ejemplo dimetomorf, fenhexamida, quinoxifeno, ciprodinil, etc), poseen actividad anti-androgénica (Orton et al. 2011), y su mayor pico de aplicación coincide con el periodo de reproducción y por ende con las primeras etapas de desarrollo de la mayoría de las especies de anuros (Orton et al. 2018). En larvas de anuros, la mayoría de los estudios se han centrado en el efecto del herbicida atrazina (Tavera-Mendoza et al. 2002 a, b; Hayes et al. 2002, 2003; Carr et al. 2003; Coady et al. 2004, 2005; Kloas et al. 2009) sobre aspectos morfológicos e histológicos de las gónadas durante el desarrollo por su capacidad de causar disrupción endócrina. También se ha evaluado el efecto de otras sustancias químicas de origen antrópico como el nonisfenol (Scaia et al. 2019), bisfenol A (Levy et al. 2004), etinilestradiol (Petterson et al. 2006; Tompsett et al. 2012), tetrabromoetilciclohexano (Liu et al. 2017) sobre el proceso de desarrollo gonadal en anuros.

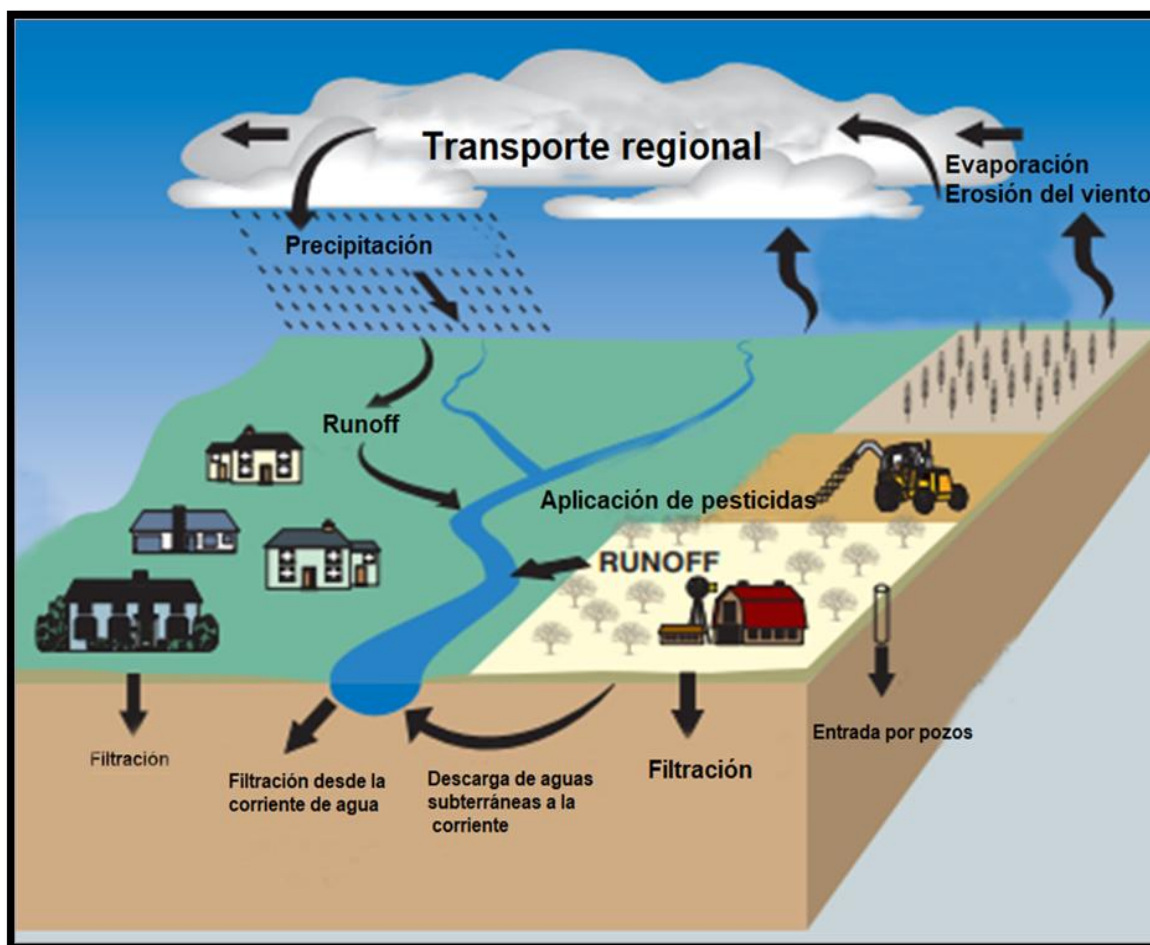


Figura 3.1 Posibles destinos de los agroquímicos luego de su aplicación. Imagen tomada y modificada de Barbash y Resek (1996).

Muchos de los efectos de los agroquímicos, pueden detectarse tempranamente durante el desarrollo larval, y los procesos fisiológicos que ocurren durante el mismo, pueden verse afectados (Bach 2018). La utilización de diferentes biomarcadores en estos estudios sirve para una mayor comprensión de los efectos y el modo de acción de los compuestos. Ciertos productos utilizados en las actividades agrícolas afectan el sistema inmune de los anfibios, y por consiguiente, estos individuos se vuelven más susceptibles a la infección de patógenos y/o al efecto de otros estresores (Hayes et al. 2006b; Jantawongsri et al. 2015).

Tal como se mencionó en el capítulo anterior, los melanomacrófagos (MMs) juegan un importante rol en la respuesta inmune y detoxificación de contaminantes

(Van der Oost et al. 2003). Estas células están presentes en el hígado y son capaces de producir y almacenar melanina en su citoplasma, entre otros pigmentos. Y pueden participar en la destrucción, desintoxicación y reciclaje de materiales endógenos y exógenos (Agius y Roberts 2003; Passantino et al. 2013). Diversos estudios han demostrado que el número de MMs aumenta luego de la exposición a sustancias tóxicas (Loumbourdis y Vogiatzis 2002; Paunescu et al. 2010; Bach et al. 2018). Para renacuajos, existen pocos estudios en los que utilizan los MMs como biomarcadores de exposición a agroquímicos (De Oliveira et al. 2016; Bach et al. 2018). Por lo que resulta interesante evaluar como responden los individuos en etapas larvales a los compuestos agroquímicos y la respuesta a nivel hepático.

3.1.1 Plaguicidas en Argentina: la situación del 2,4-D

El uso de pesticidas ha aumentado considerablemente en las últimas tres décadas (Villaamil Lepori et al. 2013). En Argentina, ocurrió un aumento en el consumo de aproximadamente 73 a 236 millones de kg por año en la última década de acuerdo a datos de la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE 2013). En asociación con este incremento, se registran cada vez más residuos de estos compuestos en distintos ambientes (Villaamil Lepori et al. 2013; De Gerónimo et al. 2014). Diversos estudios se realizaron para detectar la presencia de estos compuestos en cuerpos de agua cercanos a zonas agrícolas de Argentina (Marino y Ronco 2005; Aparicio et al. 2013; Bonansea et al., 2013; Lupi et al. 2015; Alonso et al. 2018).

El Ácido 2,4-diclorofenociacético (2,4-D) es el ingrediente activo usado en diversos formulados comerciales y es uno de los herbicidas más usados en el mundo (Wauchope et al. 1992). Fue el primer herbicida comercial introducido al mercado en la década del 40 (Islam et al. 2018), además fue uno de los herbicidas utilizado como Agente Naranja durante la guerra de Vietnam. Es un herbicida post-emergente selectivo sistémico utilizado para el control de especies de malezas de hoja ancha (principalmente dicotiledóneas) en cultivos de frutales y hortícolas, y en distintos cereales, etc (USEPA 2005). Particularmente, en los cultivos de arroz, se lo utiliza como post-emergente, en un momento del ciclo del cultivo en que los campos están completamente inundados (Fig. 3.2). Situación que aumenta considerablemente el

riesgo ecotoxicológico de los anfibios que habitan y se reproducen en esos humedales. Su vida media varía entre 20 y 312 días dependiendo de las condiciones ambientales (Ordaz-Guillén et al. 2014). Y la biodegradación por microorganismos en sedimentos y aguas superficiales es lenta (más de 20 días) (Chingombe et al. 2006).

Luego de la aplicación del herbicida 2,4-D, gran cantidad de este puede perderse para el medio ambiente por escorrentía alcanzando cuerpos de agua o sedimentos (Waite et al. 2002), y esto es favorecido por su alta solubilidad en agua y baja adsorción al suelo (Franco y Trapp 2010; González et al. 2016). El riesgo potencial de contaminación con residuos de herbicidas depende de la tasa de *runoff* o escurrimiento (Islam et al. 2018).

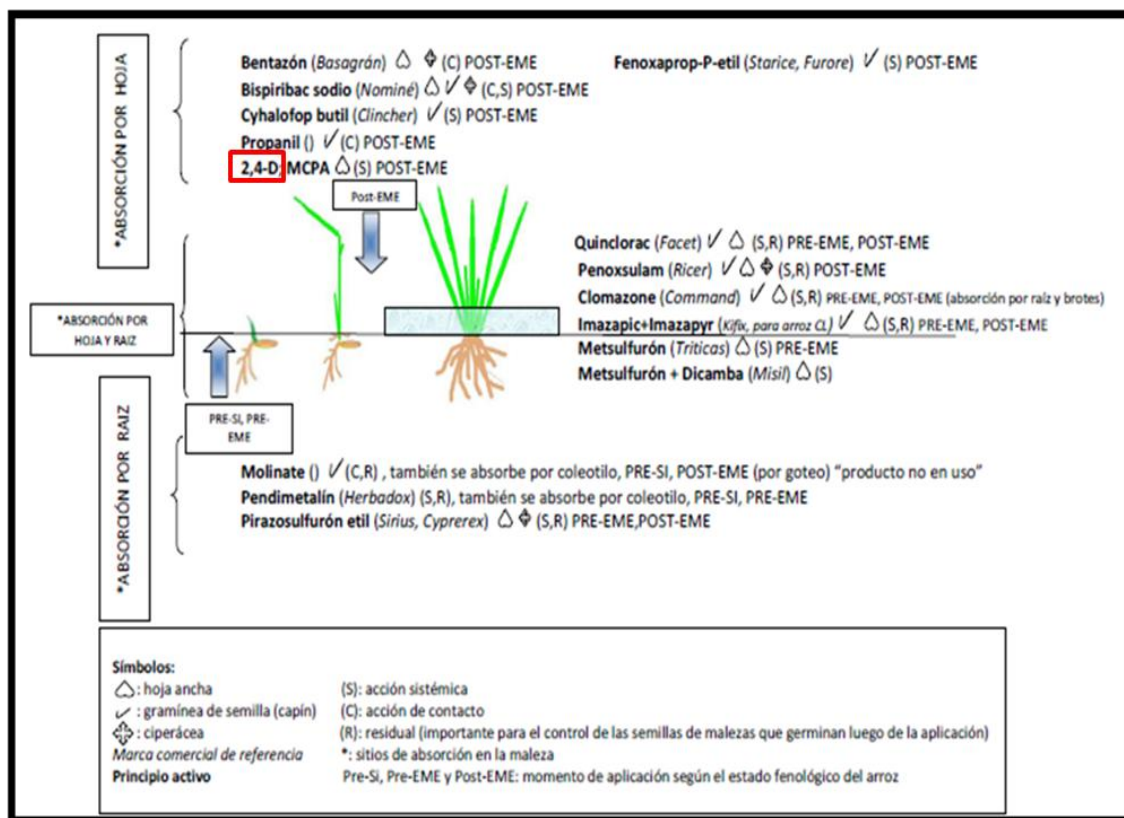


Figura 3.2 Herbicidas selectivos utilizados en arroz. Fuente: Asociación Correntina de plantadores de arroz (ACPA).

El 2,4-D modifica la plasticidad de la pared celular, causa incrementos anormales en la biosíntesis de proteínas y etileno, resultando en una incontrolada división celular que produce sobreestimulación del crecimiento, daño del tejido vascular y finalmente muerte de las plantas (Zimdahl 1993). Con pocas excepciones, los efectos y la toxicidad de las formas de sales y ésteres de 2,4-D son bastante similares a los de la forma ácida (USEPA 2005). Sin embargo, es importante tener en cuenta que en los formulados comerciales los surfactantes o coadyuvantes pueden modificar su nivel de toxicidad (Rodea-Palomares et al. 2015).

El herbicida 2,4-D es clasificado como de Clase II (moderadamente peligroso) (WHO 2009); y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC 2015) lo cataloga como posiblemente carcinógeno para los seres humanos (Grupo IIB), aunque algunos autores mencionan que este efecto no ha sido comprobado (Kennepohl y Munro 2001).

Las concentraciones de 2,4-D registradas en distintas partes del mundo y matrices ambientales es muy variable. En áreas agrícolas de Canadá, la mayor concentración de 2,4-D registrada en aguas superficiales fue 345 ng/l, y en sitios urbanos mixtos fue 1230 ng/l (Woudneh et al. 2007). En 19 ríos a lo largo de Canadá, se registró una concentración media de 172 ng/l de 2,4-D (Glozier et al. 2012). Este valor es considerado alto teniendo en cuenta que la Guía canadiense de calidad de agua predice una máxima concentración permitida de 4 µg/l of 2,4-D en agua dulce para proteger la vida acuática (CWQGs 2014). De acuerdo a Ismail et al. (2015), las concentraciones de este herbicida en periodos lluviosos y secos varía entre 8,55 y 329.42 µm/l en áreas cercanas a cultivos de arroz en Malasia. Luego de una aplicación directa en cultivos, se pueden detectar valores de hasta 50 mg/l de 2,4-D (Lilienfeld and Gallo, 1989; World Health Organization 1989).

En Sudamérica, la información sobre los niveles de 2,4-D en aguas superficiales es escasa (Palma et al. 2004). Particularmente, en Argentina, no existe información sobre la concentración real de 2,4-D en cuerpos de agua (Ruiz de Arcaute et al. 2016). En un informe presentado por el Instituto Correntino del Agua y del Ambiente (INCAA) concluyeron luego de evaluar la calidad de agua de las cuencas de los Ríos Corriente, Miriñay y del Sistema Iberá durante el periodo 2006-2014, que los valores registrados de los agroquímicos en sedimentos y agua eran esporádicos, ocasionales y discontinuos. Estos autores mencionaron que los biocidas que superan los límites permisibles son aldrin, alfaBHC, endosulfan y 2,4-D. Los registros de 2,4-D alcanzaron valores de hasta 219 ug/l en cuencas de la Laguna Iberá (Rujana et al. 2015).

En nuestro país, en los últimos años se prohibió o restringió el uso de este herbicida en algunas provincias como Chaco (Resol. 396/13), Tucumán (Resol. 619/5/Res.044), Santiago del Estero (Resol. 86/97(Disp. 20/98), Entre Ríos (Resol. 07/03), Córdoba (Resol. 112/16), Buenos Aires (Resol. 167/16). Particularmente, para la provincia de Santa Fe se prohibió el uso de este herbicida en la formulación de ester isobutílico, y se restringió el uso de la formulación sal dimetil amina (Resol. 135/15).

La toxicidad del 2,4-D ha sido demostrada en diferentes organismos como aves, pequeños invertebrados, peces, anuros, reptiles y algas (Oztas et al. 2011; Marcato et al. 2017). Existen evidencias de sus efectos en diversos artículos científicos (Wafa et al. 2012; Qurratu y Reehan 2016; Sharma et al. 2018). Se pueden mencionar estudios

que revelan sus efectos hepatotóxicos (Palmeira et al. 1994,1995; Tayeb et al. 2010), genotóxicos (Venkov et al. 2000; Solonesky et al. 2007), neurotóxicos (Bortolozzi et al. 2004; Bongiovanni et al. 2011) en mamíferos. También existen evidencias de su actividad como disruptor endócrino (Rawlings et al. 1998; Kim et al. 2005), y principalmente hay trabajos que indican que tendría efecto androgénico (Kim et al. 2005; Mnif et al. 2011). Además, este herbicida causa bajas tasas de crecimiento, problemas reproductivos, cambios en comportamiento, o muerte en especies no blanco (Rodríguez y Amín 1991; Charles et al. 2001). En peces, el 2,4-D tiene el potencial de inducir la expresión de vitelogenina en machos y juveniles de *Oncorhynchus mykiss*, por lo tanto causar disrupción endócrina (Xie et al. 2005). En otras especies se ha demostrado su capacidad de producir daño genotóxico (Ej. *Clarias batrachus*, Ateeq et al. 2006; *Cnesterodon decemmaculatus*, Ruiz de Arcaute et al. 2016; *Channa punctatus*, Farah et al. 2003), entre muchos otros efectos (Islam et al. 2018).

En anuros, diferentes autores demostraron que el 2,4-D afecta la supervivencia de *Lithobates sphenoccephalus* (Ryan et al. 2007), bloquea la maduración de ovocitos en *Xenopus laevis* (Stebbins-Boaz et al. 2004; LaChepelle et al. 2007), y causa reducción del tamaño corporal, retraso en el desarrollo y produce microcefalia y agenesia de branquias en estadios embrionarios tempranos de *Rhinella arenarum* (Aronzon et al. 2011). Además en adultos de *R. arenarum*, la exposición dérmica de 2,4-D induce la actividad de la enzima Glutathion S-Transferasa, que se traduce en una situación de estrés oxidativo, además de producir daño en el ADN en los animales tratados (Lajmanovich et al. 2015). La toxicidad aguda y crónica del 2,4-D y algunos formulados comerciales fueron estudiados por Coady et al. (2013), Morgan et al. (1996) en *Xenopus laevis*, y en ambos estudios registraron que la toxicidad ocurre a altas concentraciones (>226mg/l).

En nuestro país, no existen estudios que aborden el efecto agudo y crónico de la exposición a herbicidas comerciales formulados con 2,4-D sobre aspectos del desarrollo de renacuajos de especies representativas del litoral mesopotámico.

3.1.2 Objetivos

O2a: Evaluar la toxicidad aguda de un formulado comercial 2,4-D Amina Zamba® en renacuajos de *Physalaemus albonotatus* (Anura: Leptodactylidae) bajo condiciones de laboratorio.

O2b: Analizar los efectos subletales sobre desarrollo, morfología larval, y morfología e histología gonadal de *P. albonotatus*.

O2c: Evaluar mediante histología hepática el daño histopatológico que produce este formulado comercial en los renacuajos de *P. albonotatus* en comparación a los del control.

3.2 Metodología

3.2.1 Especie modelo

Physalaemus albonotatus (Anura: Leptodactylidae, Fig. 3.3 A) se utilizó como organismo de ensayo, debido a ciertas características que lo hacen útiles para estudios ecotoxicológicos (reproducción explosiva, facilidad de encontrar puestas, aclimatación y alimentación en laboratorio, Izaguirre et al. 2000, 2001). Algunas de dichas características han sido demostradas por Hailey et al. (2006) para *Engystomops pustulosus*.

Physalaemus albonotatus posee una amplia distribución en Sudamérica, y es común encontrarla en áreas y campos agrícolas del nordeste de Argentina (Observación Personal). Su estado de conservación es “No amenazada” de acuerdo a la IUCN (2018) y Vaira et al. (2012).

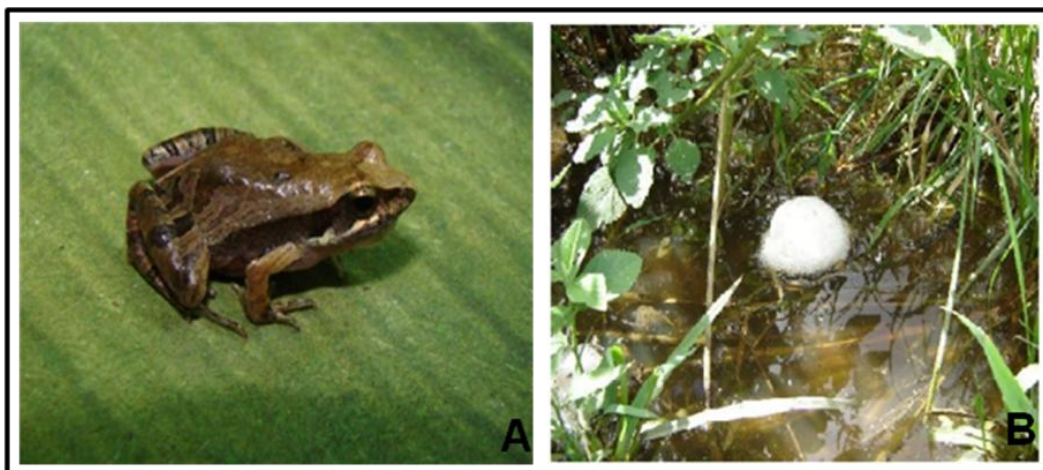


Figura 3.3 *Physalaemus albonotatus*. (Anura: Leptodactylidae). Adulto (A); puesta de huevos (nido de espuma) (B). Foto: Zaracho, V.

Se colectaron nidos de espuma (n=2) (Fig. 3.3 B) en charcas temporarias del predio del Campus Universitario de la Universidad Nacional del Nordeste (27°28'4"S, 58°46'58"W) (Corrientes, Argentina) en Febrero de 2013, y fueron trasladados al laboratorio en recipientes adecuados conteniendo el agua de la charca de donde se los colectó. En el laboratorio, una vez ocurrida la eclosión las larvas se mantuvieron en contenedores plásticos (30 cm ancho x 20 cm alto x 40 cm de largo) en condiciones controladas (25° ± 1 °C y 16/8 h de luz/oscuridad) y se alimentaron *ad libitum* (una vez al día) con lechuga hervida hasta alcanzar el estadio (EG) 25-26 (Gosner 1960). Las puestas se colectaron en dos semanas consecutivas, una fue destinada para el ensayo agudo, y la otra para el ensayo crónico.

3.2.2 Herbicida utilizado

Se utilizó el formulado comercial 2,4-D Amina Zamba ® (48.5% p/v de ingrediente activo, sal dimetilamine de Ácido 2,4-diclorofenociacético; CAS 2008-39), obtenido de Ciagro S.A., Argentina. Este es un herbicida sistémico post emergente, utilizado para controlar malezas en cultivos de trigo, maíz, arroz, papa, avena, caña de azúcar, etc. Con una aplicación recomendada de 0,40 a 1,5 litros por hectárea. Este formulado posee una alta solubilidad en agua (900mg/l a 25°C). Para confirmar la

concentración de 2,4-D presente en el formulado, se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (Waters 1525 Binary HPLC Pump) con un detector UV (Waters 2489 UV/Visible Detector). El límite de detección fue ± 3 mg/l. La estabilidad de las diferentes soluciones con 2,4-D fue analizada al comienzo y final del ensayo (Peltzer et al. 2008, 2013). El error entre la concentración nominal y medidas no excedió el 5%.

3.2.3 Ensayo Agudo

Debido a que no existían datos de CL50 (Concentración letal 50) de 2,4-D para *Physalaemus albonotatus*, se realizó un ensayo preliminar teniendo en cuenta como valores de referencia la toxicidad obtenida para 2,4-D en otras especies de anuros (Coady et al. 2013; Figueredo y De Jesus Rodriguez 2014; Morgan et al. 1996; USEPA 2005). Diez renacuajos en EG 25 ± 2 fueron expuestos a 350, 700, 1400, y 2400 mg/l de 2,4-D Amina Zamba® o mantenidos en agua de clorinada (control) por triplicado (N = 30) en placas de petris conteniendo 50 ml de cada solución durante 96 h. El ensayo se realizó bajo las mismas condiciones expuestas en el apartado 3.2.1 y los renacuajos no fueron alimentados durante este tiempo. La mortalidad fue registrada y las soluciones renovadas diariamente.

3.2.4 Ensayo crónico

Las concentraciones utilizadas en el ensayo crónico se calcularon en base al criterio de Figueredo y De Jesus Rodriguez (2014) y se corresponden a 0, 12,5, 25, 50 y 75 % de la CL50_{96h} estimada en el ensayo agudo. Treinta renacuajos en EG 25 ± 2 fueron seleccionadas al azar y expuestas por duplicado (N=60) a 43,7, 87,5, 175, 262,5 mg/l de 2,4-D Amina Zamba® o mantenidas en agua de clorinada (control) por 49 días. Estos fueron colocados en recipientes plásticos que contenían 1 l de las soluciones mencionadas. El ensayo se realizó en las condiciones mencionadas en apartado 3.2.1. Los renacuajos fueron alimentados *ad libitum* con lechuga hervida y las soluciones se renovaron cada 48 h. Aquellos que no alcanzaron el EG 46 al final del ensayo fueron mantenidos separados en placas de petri con 200 ml de la solución correspondiente hasta alcanzar la metamorfosis.

3.2.4.1 Supervivencia

La supervivencia de los renacuajos en cada tratamiento fue registrada cada 24 h y expresada como porcentaje teniendo en cuenta ambas réplicas de cada tratamiento. La supervivencia fue analizada hasta el día 34 de exposición, teniendo en cuenta que la disminución de la misma en los controles no supere el 80%.

3.2.4.2 Crecimiento y desarrollo

Cada siete días dos renacuajos de cada tratamiento fueron aleatoriamente seleccionados y eutanasiados por inmersión en una solución de 0,1 % de metanosulfonato de tricaína (TMS, MS- 222) a pH 7,8 con NaHCO₃ siguiendo el protocolo de la ASIH (2004). Estos fueron fijados en solución de Bouin por 24 h, y luego conservados en alcohol 70 %. Se determinó el estadio de desarrollo de los ejemplares preservados siguiendo la tabla propuesta por Gosner (Gosner 1960). Además, a cada ejemplar se midió la longitud hocico cloaca (LHC), longitud total (LT) con calibre digital (0,01 mm de precisión); y el peso corporal (Pe) con una balanza digital (0,01 g de precisión). El tiempo en alcanzar el EG 38-39 (miembros posteriores presentes y bien formados), EG 42 (presencia de 4 miembros y cola), y EG 45–46 (fin de metamorfosis) fueron registrados teniendo en cuenta cuando el 30 % de los individuos alcanzaron esos estadios.

3.2.4.3 Anormalidades morfológicas

Los ejemplares periódicamente fijados fueron examinados bajo lupa estereoscópica (Leica EZ4) en búsqueda de anormalidades morfológicas tales como anormalidades del disco oral, edema abdominal, anormalidades intestinales (intestino desespiralado, intestino desplazado), disminución de pigmentación, cuerpo forma de diamante, etc. Las mismas fueron clasificadas siguiendo a Lenkowski et al. (2008); Krishnamurthy y Smith (2011) y Peltzer et al. (2013, 2019).

3.2.4.4 Análisis de la morfología e histología gonadal

Cuatro de los individuos fijados en EG 42-46 (dos machos y dos hembras), de cada tratamiento y control (N=10) fueron utilizados para el análisis. Luego de una minuciosa disección, las gónadas fueron observadas bajo lupa estereoscópica (Leica EZ4) realizándose registros fotográficos de las mismas. Los individuos enteros fueron destinados al procesamiento histológico convencional como se explicó en la sección 2.2.6. Se seleccionaron los estadios metamórficos para el análisis de las posibles alteraciones gonadales, debido a que en *P. albonotus*, al igual que en *Leptodactylus latrans* y *Physalaemus santafecinus*, la diferenciación gonadal ocurre en estadios prometamórficos (Sandoval y Gómez 2010; Bach 2018).

La descripción de la histología de los testículos en individuos control y tratados se realizó de acuerdo a Ogielska y Bartamanska (1999) y Pinto-Eraza et al. (2016). Para la identificación del estado de desarrollo ovárico se utilizó lo propuesto por Ogielska y Kotusz (2004). Para la descripción de las alteraciones histológicas de testículos y ovarios, se utilizó la terminología y los criterios propuestos por Wolf et al. (2010). En los testículos se estimó el grado de pigmentación (cantidad de cromatóforos) del tejido intersticial y túnica albugínea como: grado 0= nulo, grado 1= escaso, grado 2=moderado y grado 3= intenso (Franco-Belussi et al. 2009).

3.2.4.5 Análisis de la histología hepática

El hígado de dos de los renacuajos fijados en EG 39-45 de cada concentración y control (N=10) fueron destinados al procesamiento histológico convencional como se explicó en la sección 2.2.6. Los mismos se observaron y fotografiaron bajo un microscopio óptico Leica DM500 equipado con una cámara digital Leica LCC50HD.

Se analizaron seis fotografías que corresponden a un campo de 40 x de magnificación de secciones hepáticas no consecutivas tomadas bajo microscopio óptico de cada individuo correspondiente a cada tratamiento y control. En cada sección se cuantificó el número de melanomacrófagos (MM) utilizando el *software* Image J (De Souza Santos et al. 2014). Además, se evaluaron otras alteraciones en la histología

hepática y se clasificaron como hipervascularización, agrandamiento de sinusoides, dilatación de vasos sanguíneos, vacuolización o necrosis de hepatocitos, de acuerdo a Cakici (2015) y Sayed y Younes (2017).

3.2.4.6 Análisis estadísticos

Las CLs50 y sus respectivos intervalos de confianza se calcularon a las 48, 72 y 96 h, usando el método de Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al. 1977). Previo a cada análisis estadístico, el test de Kolmogorov-Smirnov y de Levene se realizó para probar la normalidad y homogeneidad de varianzas, respectivamente (Zar 1999). Para comparar la supervivencia entre los tratamientos y controles al día 34, se utilizó el test de Chi Cuadrado (Peltzer et al. 2013). Por otro lado, para determinar si existen diferencias en los parámetros morfológicos (LHC, LT, P) entre los tratamientos, se utilizó un MANCOVA, con el EG y tiempo de exposición como covariable. Posterior a dicho análisis, se aplicó un ANOVA para cada variable. La prevalencia de anormalidad se calculó dividiendo el número de renacuajos con una determinada anormalidad sobre el número total de individuos analizados (Peltzer et al. 2013). El número de MMs en las secciones hepáticas en los distintos tratamientos y control se comparó con un ANOVA. Los análisis estadísticos se realizaron con el *software* InfoStat/P version 1.1 (Grupo InfoStat Professional, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) y Sigmaplot v.11.0 (Systat Software).

3.3 Resultados

3.3.1 Ensayo agudo

Las CLs50 de 2,4-D Amina Zamba® para renacuajos de *P. albonotatus* en EG 25 ± 2 a las 48, 72, y 96 h fueron: 1040.2 (950.3–1138.5), 754.2 (551.8–1030.8), y 350 mg/l (n.c.), respectivamente. Estos valores demuestran que la mortalidad de los renacuajos depende del tiempo de exposición al herbicida.

3.3.2 Ensayo crónico

3.3.2.1 Supervivencia

La supervivencia de los renacuajos expuestos de forma crónica al herbicida se resume en la Fig. 3.4. Hasta el día 14 de exposición, no se registraron muertes en ningún tratamiento ni control. A los 21 días de exposición, una importante disminución de la supervivencia se observó en los tratamientos 87,5, 175, y 262,5 mg/l de 2,4-D Amina Zamba® en comparación al control, mostrando diferencias significativas hacia el día 34 (Chi cuadrado= 50,62, gl = 3, P<0,0001). En el día 34, la supervivencia en la mayor concentración analizada fue 0%, mientras que en el control fue de 80%.

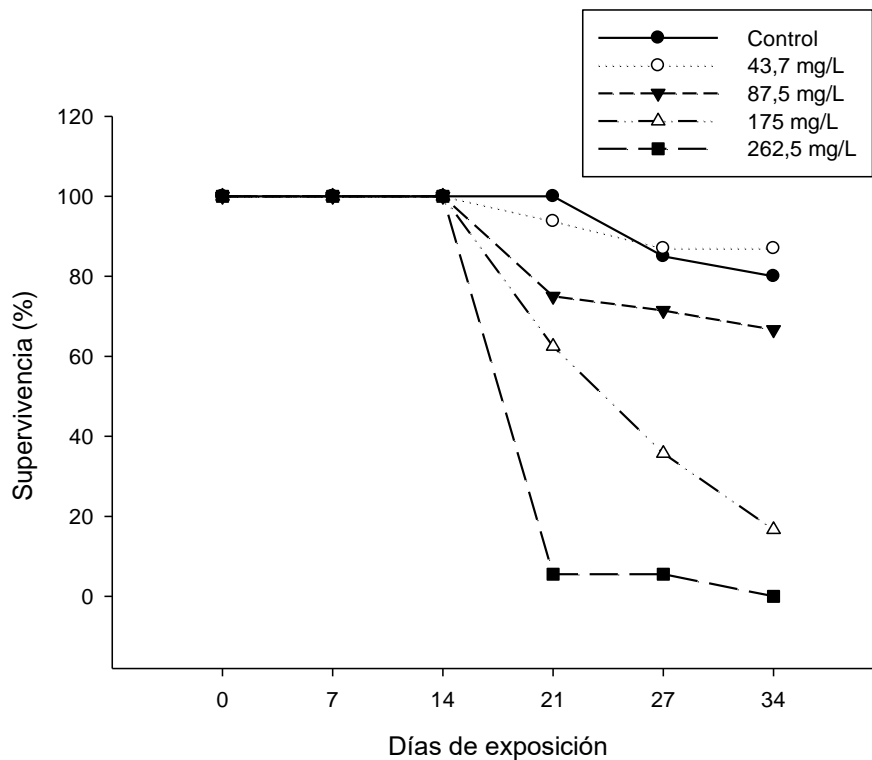


Figura 3.4 Porcentaje de supervivencia en renacuajos de *P. albonotatus* expuestos a 2,4-D Amina Zamba® desde el EG 25 ± 2.

3.3.2.2 Crecimiento y desarrollo

No se encontraron diferencias significativas en la LHC, LT y Pe en los renacuajos de diferentes tratamientos y control con el EG como covariable (MANCOVA, Wilks' Lambda = 0,660, F = 1,015, P=0,445) ni con el tiempo de exposición como covariable (MANCOVA, Wilks' Lambda = 0,625, F = 1,204, P = 0,295). En la Fig. 3.5 se muestran los valores promedio de LHC, LT y Pe en renacuajos (EG 25 a 38) expuestos a 2,4-D Amina Zamba® y control. Las diferencias para cada variable no fueron estadísticamente significativas (LHC: F = 2,238, gl = 4, P = 0,089; LT: F = 0,717, gl = 4, P = 0,587; P: F = 1,879, gl = 4, P = 0,141) entre tratamientos.

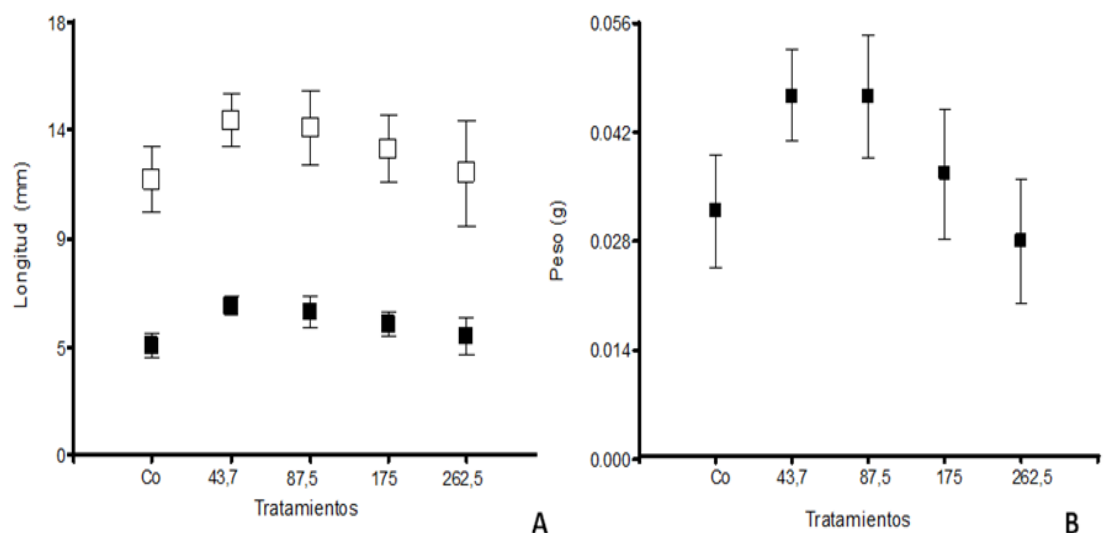


Figura 3.5 Parámetros morfológicos medidos en renacuajos de *P. albonotatus* (EG 25 a 38) expuestos a los diferentes tratamientos (mg/l) con 2,4-D Amina Zamba® y control (Co). Los valores están expresados como media \pm desvío estándar de LHC (cuadros negros) y LT (cuadros blancos) (A); media \pm desvío estándar de Pe (B).

El tiempo requerido para que al menos el 30 % de los renacuajos alcancen el EG 38–39, 42, y 45–46 (fin de metamorfosis) se resume en la Fig. 3.6. Los renacuajos tratados con 43,7 y 87,5 mg/l de 2,4-D Amina Zamba® fueron los primeros en alcanzar el EG 38–39 alrededor del día 28 de ensayo. Los renacuajos tratados con

87,5 mg/l del herbicida fueron los primeros en alcanzar el EG 42 alrededor del día 40 de ensayo. Los individuos del control, alcanzaron el EG 38–39 luego de los 45 días y el EG 42 luego de los 52 días, en ambos casos el tiempo fue mayor que en los tratados. Los primeros en alcanzar el EG 45-46 (fin de metamorfosis), fueron los expuestos a 43,7 y 87,5 mg/l del herbicida al día 45. Los controles alcanzaron el EG 45-46 alrededor del día 53. Los renacuajos expuestos a 262,5 mg/l no sobrevivieron más del EG 42-44, y no se pudo estimar el tiempo de metamorfosis.

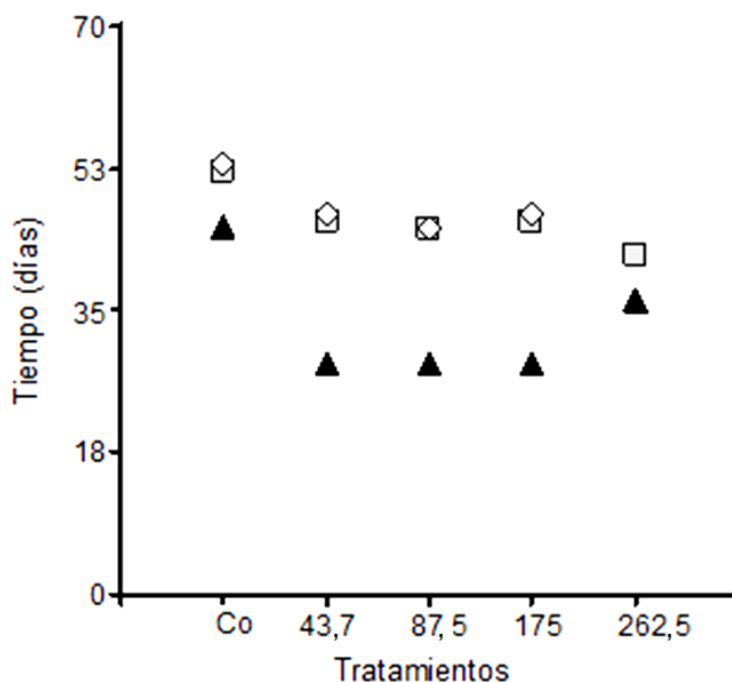


Figura 3.6 Tiempo requerido (en días) para alcanzar el EG 38 (triángulos), EG 42 (cuadrado) y EG 45-46 (rombo) en renacuajos de *P. albonotatus* expuestos a los tratamientos con 2,4-D Amina Zamba® (mg/l) y controles (Co).

3.3.2.3 Anormalidades

Las anormalidades registradas en las larvas de *P. albonotatus* expuestas a 2,4-D Amina Zamba® fueron: disminución de la pigmentación en la piel, malformaciones del disco oral, anormalidades intestinales (intestino desespiralado, Fig. 3.7 G, H),

edemas abdominales, cuerpo en forma de diamante (Fig. 3.7 E). Las malformaciones del disco oral consistieron en pérdida de las filas anteriores de dentículos o queratodontes y suprarostodontes (Fig. 3.7 D) o ausencia de la fila anterior de queratodontes y pérdida parcial de fila posterior de queratodontes (Fig. 3.7 E). Las prevalencias de cada tipo de anomalía se resumen en la Tabla 3.1.

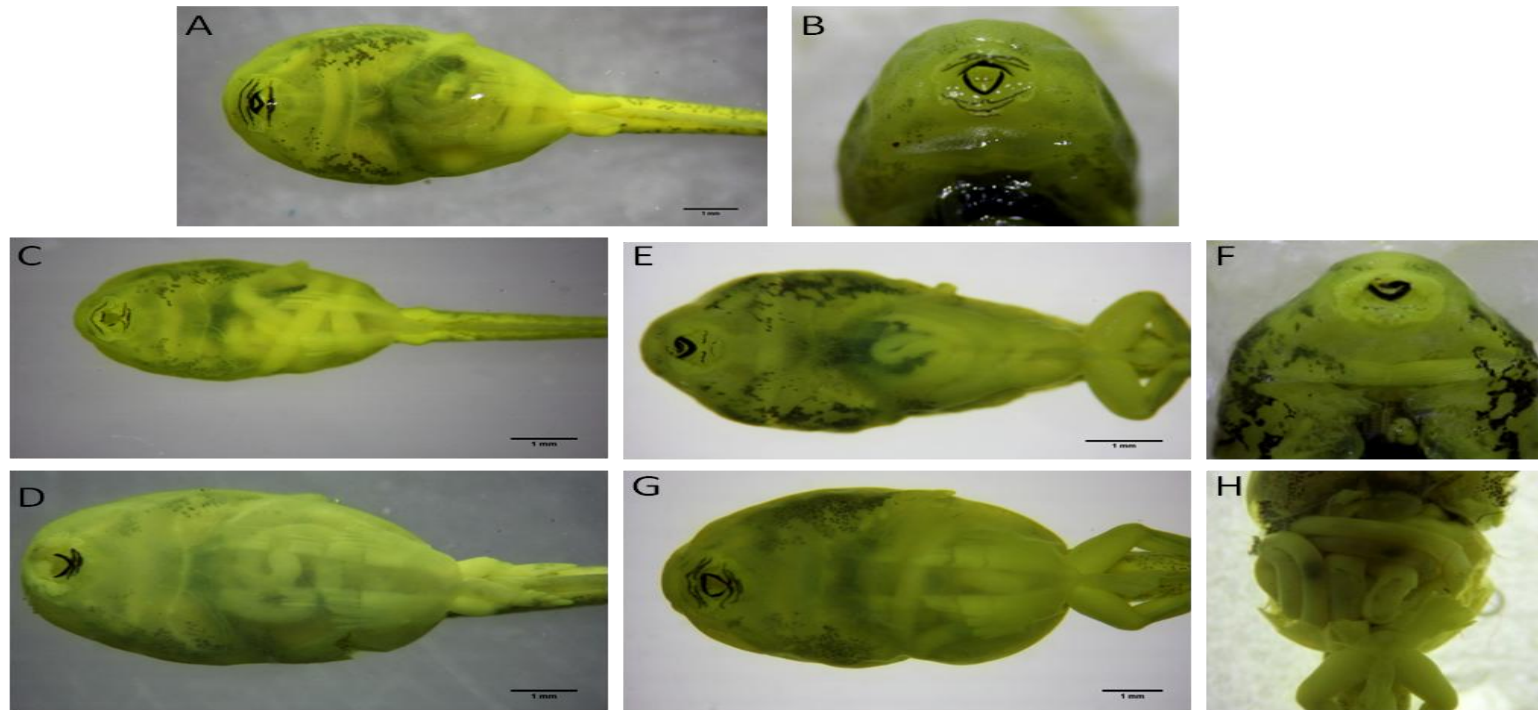


Figura 3.7 Anormalidades en renacuajos de *P. albonotatus* expuestos a 2,4-D Amina Zamba® y control. Vista general (A) y detalle del disco oral un individuo control (B); anomalía intestinal (intestino desespiralado) (C) y malformación del disco oral (pérdida de queratodontes anteriores y rostrodontes) en renacuajos expuestos a 87,5 mg/l 2,4-D Amina Zamba® (D); pérdida de las hileras anteriores y pérdida parcial de hileras posteriores de queratodontes y cuerpo en forma de diamante (E), y detalle del disco oral de renacuajo expuesto a 175 mg/l de 2,4-D Amina Zamba® (F); vista general de anomalía intestinal (intestino desespiralado) en renacuajo expuesto a 262,5 mg/l 2,4-D de Amina Zamba® (G) y detalle de intestino esespiralado con la piel subyacente levantada (H). *La coloración de las larvas se debe a la fijación con Bouin. Escala: 1 mm

	Total	Co	43,7mg/l	87,5mg/l	175mg/l	262,5mg/l
MDO	0,14	-	-	0,33	0,33	0,2
AI	0,19	-	0,33	0,22	0,33	0,2
DPP	0,02	-	-	0,11	-	-
CFD	0,02	-	-	-	0,11	-
EA	0,04	-	-	0,22	-	-

Tabla 3.1 Prevalencia de anomalías en renacuajos de *P. albonotatus* expuestos a 2,4-D Amina Zamba® y control. Referencias: **EA**: edemas abdominales, **CFD**: cuerpo en forma de diamante, **DPP**: disminución de la pigmentación en piel, **AI**: anomalía intestinal, **MDO**: malformaciones del disco oral.

3.3.2.4 Morfología e histología gonadal

En los machos del tratamiento control, los testículos presentaron forma ovoide, coloración blanquecina y grado 0 y 1 de pigmentación (Fig. 3.8 A). A nivel histológico, en los testículos se reconocieron lóbulos seminíferos de forma irregular delimitados por una delgada membrana basal, los cuales están rodeados por escaso tejido intersticial. Dentro de los lóbulos se observaron espermatogonias redondeadas, de citoplasma claro y núcleo central prominente, asociadas con células somáticas (células de Sertoli) (Fig. 3.8 F). El grado de pigmentación interna de los individuos control fue escaso (grado 1) (Fig. 3.8 F).

Los testículos de los individuos tratados con las distintas concentraciones de 2,4-D Amina Zamba® se diferenciaron del tratamiento control por tener pigmentación de grado 2 en la parte externa del testículo (Fig.

3.8 B-E). La estructura histológica de los testículos es similar a la descrita para los individuos del control, con diferencias en el grado de pigmentación del tejido intersticial. Los testículos de individuos tratados con 43,7, 87,5, 175 mg/l de 2,4-D Amina Zamba® mostraron grado 2 de pigmentación (Fig. 3.8 H-I), mientras que los tratados con 262,5 mg/l de 2,4-D Amina Zamba® presentaron grado 2 (Fig. 3.8 J) y 3 de pigmentación.

En las hembras del tratamiento control, los ovarios son bi o trilobulados, y en general ambos ovarios poseen tamaños similares y externamente se observan pigmentos en forma de puntos (Fig. 3.9 A). Histológicamente casi no se observa la cavidad ovárica (médula ovárica), ya que la misma está obliterada por los folículos, se corresponden a un ovario en estado IX-X (Ogielska y Kotusz 2004). En el ovario predominan los ovocitos en diplotene, las ovogonias en menor número están restringidas a las zonas más externas de la corteza (Fig. 3.9 F). Entre los ovocitos se observan melanóforos escasos (grado 1) dispuestos en el tejido conjuntivo intersticial (Fig. 3.9 F).

En las hembras de los tratamientos con 43,7, 87,5, 175, 262,5 mg/l de 2,4-D Amina Zamba®, los ovarios no poseen una delimitación morfológica completa de lóbulos como se observa en los controles, en algunos casos se observan dos lóbulos (Fig 3.9 C, D). Histológicamente, en los ovarios de las hembras expuestas a 43,7 y 87,5 mg/l de 2,4-D Amina Zamba® no se observan diferencias respecto a las del control en la composición del ovario y estado de desarrollo del mismo. Estas se encuentran en un estado de desarrollo VIII-IX (Ogielska y Kotusz 2004). Pero en estos ovarios la pigmentación es de grado 2 (Fig. 3.9 G, H). En los tratamientos con 175 y 262,5 mg/l los ovarios se corresponden a un estado VI-VII (Ogielska y Kotusz 2004). En estos ovarios hay menor proporción de ovocitos en diplotene, y en la corteza hay ovocitos meióticos tempranos, y ovogonias (Fig. 3.9 I, J). En relación a las concentraciones menores y el control, la cavidad del ovario se observa más grande y aun no está repleta de ovocitos. La pigmentación de los ovarios también es de grado 2 (Fig. 3.9 I, J).

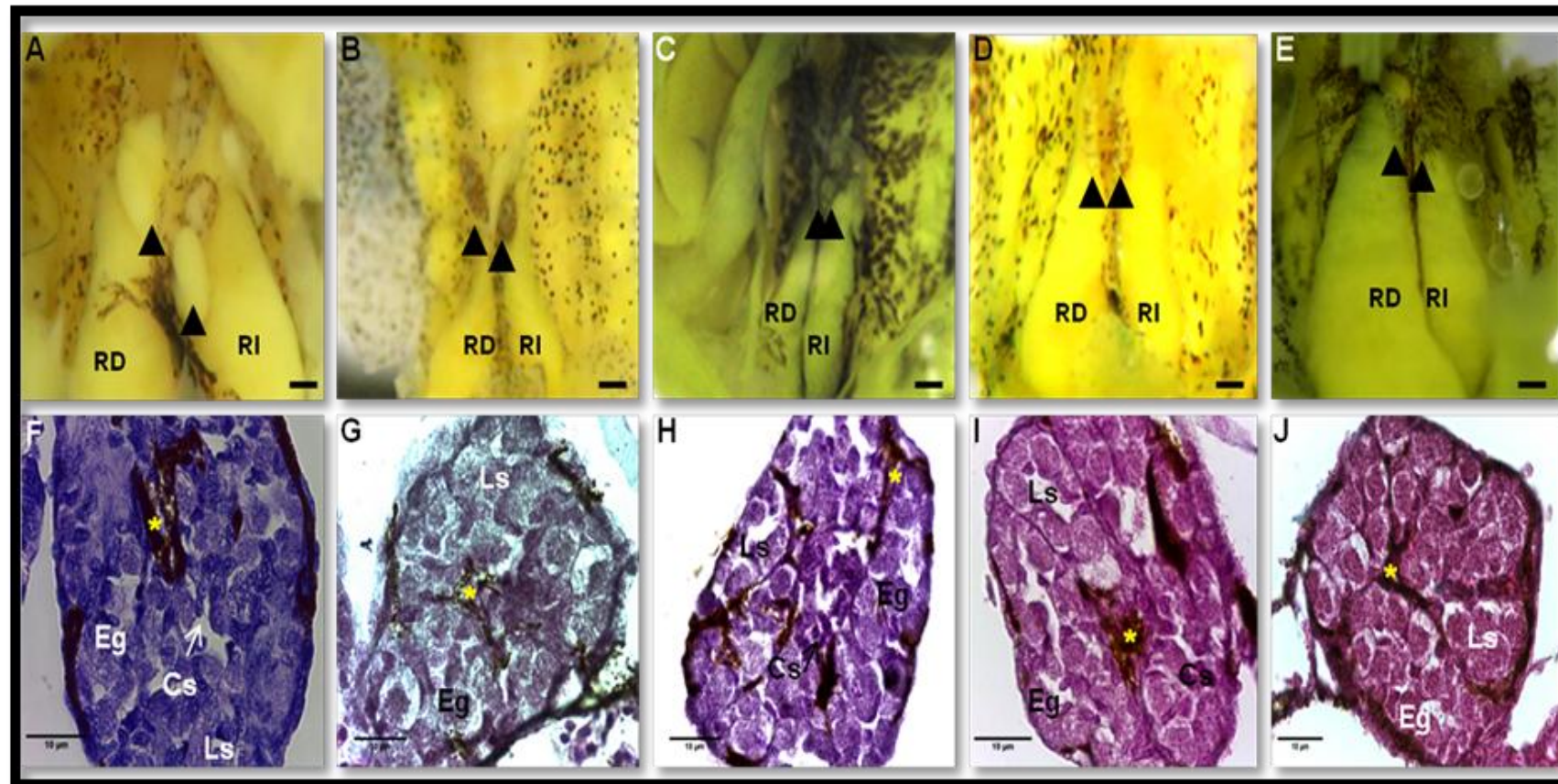


Figura 3.8. Morfología e histología testicular de individuos metamórficos de *P. albonotatus* expuestos a 2,4-D Amina Zamba® y control. Control (A, F); 43,7 mg/l (B, G); 87,5 mg/l (C, H); 175 mg/l (D, I); 262,5 mg/l (E, J). Referencias: riñón izquierdo y derecho (RI, RD), testículos (cabeza de flecha), espermatogonias (Eg), células de Sertoli (Cs), lóbulo seminífero (Ls), melanóforos (asterisco). A-E (escala 0,5 mm), F-J (aumento 100x, escala 10 μ m).

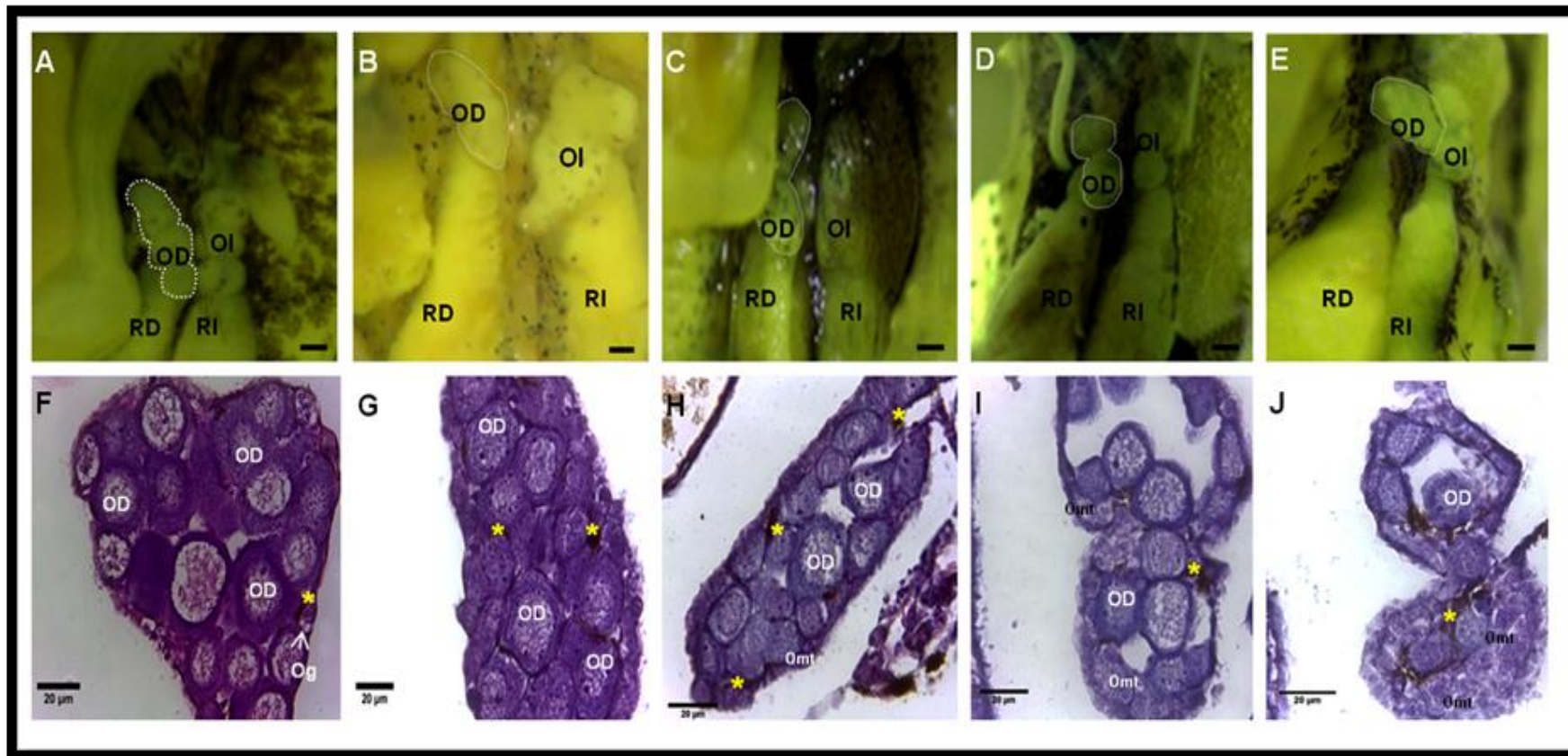


Figura 3.9. Morfología e histología ovárica de individuos metamórficos de *P. albonotoatus* expuestos a 2,4-D Amina Zamba® y control. Control (A, F); 43,7 mg/l (B, G); 87,5 mg/l (C, H); 175 mg/l (D, I); 262,5 mg/l (E, J). Referencias: ovario derecho (OD), ovario izquierdo (OI), riñón izquierdo y derecho (RI, RD), ovocito en diplotene (OD), Ovogonia (Og), ovocito meiótico temprano (Omt), melanóforos (asterisco). A-E (escala 0,5 mm); F-J (aumento 40x, escala 20 µm).

3.3.2.5 Análisis de la histología hepática

El tejido hepático de los individuos control, presentó una histoarquitectura normal, compuesta por hepatocitos ubicados en cordones, entre ellos se observaron los sinusoides, vasos o venas y escasos melanomacrófagos aislados (Fig. 3.10 A, B). Por otra parte, en los individuos expuestos se observó en el tejido hepático agrandamiento de los sinusoides hepáticos (en todos los tratamientos), hipervascularización (175 y 262,5 mg/l), dilatación de venas y vacuolización de los hepatocitos (87,5, 175 y 262,5 mg/l) (Fig. 3.10 C–F).

Por otro lado, se encontraron diferencias significativas en el número medio de MM en hígado de larvas tratadas con 87,5, 175, y 262,5 mg/l de 2,4 D de Amina Zamba® respecto al control ($F = 8,86$, $gl = 4$; $P = 0,000$, Dunnet post test $P < 0,05$, Fig. 3.11).

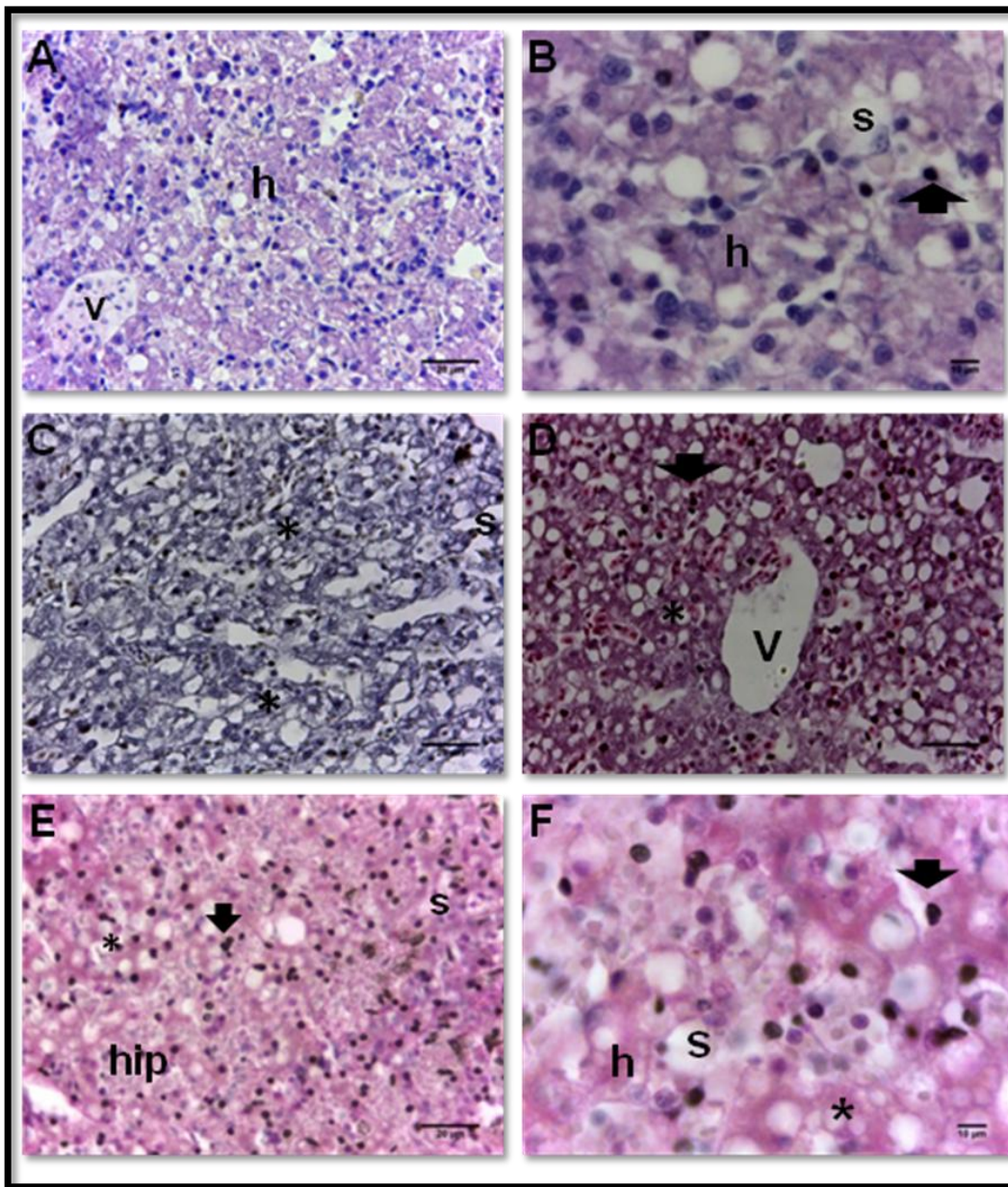


Fig. 3.10 Secciones histológicas de hígado de renacuajos de *P. albonotatus* expuestos a 2,4-D Amina Zamba® y control. Hígado de individuo control (A, B); tratado con 87,5 mg/l (C); 175 mg/l (D); 262,5 mg/l (E, F). Referencias: sinusoides (s), hepatocitos (h), hipervascularización (hip), vasos/venas (v), vacuolización de hepatocitos (*), melanomacrófagos (flecha negra), eritrocitos (cabeza de flecha). A, C, E (40x, escala 20 μ m), B, F (100x, escala 10 μ m).

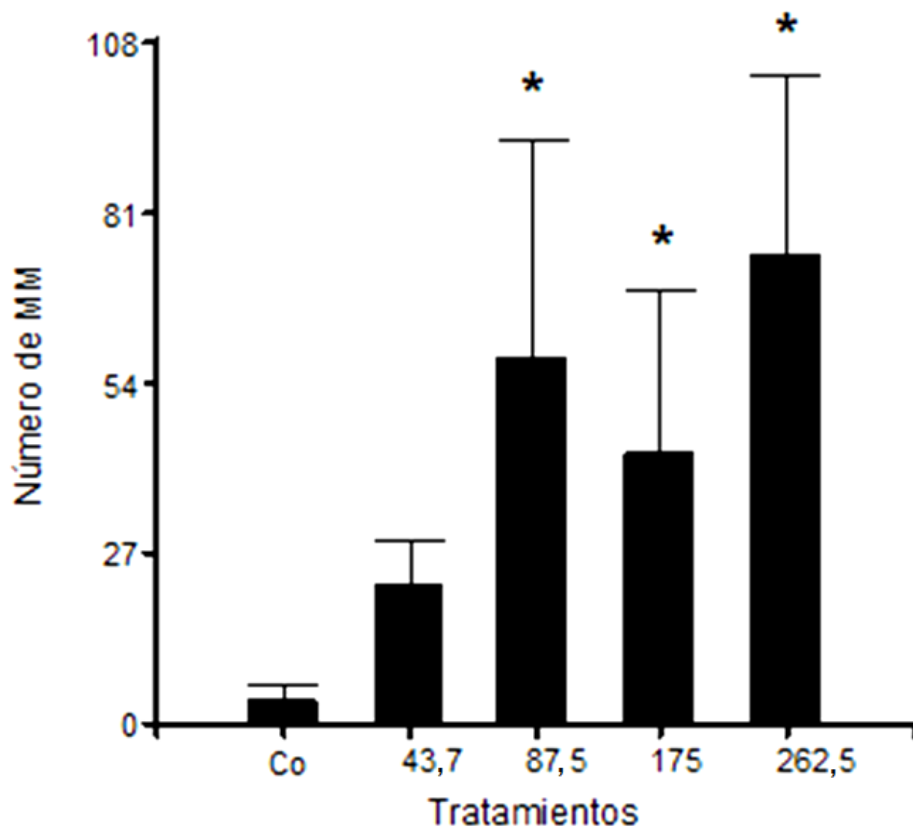


Fig. 3.11 Número de MM expresado como media \pm desvío estándar en hígado de renacuajos de *P. albonotatus* expuestos a diferentes tratamientos (mg/l) con 2,4-D Amina Zamba® y control (Co). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($P < 0,05$).

3.4 Discusión de resultados

De acuerdo a la USEPA (2005), la toxicidad aguda del 2,4-D registrada en organismos acuáticos varía entre las diferentes formas químicas. En peces, la toxicidad (CL50_{96h}) de diferentes formulaciones de 2,4-D varía en rangos de 63 a 2780 mg/l (Sarıkaya y Yılmaz 2003; USEPA 2005; Cattaneo et al. 2008; Fairchild et al. 2008, 2009; Ruiz de Arcaute et al. 2016). La exposición a un rango de 252–756 mg/l del herbicida comercial DMA® basado en 2,4-D durante 48 y 96 h causa incremento en el daño del material genético en *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae) con una CL50_{96h} de 1008 mg/l de 2,4-D (Ruiz de Arcaute et al. 2016).

La CL50_{96h} calculada para renacuajos de *P. albonotatus* (EG 25 ± 1) fue de 350 mg/l de 2,4-D Amina Zamba®, similar a los valores de otros estudios con especies de anuros. Morgan et al. (1996) determinó usando FETAX que 254 y > 270 mg/l son los valores de CLs50_{96h} del herbicida 2,4-D, Buffer y agua natural respectivamente. Los valores de CLs50_{96h} determinados por Figueredo y De Jesus Rodriguez (2014) para renacuajos (EG 25) de *Rhinella marina* y *Physalaemus centralis* luego de la exposición a un formulado comercial (U46 D-FLUID 2,4-D, Nufarm) fueron 282,84 (227,6–351,49) y 515,75 (456,66–582,48) mg/l, respectivamente. Recientemente, Freitas et al. (2019) encontraron gran variación en la sensibilidad del herbicida basado en 2,4-D (DMA® 806) en las distintas especies analizadas. Estos autores concluyeron que *Leptodactylus fuscus* fue la más sensible y presentó una CL50_{96h} de 28,81±4,28 mg/l; en *Physalaemus nattereri* la CL50_{96h} fue de 143,08±3,01 mg/l, mientras que *Lithobates catesbeianus* fue la menos sensible, con una CL50_{96h} de 574,52±6,39 mg/l.

Mesak et al. (2018) menciona que es necesario ensayar con concentraciones altas y en consecuencia con concentraciones no realistas a escala de laboratorio, ya que son útiles para entender el mecanismo de acción de distintas sustancias químicas sobre los organismos testeados (Islam et al. 2018). En este estudio esta información es relevante debido a la ausencia de

datos sobre la exposición aguda y crónica a este herbicida. Es importante remarcar que muchas de las concentraciones reportadas en el ambiente, están por debajo de los niveles conocidos y expuestos por otros autores y que son capaces de causar efectos en anfibios y peces (Coady et al. 2013; Figueredo y De Jesus Rodriguez 2014; Li et al. 2017). Es remarcable la necesidad de conocer los niveles reales de 2,4-D que ocurren en diferentes ambientes, ya que dicho conocimiento es útil para estimar y prevenir posibles daños que podrían sufrir las especies de anuros u otras especies acuáticas que habiten los ambientes agrícolas o aledaños, ya que no se puede descartar que existan concentraciones elevadas luego de aplicaciones directas, descarga accidental o derrames del herbicida (Agostini et al. 2020).

En anuros, la información sobre los efectos de la exposición crónica a formulados comerciales con 2,4-D son relativamente escasos (Coady et al. 2013; Figueredo y De Jesus Rodrigues 2014; Freitas et al. 2019). En el presente estudio, quedó demostrado que la exposición crónica a 2,4-D Amina Zamba® afecta la supervivencia de los renacuajos de *P. albonotatus* durante el periodo de ensayo (49 días). La supervivencia disminuyó notablemente a partir del día 14 de exposición en la mayor concentración testada (262,5 mg/l), mientras que en las otras concentraciones, la supervivencia disminuyó gradualmente luego del día 14. La disminución de la supervivencia en los renacuajos controles luego del día 27, en relación a la supervivencia de los renacuajos tratados con 43.7 mg/l, se podría deber a factores inherentes a la aclimatación de las especies que en condiciones de laboratorio, sobreviven menos que en condiciones naturales. Por ello, el efecto de los contaminantes en este tipo de estudios, principalmente con *P. albonotatus* y probablemente otras especies de anuros u organismos acuáticos, se debe evaluar en estadios tempranos y en ensayos crónicos de no más de 27 días.

Los cambios que ocurren durante las fases tempranas del desarrollo de los anuros, son importantes porque pueden comprometer la aptitud y supervivencia de los individuos adultos (Semlitsch et al. 2000; Chelgren et al. 2006), siendo también que los efectos subletales de los contaminantes pueden

persistir en subsecuentes etapas de la vida del organismo (Blaustein y Kiesecker 2002).

Diversos estudios demostraron que la talla corporal disminuye luego de la exposición a altas concentraciones del herbicida atrazina (Spolyarich et al. 2010; Zaya et al. 2011), en cambio esto no se registró por exposición a otros herbicidas (Coady et al. 2004, 2013; Velázquez et al. 2013). Los renacuajos de *P. albonotatus* expuestos a 43,75, 87,5, 175, y 262,5 mg/l de 2,4-D Amina Zamba® no mostraron diferencias en el tamaño corporal (LHC, LT, Pe) respecto al control. Estos resultados están en concordancia con Mesak et al. (2018), y demuestran que en este caso el tamaño corporal no estaría directamente relacionado con el efecto dosis-dependiente del herbicida utilizado.

En Anfibios, los corticoesteroides (corticosterona y aldosterona) interactúan con las hormonas tiroideas, y cualquier cambio en esta vía puede alterar la metamorfosis (Denver 2009, 2013). Este último menciona en su trabajo, que niveles elevados de corticosterona (por ejemplo en respuesta a una situación de estrés), durante el periodo prometamórfico puede acelerar la metamorfosis (Denver 2013). En los resultados de esta tesis, se observó que los renacuajos tratados con 2,4-D completaban la metamorfosis antes que los controles. Otros herbicidas producen similar efecto, y aceleran la metamorfosis en *Lithobates pipiens* y *X. laevis* expuestos a acetoclor (Cheek et al. 1999 y Crump et al. 2002, respectivamente) y en *Rhinella arenarum* expuesta a atrazina (Brodeur et al. 2013). Estos autores interpretan que la aceleración en la metamorfosis es causada por una estimulación en el eje hipotalámico-pituitaria-adrenal mediado por la secreción de glucocorticoides como respuesta a la presencia de un agente estresor como un xenobiótico. Además, Figueredo y De Jesus Rodrigues (2014) observaron una aceleración en la metamorfosis en *Physalaemus centralis* tratados con 128,87 y 257,87 mg/l de 2,4-D, posiblemente como una respuesta a una situación de estrés. Hasta el momento, los efectos del 2,4-D sobre el eje hipotalámico-hipófisis-tiroides aun no se conocen y son necesarios más estudios para establecer una posible

relación entre la disrupción de las hormonas tiroideas y el efecto del herbicida 2,4-D.

Las anomalías morfológicas en larvas de anuros han sido comúnmente asociadas con la exposición a agroquímicos (Lajmanovich et al. 2003a, b; Lenkowski et al. 2008, 2010; Peltzer et al. 2011). En la presente tesis, algunos efectos subletales tales como anomalías en la morfología larval se han registrado en renacuajos tratados con 2,4-D Amina Zamba®. Algunos autores concluyen que el 2,4-D es teratogénico solo a concentraciones mayores a 50 mg/L (Cooke 1972; Meehan et al. 1974). Morgan et al. (1996) encontraron que concentraciones de 2,4-D de hasta 270 mg/l en agua natural causaban efectos mínimos en embriones de *X. laevis*.

En este estudio, las anomalías morfológicas más prevalentes fueron malformaciones del disco oral y anomalías intestinales. Una alta prevalencia de malformaciones del disco oral se registraron en las concentraciones mayores de 2,4-D Amina Zamba® (87,5, 175, y 262,5 mg/l). En referencia a esto, Pérez Iglesias et al. (2015) encontraron que Pivot H® (herbicida basado en Imazethapyr) causa pérdida de queratodotes en relación a la concentración del herbicida (0,41 a 2,72 mg/l). Rowe et al. (1996) encontraron que larvas de *Rana dalmatina* colectados en sitios contaminados con As, Cd, Cu, Se, tenían números reducidos de queratodotes y papilas labiales deformadas en comparación al control. Las anomalías del disco oral, tales como la reducción de queratodotes, pueden afectar la dieta de los renacuajos, y consecuentemente estos renacuajos serían menos activos, con una reducida condición física, y por lo tanto su supervivencia podría verse afectada (Pérez Iglesias et al. 2015).

Además, las larvas expuestas a las mayores concentraciones de 2,4-D Amina Zamba® mostraron anomalías intestinales. Lenkowski et al. (2010) demostraron que 60–70 mg/l de 2,4-D causan un incremento en las anomalías intestinales y edemas en renacuajos de *X. laevis* expuestos durante la organogénesis. Esto puede deberse a una disrupción en una vía de señalización específica de la organogénesis, así como ha sido demostrado en renacuajos de *Xenopus laevis* (Lenkowski y McLaughlin 2010).

La vía del Ácido Retinoico es esencial para el desarrollo y función de varios sistemas de órganos (Das et al. 2014; Lipscomb et al. 2006), pero esta vía puede ser interrumpida por ciertos contaminantes ambientales que podrían causar malformaciones durante el desarrollo (Inoue et al. 2010). Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado de qué manera el herbicida 2,4-D causa interferencia en la vía del Ácido Retinoico.

El momento en que ocurre el desarrollo y diferenciación gonadal se considera un período crítico y vulnerable durante el desarrollo de los anuros (Tavera-Mendoza et al. 2002 a,b). Es importante determinar el efecto de los herbicidas, sobre todo en las especies que tienen patrón de desarrollo gonadal acelerado, porque se considera que serían las más susceptibles (Storrs y Semlitsch 2008).

Tavera-Mendoza et al. (2002a) demostraron una disminución en número de espermatogonias y de células somáticas en los testículos de renacuajos de *Xenopus* expuestos al herbicida atrazina (21 ug/l) durante la diferenciación gonadal. De forma similar, Hayes et al. (2002, 2003) registraron que este herbicida produce desmasculinización e induce hermafroditismo en las especies de anuros estudiadas. En cambio, en otras investigaciones realizados con el mismo herbicida, no se mencionan efectos significativos durante el desarrollo gonadal en *Xenopus laevis* (Carr et al. 2003; Coady et al. 2005; Kloas et al. 2009).

En este trabajo, los individuos machos expuestos a 2,4-D Amina Zamba®, no mostraron diferencias en la composición histológica de testículos respecto al tratamiento control. Solamente se registró variación en el grado de coloración. Ya que la coloración externa de los testículos del tratamiento control contenía un grado de pigmentación 0 y 1, y los individuos de los tratamientos con 2,4-D contenían un grado 2 de pigmentación (Fig. 3.8 F-J). Respecto a la pigmentación interna, en los individuos controles presentaron un grado bajo de pigmentación (grado 1), y en los otros tratamientos, grado 2 y 3. Se consideran importantes de mencionar estas diferencias, porque existen estudios en los que la exposición a estradiol u otros compuestos estrógenicos aumentan la pigmentación testicular, tal como lo demostró Wolf et al. (2010). Y esto estaría

en concordancia con las funciones de protección asociadas a los melanocitos en los testículos y que han sido mencionadas en el Capítulo II.

La exposición de los anfibios a compuestos químicos de uso agroindustrial, puede ocasionar una inhibición de la aromatasa, enzima que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos, que podría llevar a consecuencias reproductivas adversas (Olmstead et al. 2009), ya que es capaz de inhibir la síntesis de estradiol y por lo tanto afectar la diferenciación del ovario.

A diferencia de los ovarios de las hembras del tratamiento control y de los individuos expuestos a las dos menores concentraciones (43,7, y 87,5 mg/l), los ovarios de las hembras de las mayores concentraciones (175, 262,5 mg/l), mostraron histológicamente que se encontraban en un estado de desarrollo más retrasado. Las primeras mostraban un estado de desarrollo ovárico VIII/VIX, y las últimas un estado VI/ VII, respectivamente, de acuerdo a la clasificación propuesta por Ogielska y Kotusz (2004). No existen estudios que hayan reportado dicho efecto en renacuajos de anuros, y el hecho de que los juveniles tengan un retraso en el desarrollo del ovario, es un aspecto interesante en profundizar en futuros estudios.

Stebbins-Boaz et al. (2004), probaron la sensibilidad y maduración in vitro de los ovocitos de *Xenopus* ante la exposición a 2,4-D. Estos autores concluyeron que este herbicida induce cambios morfológicos a nivel del citoesqueleto y bioquímicos, que evitan que la progesterona pueda inducir la maduración de los ovocitos en *Xenopus laevis*. Rodriguez et al. (1994) registraron resultados similares en *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura), y concluyen que un retraso en la maduración y crecimiento de los ovocitos, puede alterar los ciclos gonadales, así como producir cambios en la normal reproducción de las especies.

El hígado es el sitio primario de metabolismo, detoxificación y excreción de sustancias tóxicas (Hall y Gyton 2011) y es uno de los principales órganos que se ve afectado por la exposición a contaminantes. Pereira de Paiva et al. (2017) registraron presencia de vacuolización citoplasmática y nuclear, inclusiones hialinas citoplasmáticas, y necrosis en hígados de *Piaractus*

mesopotamicus expuestos a atrazina. En *Bufo variabilis* expuesto a carbaril se encontraron congestión, agrandamiento de sinusides y vacuolización de los hepatocitos, así como un mayor número de MM en hígados respecto al control (Cakici 2015). Por otra parte en *Pelophylax ridibundus* expuestos a concentraciones subletales del insecticida Talstar10EC, se registró lesiones hepáticas tales como vacuolización y picnosis nuclear en hepatocitos, dilatación del espacio de Disse y de capilares sinusoides (Paunescu et al. 2012).

Los biomarcadores histológicos como los MMs son útiles como indicadores de contaminación (Bernet et al. 1999; Passantino et al. 2013; Huespe et al. 2017). Los MMs sintetizan melanina, un pigmento protector capaz de eliminar los radicales libres y neutralizar los cationes, protegiendo los tejidos de daño citotóxico (Scalia et al. 1990; Barni et al. 1999). Se ha registrado un marcado incremento en el número de MMs en adultos de *Pelophylax ridibundus* luego de la exposición a cadmio (Loumbourdis y Vogiatzis 2002); en *Pelophylax ridibundus* expuesta al insecticida Reldan 40EC (Paunescu et al. 2010), *Bufo variabilis* expuesto a carbaril (Cakici 2015), *L. chaquensis* expuesto a glifosato (Pérez Iglesias et al. 2016), y *L. chaquensis* expuesto a clorpirifos (Huespe et al. 2017). De igual forma, en renacuajos de *Lithobates catesbeianus* expuestos al herbicida clomazone solo y en adición a nanopartículas de quitosano con alginato (De Oliveira et al. 2016). Y en renacuajos de *Leptodactylus latrans* expuestos a Roundup® Ultramax y glifosato, se observaron alteraciones histológicas como lipidosis y congestión en tejido hepático e incremento en el número de MMs (Bach et al. 2018).

Los renacuajos de *P. albonotatus* expuestos crónicamente a 2,4-D Amina Zamba® también mostraron alteraciones del tejido hepático y proliferación de MMs. A pesar de que el incremento de MMs no mostró una relación dosis-respuesta, en las mayores concentraciones (87,5, 175, 262,5 mg/l de 2,4-D Amina Zamba®), el número de MM fue significativamente mayor que en los controles y que en la menor concentración. A este incremento se lo asocia con procesos de detoxificación (Harraez y Zapata 1986) y con su rol en

la función inmune (Steinel y Bolnick 2017) y es por ello que diversos autores lo usan como biomarcadores de contaminación (Stentiford et al. 2003).

CAPÍTULO IV

“Consideraciones finales y conclusiones”

4. Capítulo IV: Consideraciones finales y conclusiones

4.1 “Anormalidades en la morfología e histología gonadal y hepática en anuros adultos de cultivos de arroz”.

A partir de los resultados de este estudio se refuerzan las evidencias de que los agroecosistemas contribuyen a la comprensión de la toxicidad de agroquímicos y sus efectos deletéreos en especies silvestres.

En este sentido, se sostienen las siguientes conclusiones:

- ✓ El volumen testicular de *Lysapsus limellum* y *Rhinella bergi* no mostró diferencias entre los animales de sitios cultivados con arroz y los de áreas de referencia seleccionadas en las provincias de Santa Fe y Chaco, respectivamente. Por lo que se sugiere que este parámetro no es específico y puede variar por otras causas externas (condiciones climáticas, variaciones intraespecíficas, estado reproductivo, edad, etc.).
- ✓ Se registraron tamaños irregulares entre ambos testículos en *L. limellum* y *R. bergi*, en los dos sitios agrícolas.
- ✓ La pigmentación testicular en *L. limellum* fue muy variable en los animales de ambos sitios. Es probable que esto se deba a variaciones intraespecíficas, ya que las evidencias no son suficientes para vincularlos con los efectos de la actividad agrícola.
- ✓ Los individuos de *L. limellum* del arrozal de la provincia de Santa Fe, presentaron una mayor proporción de cistos con células en estadios tempranos de la espermatogénesis y una mayor proporción de túbulos seminíferos con nula o escasa cantidad de espermatozoides libres en el lumen de los testículos con respecto a los animales del sitio de referencia. Por otra parte, los individuos de *R. bergi* del arrozal ubicado en la provincia de Chaco, también presentaron una mayor proporción de cistos con células en estadios tempranos de la espermatogénesis al comparar a su sitio de referencia. No obstante la proporción de túbulos con abundante cantidad de espermatozoides no difirió

entre animales de ambos sitios. La proporción de túbulos con moderada cantidad de espermatozoides fue mayor en animales del arrozal. Estos resultados indican que la espermatogénesis puede afectarse en los animales de sitios agrícolas convencionales, y al considerar los resultados, la simultaneidad de muestreo, las características ambientales, la similitud en el tipo y fenología de la aplicación de plaguicidas se puede considerar a *L. limellum* una especie mayormente sensible y afectada por estas actividades.

✓ El órgano de Bidder de machos adultos de *R. bergi* del arrozal de la provincia de Chaco presentó alteraciones en su morfología (lobulados o con folículos agrandados). Asimismo, se observó la presencia de células pigmentarias, folículos atrésicos, y vacuolas en los folículos, en baja proporción. Se resalta la importancia del análisis del órgano de Bidder en los bufónidos en los estudios ecotoxicológicos, ya que es un órgano blanco útil a la hora de evaluar los efectos de los plaguicidas, principalmente aquellos con efecto estrogénico.

✓ Los ovocitos registrados en el tejido testicular de individuos de *R. bergi* de Ref 2 no se consideran como una alteración histológica. Por la posición del órgano de Bidder respecto al testículo, los ovocitos corresponderían a ovocitos bidderianos.

✓ En hígado de individuos macho de ambas especies colectadas en los sitios cultivados de Santa Fe y Chaco se registró agrandamiento de sinusoides, venas dilatadas, vacuolización de hepatocitos, hipervascularización.

✓ Los individuos *R. bergi* del área agrícola poseían mayor cantidad de MMs que los individuos del sitio de referencia, mientras que esto no se observó en *L. limellum*.

✓ El análisis del número de MMs en el tejido hepático de anuros adultos que habitan en ambientes naturales (agrícolas y sin actividad agrícola), debería incluir el análisis más exhaustivo de otros factores extrínsecos o intrínsecos, como ser presencia de metales, estado fisiológico, edad, etc. que pueden causar la proliferación o incremento del número de MMs.

4.2 “Efectos letales y subletales causados por la exposición a un formulado comercial en base a 2,4-D en renacuajos de *Physalaemus albonotatus* (Anura: Leptodactylidae)”.

Los resultados de este trabajo demuestran la ecotoxicidad de un formulado comercial en base a 2,4-D (Amina Zamba®) sobre larvas de *P. albonotatus*.

Los conocimientos de las concentraciones de 2,4-D informadas para ambientes son útiles para estimar y prevenir posibles impactos en la fauna acuática en base a los cálculos de riesgo ecotoxicológico. Las concentraciones conocidas en ambientes acuáticos de otros lugares del mundo, son menores a las concentraciones empleadas en esta investigación. En general estas concentraciones ambientalmente relevantes han sido determinadas en ambientes lóticos como ríos, siendo muy pocos los trabajos que se refieren a ambientes lénticos, como lagunas (sitios reproductivos para algunas de las especies de anfibios en Argentina). Sin embargo, no se puede descartar que existan concentraciones elevadas luego de aplicaciones directas, descarga accidental o derrames del herbicida y a pocas horas de aplicación como se ha observado en reiteradas oportunidades en campos de soja y/o arroz con mortalidades masivas de la fauna asociada (Peltzer com. Pers.).

En este sentido se concluye que:

- ✓ La CL50_{96h} calculada para *P. albonotatus* (350mg/l de 2,4-D Amina Zamba®) comparada con la de otras especies de anuros mencionadas en la discusión, expuestas a otros formulados en base a 2,4-D (Freitas et al. 2019), o al compuesto activo (Morgan et al. 1996; Figueredo y De Jesus Rodriguez 2014), indica que este compuesto tiene un menor efecto agudo sobre la mortalidad de los renacuajos.
- ✓ Luego de la exposición crónica, las medidas morfológicas (longitud hocico cloaca, longitud total y peso corporal) tomadas en los renacuajos de *P. albonotatus* no variaron entre los tratamientos y control. Similar a lo observado en en adultos, consideramos que estos parámetros por sí solos, no resultan

adecuados para comparar y determinar la ecotoxicidad de uno o varios agroquímicos.

✓ Los renacuajos expuestos a al formulado en base a 2,4-D Amina Zamba®, presentaron menor tiempo en alcanzar la metamorfosis en comparación al control. Son necesarios más estudios para establecer si existe una posible relación entre la disrupción de las hormonas tiroideas o alguna vía reguladora de la metamorfosis y el efecto del herbicida 2,4-D.

✓ Se registraron anomalías en la morfología del disco oral y visceral (intestino) en renacuajos de *P. albonotatus* expuestos crónicamente a 2,4-D Amina Zamba ®. Estas anomalías podrían influir en su supervivencia, metamorfosis, asimilación de nutrientes, y aptitud o performance natatoria.

✓ La exposición crónica a 2,4-D Amina Zamba® produce alteraciones hepáticas o lesiones (agrandamiento de sinusoides, hipervascularización, dilatación de venas y vacuolización de los hepatocitos). Estos resultados coinciden con lo mencionado anteriormente para los anuros colectados en los cultivos de arroz. Lo que permite inferir que estos individuos estarían crónicamente expuestos a plaguicidas en estos ambientes.

✓ El incremento en el número de MMs observado mediante el análisis histológico del hígado resulta un importante biomarcador de alteración del sistema antioxidante por 2,4-D Amina Zamba® en renacuajos en condiciones de laboratorio.

✓ No se observaron alteraciones histológicas en testículos de renacuajos de *P. albonotatus* expuestos al herbicida en las concentraciones de 2,4-D Amina Zamba® utilizadas en el ensayo crónico.

✓ Los ovarios de renacuajos hembras expuestas a las mayores concentraciones (175, 262,5 mg/l) de 2,4-D Amina Zamba® presentaron un estado de desarrollo más retrasado respecto al control y a las menores concentraciones del herbicida.

Sobre la base de estas conclusiones, se pudieron aceptar las hipótesis planteadas en el capítulo I:

Los productos agroquímicos utilizados en los cultivos de arroz producen alteraciones en la morfo-histología gonadal en anfibios anuros adultos y causan histopatologías hepáticas por exposiciones crónicas en *L. limellum* y *R. bergi*.

El formulado comercial 2,4-D Amina Zamba® altera el desarrollo, morfología e histología gonadal en renacuajos de *P. albonotatus*. Asimismo, la exposición crónica al compuesto causa alteraciones histopatológicas en el tejido hepático.

Por último, la información obtenida en relación a los efectos de las actividades agrícolas, brinda nuevas evidencias del riesgo ecotoxicológico al que están expuestos los anfibios anuros en los cultivos de arroz en las provincias de Santa Fe y Chaco.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M.J. 1999.** Correlated factors in amphibian decline: exotic species and habitat change in western Washington. *Journal of Wildlife Management*. 63, 1162–1171.
- Agius, C., Roberts, R.J. 2003.** Melano-Macrophage Centres and their Role in Fish Patology. *Journal of Fish diseases*. 26 (9), 499–509.
- Agostini, M.G., Kacolis, F., Demetrio, F., Natale, G.S., Bonetto, C., Ronco, A.E. 2013.** Abnormalities in amphibian population inhabiting agroecosystems in northeastern Buenos Aires Province, Argentina. 104, 163–171.
- Agostini, M.G., Roesler, I., Bonetto, C., Ronco, A.E., Bilenca, D. 2020.** Pesticides in the real world: The consequences of GMO-based intensive agriculture on native amphibians. *Biological Conservation*. 241, 108355.
- Aizen, M.A., Garibaldi, L.A., Dondo, M. 2009.** Expansión de la soja y diversidad de la agricultura argentina. *Austral Ecology*. 19, 45–54.
- Alford, R.A., Richards, S.J. 1999.** Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 30, 133–165.
- Alonso, L.L., Demetrio, P.M., Etchegoyen, M.A., Marino, D.J. 2018.** Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Science of the Total Environment*. 645, 89–96.
- American Society of Ichthyologists and Herpetologists. (ASIH). 2004.** Guidelines for Use of Live Amphibians and Reptiles in Field and laboratory Research. Herpetological Animal Care and Use Committee, Washington, DC. [Http://asih.org/sites/default/files/documents/resources/guidelinesherpsresearch2004.pdf/](http://asih.org/sites/default/files/documents/resources/guidelinesherpsresearch2004.pdf/)
- AmphibiaWeb. 2019.** University of California, Berkeley, CA, USA. [Https://amphibiaweb.org](https://amphibiaweb.org).
- Aparicio, V.C., De Geronimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., Costa, J.L. 2013.** Environmental Fate of Glyphosate and

Aminomethylphosphonic Acid in Surface Waters and Soil of Agricultural Basins. *Chemosphere*. 93, 1866–1873.

Apodaca, M.J., Crisci, J.V., Katinas, L. 2015. Las provincias fitogeográficas de la Republica Argentina: definición y sus principales áreas protegidas. En: Casas, R.R., Albarracin, G.F. (Eds.). El deterioro del suelo y del ambiente en la Argentina. Tomo I. ciudad Autónoma de Buenos Aires: Fundacion Ciencia Educacion y Cultura. 79–101p.

Arellano, M.L. 2012. Susceptibilidad y sensibilidad de algunas especies de anuros a la infección por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata.

Armenti, A.E., Zama, A.M., Passantino, L., Uzumcu, M. 2008. Developmental methoxychlor exposure affects multiple reproductive parameters and ovarian folliculogenesis and gene expression in adult rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 233, 286–296.

Aronzon, C.M. 2013. Evaluación de la toxicidad de los contaminantes Cobre, Nonilfenol y Diazinón sobre embriones y larvas de *Rhinella (Bufo) arenarum*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Aronzon, C.M., Sandoval, M.T., Herkovits, J., Perez-Coll, C.S. 2011. Stage-Dependent toxicity of 2,4- Dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology*, 26, 373–381.

Asociación correntina de productores de arroz (ACPA).
http://www.acpaarrozcorrientes.org.ar/Paginas/El_arroz_estadisticas.html.

Ateeq, B., Farah, M. A., Ahmad, W. 2006. Evidence of apoptotic effects of 2,4-D and butachlor on walking catfish, *Clarias batrachus*, by transmission electron microscopy and DNA degradation studies. *Life Sciences*. 78, 977–986.

Attademo, A.M. 2010. Diversidad de Anfibios (Amphibia: Anura) en Cultivos de Soja de la Republica Argentina: Implicaciones en el Control Biológico de

Plagas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Attademo, M.A., Cabagna-Zenklusen, M., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Junges, C., Bassó, A. 2011. B-esterase activities and blood cell morphology in the frog *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province (Argentina). *Ecotoxicology*. 20, 274–282.

Attademo, A.M., Lorenzón R.E, Peltzer, P. M., Lajmanovich, R.C. 2018. Diversity of anurans in rice fields under organic and conventional management in Santa Fe province, Argentina. *Herpetological Review*. 49 (4), 632–635.

Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Cabagna, M., Fiorenza, G. 2007. Plasma B-esterases and glutathione S-transferase activities in the toad *Chaunus schneideri* (Amphibia, Anura) inhabiting rice agroecosystems of Argentina. *Ecotoxicology*. 16(8), 533–539.

Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Cabagna-Zenklusen, M., Junges, C.M., Lorenzatti, E., Aró, C., Grenón, P. 2015. Biochemical changes in certain enzymes of *Lysapsus llimellum* (Anura: Hylidae) exposed to chlorpyrifos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 113, 287–294.

Attademo, A.M.; Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C. 2005. Amphibians occurring in soybean and implications for biological control in Argentina. *Agriculture, Ecosystem and Environment*. 106, 389–394.

Babini, M.S., Bionda, C.L., Salas, N.E., Martino, A.L. 2015. Health status of tadpoles and metamorphs of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) that inhabit agroecosystems and its implications for land use. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 118, 118–125.

Bach, N.C. 2018. Efectos de herbicidas sobre la diferenciación sexual de *Leptodactylus latrans*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas.

- Bach, N.C., Marino, D.J.G., Natale, G.S., Somoza, G.M. 2018.** Effects of Glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the Neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (Amphibia: Anura). *Chemosphere*. 202, 289–297.
- Bagenal, T.B., y F.W. Tech. 1978.** Methods for assessment of a fish production in fresh waters. En: Bagenal, T.B. (ed.). *Age and Growth*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. 101–136 p.
- Bambaradeniya, C.N.B., Edirisinghe, J.P., De Silva, D.N. 2004.** Biodiversity associated with an irrigated rice agro-ecosystem in Sri Lanka. *Biodiversity Conservation*. 13, 1715–1753.
- Barbash, J.E., Resek, E.A. 1996.** Pesticides in ground water: Distribution, trends, and governing factors. En: Gilliom, R.J. (ed). *Pesticides in the hydrologic system (v.2)*: Chelsea, Mich., Ann Arbor Press, 588 p.
- Barni, S., Bertone, V., Croce, A.C., Bottiroli, G., Bernini, F., Gerzeli, G. 1999.** Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. *Journal of Anatomy*. 195, 19–25.
- Barni, S., Vaccarone, R., Bertone, V., Fraschini, A., Bernini, F., Fenoglio, C. 2002.** Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity hibernation) of *Rana esculenta* L. *Journal of Anatomy*. 200, 185–194.
- Barrionuevo, S., Mangione, S. 2006.** Chytridiomycosis in two species of *Telmatobius* (Anura: Leptodactylidae) from Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms*. 73, 171–174.
- Barrionuevo, P., Ponssa, M.L. 2008.** Decline of three species of the genus *Telmatobius* (Anura: Leptodactylidae) from Tucumán province, Argentina. *Herpetológica*. 64(1), 47–62.
- Beebee, T.J.C. 1997.** Changes in dewpond numbers and amphibian diversity over 20 years on chalk downland in Sussex, England. *Biological Conservation*. 81, 215–219.

- Berger, G., Graef, F., Pfeffer, H. 2013.** Glyphosate applications on arable fields considerably coincide with migratory amphibians. *Scientific Reports*. 3, 2622.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocumbe, R., Ragani, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lipsi, K.R., Marantelli, G., Parkes, H. 1998.** Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *PNAS*. 95, 9031–6.
- Bernabó, I., Biasone, P., Macirella, R., Tripepi, S., Brunelli, E. 2014.** Liver histology and ultrastructure of the Italian newt (*Lissotriton italicus*): normal structure and modifications after acute exposure to nonylphenol ethoxylates. *Experimental and Toxicology Pathology*. 66 (9e10), 455e468.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. 1999.** Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*. 22 (1), 25–34.
- Bertoluci, J., Rodrigues, M.T. 2002.** Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boracéia, Southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*. 23, 161–167.
- Bionda, C.L., Di Tada, I.E., Lajmanovich, R.C. 2011.** Composition of amphibian assemblages in agroecosystems from the central region of Argentina. *Russian Journal of Herpetology*. 18(2), 93–98.
- BirdLife International. 2004.** State of the world's birds: indicators for our changing world. BirdLife International, Cambridge, UK. https://www.birdlife.org/sites/default/files/attachments/BL_ReportENG_V1_1_spreads.pdf.
- Bishop, C.A., Mahony, N. A., Struger, J., Ng, P., Pettit, K. E. 1999.** Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activities in the Holland River watershed, Ontario, Canada (1990-1992). *Environmental Monitoring and Assessment*. 57, 21–43.

- Blaustein, A. R., Kiesecker, J.M. 2002.** Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letter.* 5, 597–608.
- Blaustein, A. R., Romansic, J. M., Kiesecker, J. M., Hatch, A. C. 2003.** Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions.* 9, 123–140.
- Blaustein, A.R., Wake, D.B. 1995.** The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American.* 272, 56–61.
- Bonansea, R.I., Amé, M.V., Wunderlin, D.A. 2013.** Determination of priority pesticides in water samples combining SPW and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquía River basin (Argentina). *Chemosphere.* 90, 1860–1869.
- Bongiovanni, B., Ferri, A., Brusco, A., Rassetto, M., Lopez, L.M., Evangelista de Duffard, A.M., Duffard, R. 2011.** Adverse Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on Rat Cerebellar Granule Cell Cultures Were Attenuated by Amphetamine. *Neurotoxicity Research.* Doi: 10.1007/s12640-010-9188-9.
- Boone, M.D. 2008.** Examining the single and interactive effects of three insecticides on amphibian metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 27(7), 1561–1568.
- Boone, M.D., James, D. 2005.** Aquatic and terrestrial mesocosms in amphibian ecotoxicology. *Applied Herpetology.* 2, 231–257.
- Bortolozzi, A., Evangelista, A., De Duffard, R., Duffard, M. 2004.** Antonelli, Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid exposure on dopamine D2-like receptors in rat brain. *Neurotoxicology Teratology.* 26, 599–605.
- Boyer, R., Grue, C.E. 1995.** The need for water quality criteria for frogs. *Environmental Health Perspectives.* 103, 352–355.
- Bradford, D.F. 1989.** Allopatric distribution of native frogs and introduced fishes in high Sierra Nevada lakes of California: implication of the negative effect of fish introductions. *Copeia.* 1989, 775–778.
- Bradford, D.F., Cooper, S.D., Jenkins, T.M. Jr, Kratz, K., Sarnelle, O., Brown, A.D. 1998.** Influences of natural acidity and introduced fish on

faunal assemblages in California alpine lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 55, 2478–2491.

Bradford, D.F., Tabatabai, F., Graber, D.M. 1993. Isolation of remaining populations of the native frog, *Rana muscosa*, by introduced fishes in Sequoia and Kings Canyon National Parks, California. *Conservation Biology*. 7, 882–888.

Brodeur, J.C., Sassone, A., Hermida, G.N., Codugnello, N. 2013. Environmentally-relevant concentrations of Atrazine induce non-monotonic acceleration of developmental rate and increased size at metamorphosis in *Rhinella arenarum* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 92, 10–17.

Brodeur, J.C., Svartz, G., Perez-Coll, C.S., Marino, D.J.G., Herkovits, J. 2009. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: Non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquatic Toxicology*. 91, 161–170.

Bruhl, C.A., Schmidt, T., Pieper, S., Alscher, A. 2013. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline?. *Scientific Reports*. 3, 1135.

Burel, F., Baudry, J. 2002. *Ecología del Paisaje. Conceptos, Métodos y Aplicaciones*. Ediciones Mundi Prensa, Madrid. 353 p.

Burkart, R., Bárbaro, N., Sánchez, R.O., Gómez, D.A. 1999. *Eco-regiones de la Argentina*. APN-Prodia, Buenos Aires, Argentina. 43 p.

Butinof, M., Fernández, M.J., Lantieri, M.J., Stimolo, M.I., Blanco, M., Machado, A.L., Franchini, G., Gioco, M., Portilla, M., Eandi, M., Sastre, A., Diaz, M.P. 2014. Pesticides and Agricultural work environments in Argentina. En: Larramendy, L., Soloneski, S. (Eds.). *Pesticides-Toxic Aspects*. 105–134 p.

Cakici, O. 2015. Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). *Experimental and Toxicology Pathology*. 67, 237–343.

- Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life (Freshwater, Marine) (CWQGs). 2014.** Canadian Council of Ministers of the Environment. [Http://st-ts.ccme.ca/en/index.html](http://st-ts.ccme.ca/en/index.html).
- Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. (CASAFE). 2013.** Mercado Argentino de productos fitosanitarios. [Http://www.casafe.org](http://www.casafe.org).
- Campbell, A. 1999.** Declines and Disappearances of Australian frogs. Environment Australia Library, Canberra, Australia. 236 p.
- Capdevila-Argüelles, L., Zilleti, B., Álvarez, V.A.S. 2013.** Causas de la pérdida de biodiversidad: Especies Exóticas Invasoras. Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural, (2ª época). 10, 55–75.
- Caquet, T., Lagadic, L., Jonot, O., Baturu, W., Kilanda, M., Simon, P., LeBras, S., Echaubard, M., Ramade, F. 1996.** Outdoor experimental ponds (mesocosms) designed for long-term ecotoxicological studies in aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 34, 125–133.
- Cardoso-Vera, J.D., Islas-Flores, H., SanJuan-Reyes, N., Montero-Castro, E.I., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Elizalde-Velázquez, A., Dublán**
- García, O., Gómez-Oliván, L.M. 2017.** Comparative study of diclofenac-induced embryotoxicity and teratogenesis in *Xenopus laevis* and *Lithobates catesbeianus*, using the frog embryo teratogenesis assay: Xenopus (FETAX). *Science of the Total Environment*. 574, 467–475.
- Carey, C., Bryant, C.J. 1995.** Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. *Environmental Health Perspectives*. 103, 13–17.
- Carlsson, G., Örn, S., Larsson, D.G.J. 2009.** Effluent from bulk drug production is toxic to aquatic vertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28 (12), 2656–2662.
- Carr, J.A., Gentles, A., Smith, E.E., Goleman, W.L., Urquidi, L.J., Thuett, K., Kendall, R.J., Giesy, J.P., Gross, T.S., Solomon, K.R., Van Der Kraak, G. 2003.** Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: assessment of

growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22, 396–405.

- Carrier, J.A., Beebee, T.J.C. 2003.** Recent, substantial, and unexplained declines of the common toad *Bufo bufo* in lowland England. *Biological Conservation*. 111, 395–399.
- Casco, V.H., Izaguirre, M.F., Marín L., Vergara, M.N., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P., Peralta Soler, A. 2006.** Apoptotic cell death in the central nervous system of *Bufo arenarum* tadpoles induced by cypermethrin. *Cell Biology and Toxicology*. 22, 199–211.
- Catenazzi, A. 2015.** State of the World's Amphibians. *The Annual Review of Environmental Resources*. Doi: 10.1146/annurev-environ-102014-021358.
- Cattaneo, R., Loro, V.L., Spanevello, R., Silveira, F.A., Luz, L., Miron, D.S., Fonseca, M.B., Moraes, B.S., Clasen, B. 2008.** Metabolic and histological parameters on silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to comercial formulation of 2,4-diclorophenoxyacetic acid (2,4D) herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 92, 133–137.
- Chae, J.P., Park, M.S., Hwang, Y.S., Min, B.H., Kim, S.H., Lee, H.S., Park, M.J., 2015.** Evaluation of developmental toxicity and teratogenicity of diclofenac using *Xenopus* embryos. *Chemosphere* 120, 52–58.
- Charles, J.M., Hanley, T.R.J., Wilson, R.D., van Ravenzwaay, B., Bus, J.S. 2001.** Developmental toxicity studies in rats and rabbits on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its forms. *Toxicology Science*. 60(1), 121–131.
- Cheek, A.O., Ide, C.F., Bollinger, J.E., Rider, C.V., McLachlan, J.A. 1999.** Alteration of leopard frog (*Rana pipiens*) metamorphosis by the herbicide acetochlor. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 37(1), 70–77.
- Chelgren, N.D., Rosenberg, D.K., Heppel, S.S., Gitelman, A.I. 2006.** Carryover aquatic effects on survival of metamorphic frogs during pond migrations. *Ecological Applications*. 16(1), 250–261.
- Chingombe, P., Saha, B., Wakeman, R. J. 2006.** Effect of surface modification of activated carbon on the sorption of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and

benazolin from water. *Journal of Colloid and Interface Science*. 297, 434–442.

Coady, K., Marino, T., Thomas, J., Sosinski, L., Neal, B., Hammond, L. 2013. An evaluation of 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid in the Amphibian metamorphosis Assay and the Fish Short-Term Reproduction Assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 90, 143–150.

Coady, K.K., Murphy, M.B., Villanueva, D.L., Hecker, M., Jones, P.D., Carr, J.A., Salomon, K.R., Smith, E.E., Van Der Kraak, G., Kendall, R.J., Giesy, J.P. 2004. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, and gonadal development in the green frog (*Rana calamitans*). *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 67, 941–957.

Coady, K.K., Murphy, M.B., Villanueva, D.L., Hecker, M., Jones, P.D., Carr, J.A., Salomon, K.R., Smith, E.E., Van Der Kraak, G., Kendall, R.J., Giesy, J.P. 2005. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 62, 16–173.

Collins, J.P., Storfer, A. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions*. 9, 89–98.

Conte, C. E., Machado, R.A. 2005. Riqueza de especies e distribuição espacial y temporal em comunidade de anuros (Amphibia, Anura) em uma localidade de Tijucas do Sul, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoología*. 22, 940–948.

Cooke, A.S. 1972. The effect of DDT, Dieldrin and 2,4D on Amphibian Spawn and Tadpoles. *Environmental Pollution*. 3(1), 51-68.

Crain, D.A., Guillette, L.J. Jr., Rooney, A.A., Pickford, D.B. 1997. Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environmental Health Perspectives*. 105, 528–533.

Crawshaw, G.J. 1992. The role of disease in amphibian decline. En: Bishop, C.A., Pettit, K.E. (Eds.). *Declines in Canadian amphibian populations:*

designing a national monitoring strategy. Occasional paper no 76. Ottawa, Ontario: Canadian Wildlife Service. 60–62 p.

Crawshaw, G.J. 1997. Disease in Canadian amphibian populations. *Herpetological Conservation*. 1, 258–270.

Crestani, M., Menezes, C., Gluzcak, L., dos Santos Miron, D., Spanevello, R., Silveira, A., Ferrerira Goncalves, F., Zanella, R., Loro, V.L. 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere*. 67, 2305–2311.

Croteau, M.C., Hogan, N., Gibson, J.C., Lean, D., Trudeau, V.L. 2008. Toxicological threats to amphibians and reptiles in urban environments. En: Mitchell, J.C., Jung Brown, R.E., Bartholomew, B. (Eds) *Urban herpetology*. *Herpetological Conservation* 3. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Salt Lake City, Utah. 197–209 p.

Crump, D., Werry, K., Veldhoen, N., Van Aggelen, G., Helbing, C.C. 2002. Exposure to the herbicide acetochlor alters thyroid hormone-dependent gene expression and metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Environ Health Perspectives*. 110(12), 1199–1205.

Crump, M.L., Scott, N.J. 2001. Relevamiento por encuentros visuales. En: Heyer, W.R., M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, C. Hayek y M.S. Foster. (Eds.) *Medición y monitoreo de la diversidad biológica, Métodos estandarizados para anfibios*. Editorial universitaria de la Patagonia. 80–87 p.

Curi, L.M., Céspedes, J.A., Álvarez, BB. 2014. Composición, distribución espacial y actividad de vocalización de un ensamble de anuros dentro de la región fitogeográfica del Chaco Oriental. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85, 1197–1205.

Curi, L.M., Peltzer, P.M., Martinuzzi, C., Attademo, M.A., Seib, S., Simoniello, M.F., Lajmanovich, R.C. 2017. Altered development, oxidative stress and DNA damage in *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) larvae exposed to poultry litter. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 14, 62–71.

- Curi, L.M., Peltzer, P.M., Sandoval, M.T., Lajmanovich, R.C. 2019.** Acute Toxicity and Sublethal Effects Caused by a Commercial Herbicide formulated with 2,4D on *Physalaemus albonotatus* Tadpoles. *Water, Air & Soil Pollution*, 230, 22.
- Das, B.C., Thapa, P., Karki, R., Das, S., Mahapatra, S., Liu, T., Torregroza, P., Wallace, D.P., Kambhampati, S., Van eldhuizen, P., Verma, A., Ray, S.K., Evans, T. 2014.** Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 22(2), 673–683.
- Daughton, C.G., Ternes, T.A. 1999.** Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*. 107, 907–938.
- Davidson, C. 2004.** Declining downwind: Amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecological Applications*. 14(6), 1892–1902.
- Davidson, C., Knapp, R.A. 2007.** Multiple stressors and amphibian declines: dual impacts of pesticides and fish on yellow-legged frogs. *Ecological Applications*. 17(2), 587–597.
- Davidson, C., Shaffer, H.B., Jennings, M.R. 2002.** Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. *Conservation Biology*. 16(6), 1588–1601.
- De Bernardi, L. 2017.** Perfil del Mercado de arroz. Ministerio de agroindustria. https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/areas/regionales/_archivos/000030_Informes/000020_Arroz/000021_Perfil%20de%20Arroz%20-%202017.pdf.
- De Gerónimo, E., Aparicio, V. C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., Costa, J. L. 2014.** Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere*. 107, 423–431.
- De Gregorio, L.S., Franco-Belussi, L., Gomes, F.R., de Oliveira, C. 2016.** Flutamide effects on morphology of reproductive organs and liver of Neotropical anura, *Rhinella schneideri*. *Aquatic Toxicology*. 176, 181e189.

- De Oliveira, C., Sant'Anna, A.C., Omena, P.M., de Souza Santos, L.R.S., Zieri, R. 2003.** Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*. *Biociencias*. 11, 39–46.
- De Oliveira, C.R., Fraceto, L.F., Rizzi, G.M., Salla, R.F., Abdalla, F.C., Costa, M.J., Silva-Zacarin, E.C.M. 2016.** Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. *Chemosphere*. 149, 304–313.
- De Souza Santos, L.R., Classius de Oliveira. 2008.** Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae). *Micron*. 39(8), 1266–1270.
- De Souza Santos, L.R., Franco-Belussi, L., Zieri, R., Borges, R.E., Oliveira, C. 2014.** Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anatomical Research*. 297(5), 864–875.
- Denver, R.J. 2009.** Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. *General and Comparative Endocrinology*. 164, 20–31.
- Denver, R.J. 2013.** Neuroendocrinology of Amphibian metamorphosis. *Current Topics in Developmental Biology*. 103, 195–227.
- Devine, G.J., Furlong, M.J. 2007.** Insecticide use: contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values*. 24, 281–306.
- Díaz, B.P., L.M. Contreras. 2013.** Contaminación de aguas superficiales por residuos de plaguicidas en Venezuela y otros países de Latinoamérica. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29, 7–23.
- Dos Santos, T.G., Rossa-Feres, D.C., Casatti, L. 2007.** Diversidade e distribuição espaço-temporal de anuros em região com pronunciada estação seca no sudeste do Brasil. *Iheringia*. 97, 37–49.
- Du Preez, L.H., Kunene, N., Everson, G.J., Carr, J.A., Giesy, J.P., Gross, T.S., Hosmer, A.J., Kendall, R.J., Smith, E.E., Solomon, K.R., Van Der kraak, G.J. 2008.** Reproduction, larval growth, and reproductive

development in African clawed frog (*Xenopus laevis*) exposed to atrazine. *Chemosphere*. 71, 546–552.

Duarte-Guterman, P., Langlois, V. S., Hodgkinson, K., Pauli, B. D., Cooke, G. M., Wade, M. G., Trudeau, V. L. 2010. The aromatase inhibitor fadrozole and the 5-reductase inhibitor finasteride affect gonadal differentiation and gene expression in the frog *Silurana tropicalis*. *Sexual Development*. 3, 333–341.

Duffus, A.L.K., Waltek, T.B., Stöhr, A.C., Allender, M. C., Gotesman, M., Whittington, R.J., Hick, P., Hines, M.K., Marschang, R.E. 2015. Distribution and host range of ranaviruses, En: Gray, M. J., Chinchir, V.G. (Eds.). *Ranaviruses. Lethal pathogens of ectothermic vertebrates*, Springer Open. 9–57 p.

Dunham, A.E. 1981. Populations in a fluctuating environment: The comparative population ecology of the Iguanid Lizards *Sceloporus merriami* and *Urosaurus ornatus*. *Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan*. 158, 1–61.

Duré, M.I., Kehr, A.I. 2001. Differential Exploitation of Trophic Resources by Two Pseudid Frogs from Corrientes, Argentina. *Journal of Herpetology*. 35 (2), 340–343.

Duré, M.I., Kehr, A.I. 2006. *Bufo bergi*. Diet. *Herpetological Review*. 37 (3), 334–335.

Duré, M.I., Kehr, A.I., Schaefer, E.F., Marangoni, F. 2008. Diversity of amphibians in rice fields from north-eastern Argentina. *Interciencia*. 33, 523–527.

Dutta, H.M., Meijer H.J.M. 2003. Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analysis. *Environmental Pollution*. 125, 355–360.

Dutta, H.M., Misquita, D., Khan, S. 2006. The effects of Endodulfan on the testes of Bluegill Fish, *Lepomis macrochirus*: A Histopathological Study. *Archives of environmental Contamination and Toxicology*. 51, 149–156.

- Earl, J.E., Chaney, J.C., Sutton, W.B., Lillard, C.E., Kouba, A.J., Langhorne, C., Krebs, J., Wilkes, R.P., Hill, R.D., Miller, D.L., Gray, M.J. 2016.** Ranavirus could facilitate local extinction of rare amphibian species. *Oecología*. 182(2), 611–623.
- Edward, T.M., Moore, B.C., Guillette, L.J. Jr. 2006.** Reproductive dysgenesis in wildlife: a comparative view. *International Journal of Andrology*. 29, 109–112.
- Egea-Serrano, A., Relyea, R.A., Tejedo, M, Torralva, M. 2012.** Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review. *Ecology and Evolution*. 2, 1382–1397.
- Eggert C. 2004.** Sex determination: the amphibian models. *Reproduction Nutrition Development, EDP Sciences*. 44 (6), 539–549.
- Ewers, R.M., Didham, R.K. 2006.** Confounding factors in the detection of species responses to hábitat fragmentation. *Biological Reviews*. 81, 117–142.
- Fahrig, L. 2003.** Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 34: 487–515.
- Fairchild, J.F., Allert, A., Sappington, L.S., Nelson, K.J., Valle, J. 2008.** Using accelerated life testing procedures to compare the relative sensitivity of rainbow trout and the threatened bull trout to three commonly-used rangeland herbicides (picloram, 2,4-D and clopyralid). *Environmental Toxicology Chemistry*. 27(3), 623–630.
- Fairchild, J.F., Feltz, K.P., Allert, A.L., Sappington, L.C., Nelson, K.J., Valle, J.A. 2009.** An Ecological Risk Assessment of the Exposure and Effects of 2,4-D Acid to Rainbow Trout (*Onchorhyncus mykiss*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 56, 754–760.
- Fairweather, P., Napier, G. 1998.** Environmental indicators for national state of the environment reporting: Inland waters, Australia: State of the

Environment (Environmental Indicator Reports), Department of the Environment, Canberra, Australia. 80 p.

- Falconi, R., Dalpiaz, D., Zaccanti, F. 2007.** Morphological aspects of gonadal morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia, Anura): Bidder's organ differentiation. *The Anatomical Record*. 290, 801–813.
- FAO. 2011.** The state of food and agriculture Women in Agriculture Closing the Gender gap for Development FAO. [Http://www.fao.org/3/a-i2050e.pdf](http://www.fao.org/3/a-i2050e.pdf).
- Farah, M.A., Ateeq, B., Ali, M.N., Ahmad, W. 2003.** Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54, 25–29.
- Farias, C.F., Carvalho-e-Silva, S.P., Brito-Gitirana, L. 2002.** Bidder's organ of *Bufo ictericus*: a light and electron microscopy analysis. *Mícron*. 33, 673–679.
- Fenoglio, C., Boncompagni, E., Fasola, M., Gandini, C., Comizzoli, S., Milanesi, G., Barni, S. 2005.** Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the anuran *Rana esculenta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60, 259–268.
- Ferreira, A., Mehanna, M., Prado, C.P.A. 2008.** Morphologic and morphometric analysis of testis of *Pseudis limellum* (Cope, 1868) (Anura: Hylidae) during the reproductive cycle in the Pantanal, Brazil. *Biocell*. 32(2), 185–194.
- Figueredo, J., De Jesus Rodrigues, D. 2014.** Effects of four types of pesticides on survival, time and size to metamorphosis of two species of tadpoles (*Rhinella marina* and *Physalaemus centralis*) from the southern Amazon, Brazil. *Herpetological Journal*. 24, 7–15.
- Firbank, L.G., Petit, S., Smart, S., Blain, A., Fuller R.J. 2008.** Assessing the impacts of agricultural intensification on biodiversity: a British perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 363, 777–787.
- Flaherty, C.M., Dodson, S.I. 2005.** Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere*. 61, 200–207.

- Foley, J.A., DeFries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R., Chapin, F.S., Coe, M.T., Daily, G.C., Gibbs, H.K., Helkowski, J.H., Holloway, T., Howard, E.A., Kucharik, C.J., Monfreda, C., Patz, J.A., Prentice, I.C., Ramankutty, N., Snyder, P.K. 2005.** Global consequences of land use. *Science*. 309, 570–574.
- Fort, D., Guiney, P., Weeks, J., Thomas, J., Rogers, R., Noll, A., Spaulding, C. 2004.** Effect of methoxychlor on various life stages of *Xenopus laevis*. *Toxicological Sciences*. 81, 454–466.
- Franco, A., Trapp, S. 2010.** A multimedia activity model for ionizable compounds: validation study with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, aniline, and trimethoprim. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29, 789–799.
- Franco-Belussi, L., Oliveira, C. 2011.** Lipopolysaccharides induce changes in the visceral pigmentation of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae). *Zoology*. 114, 298–305.
- Franco-Belussi, L., Proverte, D.B., De Oliveira, C. 2017.** Environmental correlates of internal coloration in frogs vary through space and lineages. *Ecology and Evolution*. 7, 9222–9233.
- Franco-Belussi, L., Skold, H.N, De Oliveira, C. 2016.** Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. *Journal of experimental Biology*. 219, 1378–1383.
- Franco-Belussi, L., Zieri, R., de Souza Santos, L. Moresco, R.M., de Oliveira, C. 2009.** Pigmentation in Anuran Testes: Anatomical Pattern and Variation. *The Anatomical Record*. 292, 178–182.
- Freitas, S.J., Felicio, A.A., Teresa, F.B., Alves de Almeida, E. 2017.** Combined effects of temperature and clomazone (Gamit®) on oxidative stress responses and B-sterase activity of *Physalaemus nattereri* (Leiuperidae) and *Rhinella schneideri* (Bufonidae) tadpoles. *Chemosphere*. 195, 548–562.
- Freitas, S.J., Franco-Belussi, L.F., de Oliveira, C. 2015.** Morphological and histochemical studies of Bidder's organ in *Rhinella schneideri* (Amphibia: Anura) males. *Italian Journal of Zoology*. 82, 479–488.

- Freitas, S.J., Girotto, L., Goulart, B.V., De Oliveira Goncalves, L., Gebara, R.C., Montagner, C.C., Schesari, L., Espínola, E.L.G. 2019.** Efectos of 2,4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 182, 109446.
- Freitas, S.J. 2013.** Efeito do hormônio 17β-estradiol na gametogênese dos órgãos de Bidder e testículos e no tecido hepático em machos de *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae). Disertacion de Maestria en Biología Animal. Universidad Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Sao Jose de Rio Preto.
- Gallant, A.L., Klaver, R.W., Casper, G.S., Lannoo, M.J. 2007.** Global rates of habitat loss and implications for amphibian conservation. *Copeia*. 4, 967–979.
- Ghirardi, R. 2011.** Estudio de quitridiomycosis por *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios anuros del Litoral, Cuyo y Patagonia Argentina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata. La Plata.
- Ghirardi, R., Levy, M.G., López, J.A., Steciow, M.M., Perotti, M.G. 2014.** *Batrachochytrium dendrobatidis* infecting anurans in a protected area from Santa Fe Province, Argentina. *Cuadernos de Herpetología*. 28, 29–31.
- Gilbertson, M-K., Haffner, G.D., Drouillard, K.G., Albert, A. Dixon, B. 2003.** Immunosuppression in the northern leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22, 101–110.
- Gilliom, R.J., Barbash, J.E., Crawford, C.G., Hamilton, P.A., Martin, J.D., Nakagaki, N., Nowell, L.H., Scott, J.C., Stackelberg, P.E., Thelin, G.P., Wolock, D.M. 2006.** Pesticides in the nation’s streams and ground water, 1992-2001. U.S. Geological Survey Circular 1291. 172 p.
- Glozier, N.E., Struger, J., Cessna, A.J., Gledhill, M., Rondeau, M., Ernst, W.R., Sekela, M.A., Cagampan, S.J., Sverko, E., Murphy, C. 2012.** Occurrence of glyphosate and acidic herbicides in select urban rivers and

streams in Canada, 2007. *Environmental Science and Pollution Research*. 19, 821–834.

Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V.K., Tushara Chaminda, G.G., Kyoungjin An, A., Kumar, M. 2018. Occurrence and fate of emerging contaminants in wáter environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development*. 6, 169–180.

Goldberg, J. 2014. Gonadal differentiation and development in the snouted treefrog, *Scinax fuscovarius* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Journal of Herpetology*. 49, 468–478.

Gonzalez, J.M., Smith, D.R., Livingston, S., Warnemuende-Pappas, E., Zwonitzer, M. 2016. Blind inlets: conservation practices to reduce herbicide losses from closed depressional areas. *Journal of Soils and Sediments*. 16, 1921–1932.

Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae, with notes on identification. *Herpetológica*. 16, 183–190.

Gramapurohit, N. P., Shanbhag, B. A., Saidapur, S. K. 2000. Pattern of gonadal sex differentiation, development, and onset of steroidogenesis in the frog, *Rana curtipes*. *General and Comparative Endocrinology*. 119, 256–264.

Gray, M. J., Miller, D.L., Hoverman, J.T. 2009. Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*. 87(3), 243–266.

Guillette, L.J., Iguchi, T. 2003. Contaminant-induced endocrine and reproductive alterations in reptiles. *Pure and Applied Chemistry*. 75(11-12), 2275–2286.

Gutiérrez, M.M. 2007. Evidence of endocrine disruption in amphibians due to agricultural chemical exposure. Disertación para obtener el título de Doctor en Filosofía. The State University of New Jersey, New Brunswick, New York. Habitat fragmentation. *Biological Reviews*. 81,117–142.

Hailey, A., Sooko, N., Mohammed, A., Khan, A. 2006. Factors affecting tadpoles growth: Developpment of rearing system for the Neotropical Leptodactylid *Physalaemus pustulosus* for ecotoxicological studies. *Applied Herpetology*. 3, 111–128.

- Hall, J., Guyton, A. 2011.** Textbook of Medical Physiology. 12 ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier. 1220 p.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V. 1977.** Trimmed Spearman–Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*. 11, 714–719.
- Harraez, M.P., Zapata, A.G. 1986.** Structure and function of the melanomacrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. *Veterinary Immunology Immunopathology*. 12(1-4), 117–26.
- Hayes, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Phoung Mai, V., Marjua, Y., Parker, J., Tsui, M. 2006b.** Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environmental Health Perspectives*. 114(1), 40–50.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A. 2002.** Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(8), 5476–5480.
- Hayes, T.B., Falso, P., Gallipeau, S., Stice, M. 2010a.** The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist’s perspective. *The Journal of Experimental Biology*. 213, 921–933.
- Hayes, T.B., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A. 2003.** Atrazine induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environmental Health and Perspectives*. 111(4), 568–575.
- Hayes, T.B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T., Gallipeau, S. 2010b.** Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107, 4612–4617.

- Hayes, T.B., Stuart, A.A., Mendoza, M., Collins, A., Noriega, N., Vonk, A., Johnston, G., Liu, R., Kpodzo, D. 2006a.** Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17 β -estradiol): support for the demasculinization/feminization hypothesis. *Environmental Health Perspectives*. 114, 134–141.
- Hayes, T.B., Wu, T.H. 1995.** Role of corticosterone in anuran metamorphosis and potential role in stress-induced metamorphosis. *Netherlands Journal of Zoology*. 45(1-2), 107–109.
- Hazell, D, Cunnungham, R., Lindenmayer, D., Mackey, B., Osborne, W. 2001.** Use of farm dams as frog habitat in an Australian agricultural landscape: factors affecting species richness and distribution. *Biological Conservation*. 102, 155–169.
- Heatwole, H. 2013.** Worldwide decline and extinction of amphibians. En: Rohde, K. (Ed.). *The balance of nature and human impact*, Cambridge University Press. 259–278 p.
- Hecker, M., Murphy, M.B., Coady, K.K., Villeneuve, D.L., Jones, P.D., Carr, J.A., Salomon, K.R., Smith, E.E., Van Der Kraak, G., Gross, T., Du Preez, L., Kendall, R.J., Gies, J.P. 2006.** Terminology of gonadal anomalies in fish and amphibians resulting from chemical exposures. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*. 187, 103–131.
- Herkovits, J., Perez-Coll, C.S. 2003.** AMPHITOX: A customized set of toxicity tests employing amphibian embryos. “Symposium on multiple stressor effects in relation to declining amphibian populations”. En: Linder, G.L., Crest, S., Sparling, D., Little, E.E. (Eds.). *Multiple Stressor Effects in Relation to Declining Amphibian Populations* ASTM International STP 1443, USA. 46–60 p.

- Herrera, R.A., Steciow, M.M., Natale, G.S. 2005.** Chytrid fungus parasitizing the wild amphibian *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) in Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms*. 64, 247–252.
- Hogan, N. S., Duarte, P., Wade, M. G., Lean, D. R., Trudeau, V. L. 2008.** Estrogenic exposure affects metamorphosis and alters sex ratios in the northern leopard frog (*Rana pipiens*): identifying critically vulnerable periods of development. *General and Comparative Endocrinology*. 156, 515–523.
- Howe, C.M., Berrill, M., Pauli, B.D., Helbing, C.C., Werry, K., Veldhoen, N. 2004.** Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23, 1928–1938.
- Hrynyk, M.A. 2017.** Effect of neocotinoid imidacloprid on embryogenesis and anuran survivorship in frog virus 3 infected tadpoles. Tesis para obtener el título de Master en Ciencias, Facultad de Artes y Ciencias. Ontario, Canadá.
- Huang, W.S., Lin, J.Y., Yu, J.Y.L. 1997.** Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanosticus* in Taiwan. *Zoological Sciences*. 14(3), 497–503.
- Huespe, I., Cabagna-Zenklusen, M., Curi, L.M., Attademo, M.A., Villafañe, N., Lajmanovich, R. 2017.** Melanomacrofagos hepáticos y actividad de la enzima Glutathion S-Transferasa en *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) como biomarcadores de estrés oxidativo por la exposición a Clorpirifos. *Acta Biológica Colombiana*. 22(2), 234–237.
- Humason, G.L. 1979.** *Animal Tissue Techniques*. Fourth Edition. W.H-Freeman and Company. San Fransisco. 661p.
- Hussain, Q.A., Pandit, A.K. 2012.** Global amphibian declines: A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*. 4(10), 348–357.
- Hyne, R.V., Spolyarich, N., Wilson, S.P., Patra, R.W., Byrne, M., Gordon, G., Sanchez-Bayo, F., Palmer, C.G. 2009.** Distribution of frogs in rice bays

within an irrigated agricultural area: links to pesticides usage and farm practices. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28, 1255–1265.

Inoue, D., Sei, K., Ike, M. 2010. Disruption of Retinoic Acid Receptor Signaling by Environmental pollutants. *Journal of Health Science*. 56(3), 221–230.

Islam, F., Wang, J., Muhammad, Fatoq, M.A., Jhan, M.S.S., Xu, L., Zhu, J., Zhao, M., Muños, S., Li, Q.X., Zhou, W. 2018. Potential impact of the herbicide 2,4-diclorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environment International*. 111, 332–351.

Ismail, B., Prayitno, S., Tayeb, M. 2015. Contamination of rice field water with sulfonylurea and phenoxy herbicides in the Muda Irrigation Scheme, Kedah, Malaysia. *Environmental and Monitoring Assessment*. 187, 406–414.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 2015. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Some Organochlorine Insecticides and Some Chlorphenoxy Herbicides. International Agency for Research on Cancer, Lyon. <https://monographs.iarc.fr/>.

Izaguirre, M.F., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Peralta-Soler, A., Casco, V.H. 2000. Cypermethrin-Induced apoptosis in the telencephalon of *Physalaemus biligonigerus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 65, 501–507.

Izaguirre, M.F., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Peralta-Soler, A., Casco, V.H. 2001. Induction of cell death by the synthetic pyrethroid insecticide cypermethrin in the developing brain of *Physalaemus biligonigerus* tadpoles from Argentina. *Froglog*. 43, 2.

Jansen, A., Healey, M. 2003. Frog communities and wetland condition: relationships with grazing by domestic livestock along an Australian floodplain river. *Biological Conservation*. 109, 207–219.

Jantawongsri, K., Thammachoti, P., Kitana, J., Khonsue, W., Varanusupakul, P., Kitana, N. 2015. Altered Immune Response of the

Rice Frog *Fejervarya limnocharis* Living in Agricultural Area with Intensive Herbicide Utilization at Nan Province, Thailand. *Environmental Asia*. 8(1), 68–74.

Jobling, S., Williams, R., Johnson, A., Taylor, A., Gross-Sorokin, M., Nolan, M., Tyler, C.R., van Aerle, R., Santos, E., Brighty, G. 2006. Predicted exposures to steroid estrogens in UK rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environmental Health Perspectives*. 114, 32–39.

Johnson, M.S., Paulus, H.I., Salice, C.J., Checkai, R.T., Simini, M. 2004. Toxicologic and histopathologic response of the terrestrial salamander *Plethodon cinereus* to soil exposures of 1,3,5-Trinitrohexahydro-1,3,5-Triazine. *Environmental Contamination and Toxicology*. 47 (4), 496e501.

Johnson, P.T., Lunde, K.B., Ritchie, E.G., Reaser, J.K., Launer, A.E. 2001. Morphological abnormality patterns in a California amphibian community. *Herpetológica*. 57, 336–352.

Jooste, A.M., Du Preez, L.H., Carr, J.A., Giesy, J.P., Gross, T.S., Kendall, R.J., Smith, E.E., Van der Kraak, G.L., Salomon, K.R. 2005. Gonadal development of larval male *Xenopus laevis* exposed to atrazine in outdoor microcosms. *Environmental Science and Technology*. 39, 5255–5261.

Kats, L.B., Ferrer, R.P. 2003. Alien predators and amphibian declines. *Diversity and Distributions*. 9, 99–110.

Kennepoh, E., Munro, I.C. 2001. Phenoxy herbicides. En: Krieger, R.I. (Ed.). *Handbook of pesticides toxicology*. 2nd ed. San Diego. Academic Press. 1623–1638 p.

Khan, M.Z., Law, F.C.P. 2005. Adverse effects of pesticides and repated chemicals on enzyme and hormone systems of fish, amohibians and reptiles: a review. *Proceeding of the Pakistan Academy of Sciences*. 42, 315–323.

Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W. 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*. 104, 8897–901.

- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R. 1997.** Population differences in responses of red-legged frogs (*Rana aurora*) to introduced bullfrogs. *Ecology*. 78, 1752–1760.
- Kim, HJ., Park, Y.I., Dong, M.S. 2005.** Effects of 2,4-D and DCP on the DHT-induced androgenic action in human prostate cancer cells. *Toxicological Sciences*. 88, 52–9.
- Klavarioti, M., Mantzavinos, D., Kassinos, D. 2009.** Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environmental International*. 35, 402–417.
- Kloas, W., Lutz, I., Springer, T., Krueger, H., Wolf, J, Holden, L., Hosmer, A. 2009.** Does atrazine influence larval development and sexual differentiation in *Xenopus laevis*? *Toxicological Sciences*. 107(2), 376–384.
- Knapp, R.A., Corn, P.S., Schindler, D.E. 2001.** The introduction of non native fish into wilderness lakes: good intentions, conflicting mandates, and unintended consequences. *Ecosystems*. 4, 275–278.
- Knutson, M. G., Sauer J. R., Olsen D. A., Mossman, M. J., Hemesath, L. M., Lannoo, M. J. 1999.** Effect of landscape composition and wetland fragmentation on frog and toad abundance and species richness in Iowa and Wisconsin, U.S.A. *Conservation Biology*. 13, 1437–1446.
- Knutson, M., Richardson, W., Reineke, D. M., Gray, B. R., Parmelee, J. R., Weick, S. E. 2004.** Agricultural ponds support amphibian population. *Ecological Applications*. 14 (3), 669–684.
- Kole, P.C., Chakraborty, N.R., Bhat, J.S. 2010.** Analysis of variability, correlation and path coefficients in induced mutants of aromatic non-basmati rice. *Tropical Agricultural Research and Extension*. 11, 60–64.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T. 2002.** Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*. 36, 1202–1211.
- Kraus, F. 2015.** Impacts from invasive reptiles and amphibians. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 46, 75–97.

- Krishnamurthy, S.V., Smith, G.R. 2011.** Combined effects of Malathion and Nitrate on early growth, Abnormalities, and mortality of Wood frog (*Ranas sylvatica*) tadpoles. *Ecotoxicology*. 20(6), 1361–1367.
- Kummerer, K. 2010.** Pharmaceuticals in the environment. *The Annual Reviews of Environmental Resources*. 35, 57–75.
- LaChepelle, A.M., Ruygrok, M.L., Toomer, M.E., Oost, J.J., Monnie, M.L., Swenson, J.A., Compton, A., Stebbins-Boaz, B. 2007.** The hormonal herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, inhibits *Xenopus* oocyte maturation by targeting translational and post-translational mechanisms. *Reproductive Toxicology*. 21, 20–31.
- La Farré, M., Pérez, S., Kantiani, L., Barceló, D. 2008.** Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC–Trends Analyt. Chemosphere*. 27, 991–1007.
- Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M., Cabagna, M.C. 2011.** Toxicity of Four Herbicide Formulations with Glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) Tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase Inhibitors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 60: 681–689.
- Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M. 2009.** Inhibition and recovery of brain and tail cholinesterases of *Odontophrynus americanus* tadpoles (Amphibia: Cycloramphidae) exposed to fenitrothion. *Journal of Environmental Biology*. 30, 923–926.
- Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Simoniello, M.F., Poletta, G.L., Junges, C.M., Peltzer, P.M., Grenon, P., Cabagna-Zenklusen, M.C. 2015.** Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2, 4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water Air & Soil Pollution*. 36, 226–427.
- Lajmanovich, R.C., Lorenzatti, E., Maitre, M.I., Enrique, S., Peltzer, P.M. 2003a.** Comparative acute toxicity of the comercial herbicides Glyphosate to neotropical tadpoles *Scinax nasicus* (Anura: Hylidae). *Fresenius Environmental Bulletin*. 12(4), 364–367.

- Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Cabagna-Zenklusen, M., Junges, C. M., 2012.** Los agroquímicos y sus impactos en los anfibios: un dilema de difícil solución. *Química Viva*. 3,184–198.
- Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Junges, C.M., Attademo, A.M., Sanchez, L.C., Bassó, A. 2010.** Activity levels of B-esterases in the tadpoles of 11 species of frogs in the middle Paraná River floodplain: Implication for ecological risk assessment of soybean crops. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73 (7), 1517–1524.
- Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Martinuzzi, C.S., Simoniello, M.F., Colussi, C.L., Cuzziol boccioni, A.P., Sigrist, M. 2019.** First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Heliyon* 5(10), e0260.
- Lajmanovich, R.C., Sandoval, M.T., Peltzer, P.M. 2003b.** Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed by Glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 70(3), 612–618.
- Langone, J.A. 2017.** ¿Qué sabemos de las potenciales amenazas a la biodiversidad en la Cuenca del río Santa Lucía en Uruguay? Una revisión sobre los anfibios (Amphibia, Anura). *Museo Nacional de Historia Natural*. 6, 1-153.
- Larsson, D.G.J., De Pedro, C., Paxéus N. 2007.** Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*. 148, 751–755.
- Lawrence, E., Isioma, T. 2010.** Acute toxic effects of Endosulfan and Diazinon pesticides on adult amphibians (*Bufo regularis*). *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. 2(5), 73–78.
- Lenardon, A. Enrique, S. 1998.** Insecticidas organoclorados en el río Paraná. *Natura Neotropicalis*. 29, 111–116.
- Lenkowski, J.R., McLaughlin, K.A. 2010.** Acute Atrazine exposure disrupts matrix metalloproteinases and retinoid signaling during organ

morphogenesis in *Xenopus laevis*. *Journal of Applied Toxicology*. 30(6), 582–589.

- Lenkowski, J.R., Reed, J.M., Deininger, L., McLaughlin, K.A. 2008.** Perturbation of organogenesis by the herbicide atrazine in the amphibian *Xenopus laevis*. *Environmental Health Perspectives*. 116(2), 223–230.
- Lenkowski, J.R., Sanchez-Bravo, G., McLaughlin, K.A. 2010.** Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2,4- dichloro phenoxy acetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. *Journal of Environmental Science*. 22(9), 1305–1308.
- Levy, G., Lutz, I., Krüger, A., Kloas, W. 2004.** Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environmental Research*. 94, 102–111.
- Li, Y., Cohen, J.M., Rohr, J.R. 2013.** Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. *Integrative Zoology*. 8, 145–161.
- Li, K., Wu, J., Jiang, L., Shen, L., Li, J., He, Z., Wei, P., Lv, Z., He, M., 2017.** Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. *Chemosphere* 171, 40–48.
- Lilienfeld, D., Gallo, M. 1989.** 2,4,5-T, and 2,3,7,8-TCDD: An overview. *Epidemiologic Reviews*.
- Lips, K. R., Brem, R. Brenes, J. D. Reeve, R. A. Alford, J. Voyles, C. Carey, L. Livo, A. P. Pessier, Collins, J.P. 2006.** Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, 3165–3170.
- Lips, K.R. 1998.** Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology*. 12, 106–117.
- Lips, K.R. 1999.** Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in western Panama. *Conservation Biology*. 13, 117–125.
- Lips, K.R., Mendelson III, J.R., Muñoz-Alonso, A., Canseco-Márquez, L., Mulcahy, D.G. 2004.** Amphibian population declines in montane southern Mexico: resurveys of historical localities. *Biological Conservation*. 119, 555–564.

- Lips, K.R., Reeve, J., Witters, L. 2003.** Ecological factors predicting amphibian population declines in Central America. *Conservation Biology*. 17-1078–1088.
- Lipscomb, K., Schmitt, C., Sablyak, A., Yoder, J.A., Nascone-Yoder, N. 2006.** Role for 611 retinoid signaling in left612 right asymmetric digestive organ morphogenesis. *Developmental Dynamics*. 235(8), 2266–2275.
- Liu, P. Y., Meng, T., Li, Y. Y., Cai, M., Li, X. H., Chen, J., Qin, Z. F. 2017.** Tetrabromoethylcyclohexane affects gonadal differentiation and development in the frog *Pelophylax nigromaculatus*. *Aquatic Toxicology*. 192, 40–47.
- López-Pacheco, I.Y., Silva-Núñez, A., Salinas-Salazar, C., Arévalo-Gallegos, A., Lizarazo-Holguin, L.A., Barceló, D., Iqbal, H.M.N, Parra-Saldívar, R. 2019.** Atropogenic contaminants of high concern: Existence in water resources and their adverse effects. *Science of the Total environment*. 690, 1068–1088.
- Lorenzatti, E., Maitre, M., Lenardón, A., Lajmanovich, R., Peltzer, P., Anglada, M. 2004.** Pesticide residues in immature soybean in Argentina croplands. *Fresenius Environmental Bulletin*. 13, 675–678.
- Loumbourdis, N.S. 2007.** Liver histopathologic alterations in the anuran *Rana ridibunda* from a small river of Northern Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 53, 418–425.
- Loumbourdis, N.S., Vogiatzis, A.K. 2002.** Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 53(1), 52–58.
- Lupi, L., Miglioranza, K.S.B., Aparicio, V.C., Marino, D., Bedmar, F., Wunderlin, D.A. 2015.** Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Science of the Total Environment* 536, 687–694.
- Mackenzie, C.A., Berrill, M., Metcalfe, C., Pauli, B.D. 2003.** Gonadal differentiation in frogs exposed to estrogenic and antiestrogenic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 10, 2644–2475.

- Mann, R.M., Bidwell, J.R. 1999.** The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 36, 193–199.
- Mann, R.M., Hyne, R.V., Choung, C.B., Wilson, S.P. 2009.** Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*. 157 (11), 2903–2927.
- Marcato, A.C.C, Souza, C.P., Fontanetti, C.S. 2017.** Herbicide 2,4D: a review of toxicity on non-Target organism. *Water Air & Soil Pollution*. 228, 120.
- Marchesan, E., Zanella, R., Antonio de Avila, L., Rabaioli Camargo, E., Luiz de Oliveira Machado, S., Regina Mussoi Macedo, V. 2007.** Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. *Scientia Agricola*. 64, 131–137.
- Marco, A., Cash, D., Belden, L.K., Blaustein, A.R. 2001.** Sensitivity to urea fertilization in three amphibian species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 40, 406–9.
- Marino, D., Ronco, A. 2005.** Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 75, 820–826.
- Marjanovic, D., Laurin, M. 2014.** An updated paleontological timetree of lissamphibians, with comments on the anatomy of Jurassic crown-group salamanders (Urodela). *Historical Biology*. 26, 535–550.
- Martori, M., Aùn, L., Birri, A., Rozzi Giménez C. 2005.** Reproducción comparada de tres especies de anuros sintópicos de una localidad del sudeste de Córdoba. *Cuadernos de Herpetología*. 18, 43–59.
- Martínez Baños, V., Pacheco Florez, V., Ramírez-Pinilla, M. P. 2011.** Abundancia relativa y uso de microhábitat de la rana *Geobatrachus walkeri* (Anura: Strabomantidae) en dos hábitats en Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Revista de Biología Tropical*. 59(2), 907–920.
- McCoy, K.A., Amato, C.M., Guillete, L.J., St. Mary, C.M. 2017.** Giant toads (*Rhinella marina*) living in agricultural areas have altered spermatogénesis. *Science of the Total Environment*. 609, 1230–1237.

- McCoy, K.A., Bortnick, L.J., Campbell, C.M., Hamlin, H.J., Guillette Jr., L.J., St. Mary C.M. 2008.** Agriculture Alters Gonadal Form and Function in the toad *Bufo marinus*. *Environmental Health Perspectives*. 116, 1526–1532.
- McDaniel, T.V., Harris, M.L., Bishop, C.A., Struger, J. 2004.** Development and survivorship of northern leopard frogs (*Rana pipiens*) and green frogs (*Rana clamitans*) exposed to contaminants in the water and sediments of the St. Lawrence River near Cornwall, Ontario. *Water Quality Research Journal of Canada*. 39, 160–174.
- McDaniel, T.V., Martin, P.A., Struger, J., Sherry, J., Marvin, C.H., McMaster, M.E., Clarence, S., Tetreault, G., 2008.** Potential endocrine disruption of sexual development in free ranging male northern leopard frogs (*Rana pipiens*) and green frogs (*Rana clamitans*) from areas of intensive row crop agriculture. *Aquatic Toxicology*. 88, 230–242.
- McMahon, T.A., Halstead, N.T., Johnson, S., Raffel, T.R., Romansic, J.M., Crumrine, P.W., Boughton, R.K., Martin, L.B., Rohr, J.R. 2011.** The Fungicide Chlorothalonil Is Nonlinearly Associated with Corticosterone Levels, Immunity, and Mortality in Amphibians. *Environmental Health Perspectives*. 119 (8), 1098–1103.
- Medina, M.B., Minitz, M.S., Resnik, S.L. 2019.** Pesticides in randomly collected rice commercialised in Entre Rios, Argentina. *Food additives & Contaminants: Part B*. DOI: 10.1080/19393210.2019.1617791.
- Measey, G.J., Roedder, D., Green, S.L., Kobayashi, R., Lillo, F., Lobos, G., Rebelo, R., Thirion, J.M. 2012.** Ongoing invasions of the African clawed frog, *Xenopus laevis*: A global review. *Biological Invasions*. 14, 2255–2270.
- Measey, G.J., Vimercati, G., de Villiers, F.A., Mokhatla, M., Davies, S.J., Thorp, C.J., Rebelo, A D., Kumschick, S. 2016.** A global assessment of alien amphibian impacts in a formal framework. *Diversity and Distributions*. 22, 970–981.
- Meehan, W., Norris, L., Sears, H. 1974.** Toxicity of various formulations of 2,4-D to salmonids in southeast Alaska. *Journal Fisheries Research Board of Canada*. 31(4), 480–485.

- Menezes França, F., Brazil de Paiva, T.C., Marcantônio, A.S., Texeira, P.C., Maris Ferreira, C. 2015.** Acute toxicity and ecotoxicological risk assessment of rice pesticides to *Lithobates catesbeianus* tadpoles. Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. 50, 406–410.
- Mesak, C., Oliveira Mendes, B., Oliveira Ferreira, R., Malafaia, G. 2018.** Mutagenic assessment of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the 2,4D herbicide in a simulated realistic scenario. Environmental Science and Pollution Research. 25(15), 15235–15244.
- Metts, B.S., Hopkins, W.A., Nestor, J.P. 2005.** Interaction of an insecticide with larval density in pond-breeding salamanders (*Ambystoma*). Freshwater Biology. 50(4), 685–696.
- Metts, B.S., Kurt, A., Scott, D.E., Tuberville, T.D., Hopkins, W.A. 2012.** Interactive effects of maternal and environmental exposure to coal combustion wastes decrease survival of larval southern toads (*Bufo terrestris*). Environmental Pollution. 164, 211–218.
- Miaud, C., Dejean, T. Savard, K., Millery-Vigues, A., Valentini, A., Gaudin, N.C.G., Garner, T.W.J. 2016.** Invasive North American bullfrogs transmit lethal fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* infections to native amphibian host species. Biological Invasions. 18(8), 2299–2308.
- Mimeault, C., Woodhouse, A., Miao, X.S., Metcalfe, C., Moon, T., Trudeau, V. 2005.** The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*. Aquatic Toxicology. 73, 44–54.
- Mnif, W., Aziza, I.H.H., Aicha, B., Aghleb, B., Olivier, T., Benoit, R. 2011.** Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. International Journal of Environmental Research and Public Health. 8, 2265–2303.
- Montero, R., Autino, A. 2018.** Sistemática y Filogenia de Vertebrados con énsafis en la fauna argentina. Tercera Edición. Editorial independiente, San Miguel de Tucumán, Argentina. 627 pp.
- Moreno P. 2017.** Consejo Federal Agropecuario, reunión comisión regional NEA 2017. Cadena: Arroz. Ministerio de Agroindustria, Argentina.

https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/cfa/comisiones/192017/regionales/_nea/2da//000000_Cadena%20de%20Valor%20del%20Arroz.pdf.

- Morgan, M.K., Scheuerman, P.R., Bishop, C.S., Pyles, R.A. 1996.** Teratogenic potential 639 of antrazine and 2,4-D using FETAX. *Journal of Toxicology and Environmental Health.* 48(2), 151–168.
- Moyle, P.B. 1973.** Effects of introduced bullfrogs, *Rana catesbeiana*, on the native frogs of the San Joaquin Valley, California. *Copeia.* 1973, 18–22.
- Murphy, M.B., Hecker, M., Coady, K.K., Tompsett, A.R., Jones, P.D., Du Preez, L.H. 2006.** Atrazine concentrations, gonadal gross morphology and histology in ranid frogs collected in Michigan agricultural areas. *Aquatic Toxicology.* 76, 230–245.
- Nebot, C., Falcon, R., Boyd, K.G., Gibb, S.W. 2015.** Introduction of human pharmaceuticals from wastewater treatment plants into the aquatic environment: a rural perspective. *Environmental Science and Pollution Research.* 22 (4), 10559–10568.
- Nikoloff, N., Natale, G.S., Marino, D., Solonesky, S., Larramendy, M. 2014.** Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 100, 275–81.
- Ogielska, M., Bartmanska, J. 1999.** Development of testes and differentiation of germ cells in water frogs of the *Rana esculenta* – complex (Amphibia, Anura). *Amphibia-Reptilia.* 20, 251–263.
- Ogielska, M., Kotusz, A. 2004.** Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anuran amphibians. *Journal of Morphology.* 259, 41–54.
- Oka, T., Tooi, O., Mitsui, N., Miyahara, M., Ohnishi, Y., Takase, M., Kashiwagi, A., Shinkai, T., Santo, N., Iguchi, T. 2008.** Effect of atrazine on metamorphosis and sexual differentiation in *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology.* 87, 215–226.
- Olmstead, A.W., Kosian, P.A., Korte, J.J., Holcombe, G.W., Woodis, K.K., Degitz, S.J. 2009.** Sex reversal of the amphibian *Xenopus tropicalis*,

following larval exposure to an aromatase inhibitor. *Aquatic toxicology*. 91, 143–150.

Oliveira, C. Sant´Anna, A.C., Omena, P.M., Santos, L.R.S., Zieri, R. 2003a. Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran Amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri*, and *Scinax fuscovarius*. *Biociencias*. 11, 39–46.

Oliveira, C. Zieri, R. 2005. Testicular pigmentación in *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) with anatomical observations on the extracutaneous pigmentary system. *Revista Brasileira de Zoología*. 22, 454–460.

Oliveira, C., Vicentini, C.A., Taboga, S.R., 2003b. Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura Hylidae). *Caryologia*. 56 (1), 75–83.

Oliveira, C., Zanetoni, C., Zieri, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia: Anura). *Revista Chilena de Anatomía*. 20, 263–268.

Ordaz,-Guillén, Y., Galíndez-Mayer, C.J., Ruiz-Ordaz, N., Juárez-Ramírez, C., Santoyo-Tepole, F., Ramos-Monroy, O. 2014. Evaluating the degradation of the herbicides picloram and 2,4-D in a compartmentalized reactive biobarrier with internal liquid recirculation. *Environmental Science and Pollution*. 21: 8765–8773.

Orton, F., Rosivatz, E., Scholze, M., Kortenkamp, A. 2011. Widely used pesticides with previously unknown endocrine activity revealed as *in vitro* anti-androgens. *Environmental Health Perspectives*. 119, 794–800.

Orton, F., Säfholm, M., Jansson, E., Carlsson, Y., Eriksson, A., Fick, J., UrenWebster, T., McMillan, T., Leishman, M. Verbruggen, B., Economidou, T., Tyler, C.R., Berg, C. 2018. Exposure to an anti-androgenic herbicide negatively impacts reproductive physiology and fertility in *Xenopus tropicalis*. *Scientific Reports*. 8, 9124.

- Ortonne, J.P. 2002.** Photoprotective properties of skin melanin. *British Journal of Dermatology*. 146, 7–10.
- Ouellet, M. 2000.** Amphibian deformities: current state of knowledge. En: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A. (Eds.). *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. Pensacola, FL: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). 617–646 p.
- Ouellet, M., J. Bonin, J. Rodrigue, J. Desgranges, Lair, S. 1997.** Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *Journal of Wildlife Diseases*. 33, 95–104.
- Oztas, H., Ozdemir, C., Kalipci, E. 2011.** Investigation of Ecotoxicological Effects of 2,4-D Acid Herbicide on the Ecosystem. *World Applied Sciences Journal*. 14, 126–135.
- Palma, G., Sánchez, A., Olave, Y., Encina, F., Palma, R., Barra, R. 2004.** Pesticides levels in surface waters in an agricultural-forestry basin in Southern Chile. *Chemosphere* 57, 763–770.
- Palmeira, C.M., Moreno, A.J. Madeira, V.M.C. 1994.** Interactions of herbicides 2, 4-D and dinoseb with liver mitochondrial bioenergetics. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 127, 50–57.
- Palmeira, C., Moreno, A., Madeira, V.M.C. 1995.** Thiols metabolism is altered by the herbicides paraquat, dinoseb and 2, 4-D: a study in isolated hepatocytes. *Toxicology Letters*. 81, 115–123.
- Papoulias, D.M., Schwarz, M.A., Mena, L. 2013.** Gonadal abnormalities in frogs (*Lithobates spp.*) collected from managed wetlands in an agricultural región of Nebraska, USA. *Environmental Pollution*. 172, 1–8.
- Parsons, K.C., Mineau, P., Renfrew, R.B. 2016.** Effects of Pesticide Use in Rice Fields on Birds. *The International Journal of Waterbird Biology*. 33, 193–218.
- Passantino, L., Santamaria, N., Zupa, R., Pousis, C., Garofalo, R., Cianciotta, A., Jirillo E., Acone F., Corriero A. 2013.** Liver

melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being. *Journal of Fish Diseases*. 37(3), 241–250.

Paunescu, A., Ponepal, C.M., Drghici, O., Marinescu, A.G. 2010. Liver histopathologic alterations in the frog *Rana (Pelophylax) ridibunda* induce by the action of Reldan 40EC insecticide. *Analele Universitatii din Oradea Fascicula Biologie*. 17(1), 166–169.

Paunescu, A., Ponepal, C.M., Grigorean, V.T., Popescu, M. 2012. Histopathological changes in the liver and kidney tissues of Marsh Frog (*Pelophylax ridibundus*) induced by the action of Talstar 10EC insecticide. *Analele Universitatii din Oradea Fascicula Biologie*. 19(1), 5–10.

Peltzer, P.M. 2006. La fragmentación de hábitat y su influencia en la diversidad y distribución de anfibios anuros de áreas ecotonales de los dominios fitogeográficos amazónico y chaqueño. Trabajo de tesis para obtener el título de doctora en Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo.

Peltzer, P.M., Attademo, M.S., Lajmanovich, R.C., Junges, C.M., Beltzer, A.H., Sánchez, L.C. 2010. Trophic dynamics of three sympatric anuran species in a soybean agroecosystem from Santa Fe Province, Argentina. *Herpetological Journal*. 20, 261–269.

Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C. 2007. Amphibians. En: Iriondo, M.H., Paggi, J.C., Parma, M.J. (Eds.). *The Middle Paraná River: Limnology of a Subtropical Wetland*. Springer Berlin Heidelberg, New York, USA. 327–340 p.

Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Beltzer, A.H. 2006. Diversity of anurans across agricultural ponds in Argentina. *Biodiversity and Conservation*. 15, 3499–3513.

Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Cabagna, Z., Repetti, M.C., Sigrist, R., Beldoménico, H.M. 2013. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined tree frog (*Trachycephalus*

typhonius) tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 98, 142–151.

Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, M.A., Junges, C.M., Teglia, C.M., Martinuzzi, C., Curi, L.M., Culzoni, M.J., Goicoechea, H.C. 2017. Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. <https://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.01.021>.

Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Martinuzzi, C., Attademo, M.A., Curi, L.M., Sandoval, M.T. 2019. Biototoxicity of diclofenac on two larval amphibians: assessment of development, growth, cardiac function and rhythm, behavior and antioxidant system. *Science of the Total Environment*. 683, 624–637.

Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Sánchez, L.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Bionda, C.L., Martino, A.L., Bassó, A. 2011. Morphological abnormalities in Amphibian populations from the mid-eastern region of Argentina. *Herpetological Conservation and Biology*. 6(3), 432–444.

Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Sanchez-Hernandez, J.C., Cabagna, M., Attademo, A.M., Bassó, A. 2008. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 70(1), 185–197.

Pereira de Paiva, P., Cruz Delcorso, M., Matheus, V.A., do Nascimento de Queiroz, S.C., Collares-Buzato, C.B., Arana, S. 2017. Acute toxicity of commercial atrazine in *Piaractus mesopotamicus*: Histopathological, ultrastructural, molecular, and genotoxic evaluation. *Veterinary World*. 10, 1008–1019.

Pérez-Coll, C.S., Herkovits, J. 2006. Synergistic Effects of Copper and Butylic Ester of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (Esternon Ultra) on Amphibian Embryos. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 3, 343–347.

- Pérez Iglesias, J.M., Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., De Oliveira, C., Natale, G.S. 2016.** Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in Neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research*. 23(10), 9852–9861.
- Pérez Iglesias, J.M., Franco-Belussi, L., Natale, G.S., de Oliveira, C. 2019.** Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environmental Pollution*. 244, 733–746.
- Pérez Iglesias, J.M., Soloneski, S., Nikoloff, N., Natale, G.S., Larramendy, M.L. 2015.** Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* larvae (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 119, 15–24.
- Pérez-Iglesias, J.M., Ruiz de Arcaute, C., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G.S., Larramendy, M.L. 2014.** The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 104, 120–126.
- Petrini, S.; Zaccanti, F. 1998.** The effects of aromatase and 5- α -reductase inhibitors, antiandrogen, and sex steroids on bidder's organs development and gonadal differentiation in *Bufo bufo* tadpoles. *Journal of Experimental Zoology*. 28, 245–259.
- Petterson, I., Arukwe, A., Lundsted-Enkel, K., Mortensen, A.S., Berg, C. 2006.** Persistent sex-reversal and ovical agenesis in adult *Xenopus* (Silurana) *tropicalis* frogs larval exposure. *Aquatic Toxicology*. 79, 356–365.
- Petterson, I., Berg, C. 2007.** Environmentally relevant concentrations of ethynylestradiol cause female-biased sex ratios in *Xenopus tropicalis* and

Rana temporaria. Environmental Toxicology and Chemistry. 26, 1005–1009.

- Piatti, L., Souza, F.L., Landgref Filho, P. 2010.** Anuran assemblage in a rice field agroecosystem in the Pantanal of central Brazil. Journal of Natural History. 44, 1215–1224.
- Piha, H. 2006.** Impacts of Agriculture on Amphibians at Multiple Scales. Academic dissertation. Faculty of Biosciences, Department of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki, Finland.
- Pinto-Eraza, M.A., Goldberg, J., Jerez, A. 2016.** Gonadal development in the neotropical high Andean frog *Dendropsophus labialis* (Amphibia: Hylidae). Cuadernos de Herpetología. 30 (2), 57–68.
- Piprek, R.P., Kloc, M., Kubiak, J.Z. 2014.** Bidder's organ—structure, development and function. The International Journal of Developmental Biology. 58, 819–827.
- Polo-Cavia, N., Burraco, P., Gomez-Mestre, I., 2016.** Low levels of chemical anthropogenic pollution may threaten amphibians by impairing predator recognition. Aquatic Toxicology. 172, 30–35.
- Pough, F.H., Andrews, R.M., Cadle, J.E., Crump, M.L. Savitzky, A.H. y K.D. Wells. 2004.** Herpetology. Third Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. 726p.
- Pounds, J. A., Crump, M.L. 1994.** Amphibian declines and climate disturbance: The case of the golden toad and the harlequin frog. Conservation Biology. 8, 72–85.
- Pounds, J.A., Fogden, M.P.L., Savage, J.M., Gorman, G.C. 1997.** Tests of null models for amphibian declines on a tropical mountain. Conservation Biology. 11,1307–1322.
- Provete, D.C., Garey, M.V., Silva, F.R., Rossa-Feres, D.C. 2011.** Anuran fauna from Northwestern región of the state of Sao Paulo: species list and taxonomic key for adults. Biota Neotrópica. 11, 377-379.

- Punzo, F. 2005.** Effects of insecticide (Carbaryl) exposure on activity and swimming performance of tadpoles of the Rio Grande leopard frog, *Rana berlandieri* (Anura: Ranidae). *Texas Journal of Sciences*. 57(3), 263–272.
- Pyron, A.R. 2018.** Global amphibian declines have winners and losers. *PNAS*. 115, 3739–3741.
- Quayle, W.C., Oliver, D.P., Zrna, S. 2006.** Field dissipation and environmental hazard assessment to clomazone, molinate and thiobencarb in Australian rice culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 7213–7220.
- Qurratu, A., Reehan, A. 2016.** A review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Derivates: 2,4-D Dilethylamine Salt and 2,4-D Butyl Ester. *International Journal of Applied Engineering Research*. 11, 9946–9955.
- Rastogi, R.K. 1976.** Seasonal Cycle in Anuran (Amphibia) Testis: The Endocrine and Environmental Controls. *Italian Journal of Zoology*. 43,151–172.
- Rawlings, N. C., Cook, S. J., Waldbillig, D. 1998.** Effects of the pesticides carbofuran, chlorpyrifos, dimethoate, lindane, triallate, trifluralin, 2,4-D, and pentachlorophenol on the metabolic endocrine and reproductive endocrinesystem in ewes. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 54, 21–36.
- Relyea, R.A. 2005a.** The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 48, 351–357.
- Relyea, R.A. 2005b.** The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*. 15, 1118–1124.
- Relyea, R.A., Hoverman, J.T. 2006.** Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters*. 9 (10), 1157–1171.
- Relyea, R.A., Mills, N. 2001.** Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98, 2491–2496.

- Ribeiro, J., Colli, G.R., Caldwell, J.P., Ferreira, E., Batista, R., Soares, A. 2017.** Evidence of neotropical anuran community disruption on rice crops: a multidimensional evaluation. *Biodiversity Conservation*. 26, 3363–3383.
- Rico, A., Oliveira, R., McDonough, S., Matser, A., Khatikarn, J., Satapornvanit, K., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., Domingues, I., Van den Brink, P.J. 2014.** Use, fate and ecological risks of antibiotics applied in tilapia cage farming in Thailand. *Environmental Pollution*. 191, 8–16.
- Rodriguez, E.M., Schuldt, M., Romano, L. 1994.** Chronic Histopathological effects of parathion and 2,4-D on female gonads of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Food and Chemical Toxicology*. 32, 811–818.
- Rodriguez, E. M., Amin, O. A. 1991.** Acute toxicity of parathion and 2,4-D to larval and juvenile stage of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47, 634–640.
- Rohr, J.R., McCoy, K.A. 2010.** A Qualitative Meta-Analysis Reveals Consistent Effects of Atrazine on Freshwater Fish and Amphibians. *Environmental Health Perspectives*. 118, 20–32.
- Ronco, A.E., Marino, D.J.G., Abelando, M., Almada, P., Apartin, C.D. 2016.** Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environmental Monitoring and Assessment*. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5467-0>.
- Rowe, C.L., Kinney, O.M., Fiori, A.P., Congdon, J.D. 1996.** Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. *Freshwater Biology*. 36, 723–730.
- Ruiz de Arcaute, C., Soloneski, S., Larramendy, M.L. 2016.** Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based

herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 128, 222–229.

Rujana, M. R., Andisco, C. B., Vazquez, F. A. 2015. Indicadores de calidad de aguas vinculados con la actividad arrocerá en cuencas hídricas de la provincia de Corrientes. <http://www.icaa.gov.ar>.

Ryan, T.J., Scott, C.M., Douthitt, B.A. 2007. Sub-lethal Effects of 2,4-D Exposure on Golf Course Amphibians. USGA Turfgrass and Environmental Research Online. 5, 1–14.

Säfholm, M., Jansson, E., Fick, J., Berg, C. 2015. Mixture effects of levonorgestrel and ethinylestradiol: Estrogenic biomarkers and hormone receptor mRNA expression during sexual programming. Aquatic Toxicology. 161, 146–153.

Sánchez, L.C. 2011. Alteraciones de la dinámica y biología reproductiva de anuros (Amphibia, Anura) producidos por el avance de la frontera agrícola en ambientes naturales del Delta Superior del Rio Paraná. Tesis doctoral para optar el título de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Sánchez, L.C., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Manzano, A.S., Junges, C.M., Attademo, A.M. 2014. First evidence of the effects of agricultural activities on gonadal form and function of *Rhinella fernandezae* and *Dendropsophus sanborni* (Amphibia: Anura) from Entre Rios, Province, Argentina. Acta Herpetologica. 9, 75–88.

Sánchez, L.C., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C. 2009. Structure of wetlandbreeding anuran assemblages from the southern section of the Paraná river, Argentina. Herpetological Journal. 19, 173–184.

Sanderson, J.T., Seinen, W., Giesy, J.P., van den Berg, M. 2000. 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? Toxicological Sciences. 54, 121–127.

- Sandoval, M.T., Gómez, M.L. 2010.** Desarrollo y morfología del sistema urogenital de *Physalaemus santafecinus* Barrio 1965 (Anura: Leiuperidae). FACENA. 26, 24–41.
- Sans, F.X. 2007.** La diversidad de los agroecistemas. Ecosistemas. 16, 44-49.
- Sarikaya, M., Yilmaz, M. 2003.** Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). Chemosphere. 52, 195–201.
- Sayed, A.H., Younes, H.A.M. 2017.** Melanomacrophage centers in *Clarias gariepinus* as an immunological biomarker for toxicity of silver nanoparticles. Journal of Microscopy and Ultrastructure. 5, 97–104.
- Scaia, M.F., De Gregorio, L.S., Franco-Beluussi, L., Succi-Domingues, M., De Oliveira, C. 2019.** Gonadal, body color, and genotoxic alterations in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to nonyphenol. Environmental Science and Pollution Research. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05403-8>.
- Scaia, M.F., Regueira, E., Sassone, A.G., Volonteri, M.C. 2011.** The bidder's organ of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Presence of steroidogenic enzymes. Journal of Experimental Zoology. 31, 439–446.
- Scalia, M., Geremia, E., Corsaro, C., Santoro, C., Baratta, D., Sichel, G. 1990.** Lipid peroxidation in pigmented and unpigmented liver tissue: protective role of melanin. Pigment Cell Research. 3(2), 115–119.
- Schaefer, E.F. 2006.** Restricciones cuantitativas asociadas con los modos reproductivos de los anfibios en áreas de impacto por la actividad arrocera en la Provincia de Corrientes. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de la Plata. xiv + 233 p.
- Schaefer, E. F., Kehr, A. I. 2006.** *Bufo bergi* (Anura: Bufonidae): Reproduction. Natural History Notes. 37 (3), 334.

- Semlitsch, R., Bridges C.M., Welch, A.M. 2000.** Genetic variation and a fitness tradeoff in the tolerance of gray treefrog (*Hyla versicolor*) tadpoles to the insecticide Carbaryl. *Oecologia*. 125, 179–185.
- Sharma, K., Rajesh, D., Kataria, S.K. 2018.** The impact analysis of toxicological studies of 2,4-D exposure in humans and other non-target organism. *International Journal of research and Analytical Reviews*. 5, 1524–1536.
- SIIA. 2019.** Sistema Integrado de Información Agropecuaria, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina. <https://www.siiia.gov.ar/>.
- Sievers, M., Hale, R., Parris, K.M., Melvin, S.D., Lanctot, C.M., Swearer, S.R. 2019.** Contaminant-induced behavioural changes in amphibians: A meta-analysis. *Science of the Total Environment*. 693, 133570.
- Skelly, D.K., Bolden, S.R., Dion, K.B. 2010.** Intersex Frogs Concentrated in Suburban and Urban Landscapes. *EcoHealth*. 7, 374–379.
- Skelly, S.K., Kiesecker, J.M. 2001.** Venue and outcome in ecological experiments: manipulations of larval amphibians. *Oikos*. 94, 198–208.
- Skerratt, L.F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., Mc donalds, K.R., Phillott, A.D., Hines, H.B., Kenyon, N. 2007.** Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth*. 4, 125–34.
- Smith, E.E., Du Preez, L.H., Gentles, A., Solomon, K.R., Tandler, B., Carr, J.A., Van der Kraak, G.L., Kendall, R.J., Giesy, J.P., Gross, T.S. 2005.** Assessment of laryngeal muscle and testicular cell types in *Xenopus laevis* (Anura Pipidae) inhabiting maize and non-maize areas of South Africa. *African Journal of Herpetology*. 54, 69–76.
- Snow, N.P., Witmer, G.W. 2011.** A field evaluation of a trap for invasive american bullfrogs. *Pacific Conservation Biology*. 17(3), 285–291.

- Solonesky, S., González, N.V., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L. 2007.** Herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-induced cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro presence of erythrocytes. *Cell Biology International*. 31, 1316–1322.
- Soso, A.B., Barcellos, L.J.G., Ranzani-Paiva, M.J., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Anziliero, D., Lima, M., da Silva, L.B., Ritter, F., Bedin, A.C., Finco, J.A. 2007.** Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundia (*Rhamdia quelen*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 23, 308–313.
- Sower, S.A., K.L. Reed, K.L., Babbitt, K.J. 2000.** Limb malformations and abnormal sex hormone concentrations in frogs. *Environmental Health Perspectives*. 108, 1085–10.
- Sparling, D.W., Fellers, G.M. 2009.** Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28, 1696–170.
- Sparling, D.W., Fellers, G.M., McConnell, L.L. 2001.** Pesticides and amphibian population declines in California USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20, 1591–1595.
- Spolyarich, N., Hyne, R., Wilson, S., Palmer, C., Byrne, M. 2010.** Growth, development and sex ratios of Spotted Mars Frog (*Limnodynastes tasmaniensis*) larvae exposed to atrazine and an herbicide mixture. *Chemosphere*. 78, 807–813.
- Stebbins, R.C., Cohen, N.W. 1995.** A natural history of amphibians. Princeton University Press, Princeton. 316p.
- Stebbins-Boaz, B., Fortner, K., Frazier, J., Piluso, S., Pullen, S., Rasar, M., Reid, W., Sinclair, K., Winger, E. 2004.** Oocyte Maturation in *Xenopus laevis* is blocked by the hormonal herbicide, 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid. *Molecular Reproduction and Development*. 67(2), 233–242.

- Steinel, N.C., Bolnick, D.I. 2017.** Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in Immunology*. 8, 827.
- Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M., Feist, S.W. 2003.** Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research*. 55(2), 137–159.
- Storrs, S.I., Semlitsch, R.D. 2008.** Variation in somatic and ovarian development: Predicting susceptibility of amphibians to estrogenic contaminants. *General and Comparative Endocrinology*. 156(3), 524–530.
- Storrs-Méndez, S.I., Semlitsch, R.D. 2010.** Intersex gonads in frogs: understanding the time course of natural development and role of endocrine disruptors. *Journal of Experimental Zoology. (Mol. Dev. Evol.)* 314B, 57–66.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W. 2004.** Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*. 306(5702), 1783–1786.
- Svartz, G. V. 2014.** Evaluación de la toxicidad del endosulfan, la cipermetrina, y un fungicida de uso comercial, solos y en mezclas sobre el desarrollo temprano de *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae). Tesis doctoral para optar el título de doctor de la Universidad de Buenos Aires en el Área de Ciencias Biológicas.
- Tamschick, S., Rozenblut-kościsty, B., Ogielska, M., Lehmann, A., Lymberakis, P., Hoffmann, F., Lutz, I., Kloas, W., Stock, M. 2016.** Sex reversal assessments reveal different vulnerability to endocrine disruption between deeply diverged anuran lineages. *Scientific Reports*. 6, 23825.
- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fourier, M., Cyr, D., Marcogliese, D. 2002a.** Response of the amphibian tadpole (*Xenopus*

laevis) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21, 527–531.

Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fourier, M., Cyr, D., Marcogliese, D. 2002b. Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the ovary. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21, 1264–1267.

Tayeb, W., Nakbi, A., Trabelsi, M., Attia, N., Miled, A., Hammami, M., 2010. Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid based herbicide “Désormone lourde”. *Journal of Hazardous Materials*. 180, 225–233.

Taylor, B., D. Skelly, L.K. Demarchis, M.D. Slade, D. Galusha, Rabinowitz, P.M. 2005. Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformation. *Environmental Health Perspectives*. 113, 1497–1501.

Teplitsky, C., Piha, H., Laurila, A., Merila, J. 2005. Common pesticide increases costs of antipredator defenses in *Rana temporaria* tadpoles. *Environmental Science & Technology*. 39(16), 6079–6085.

Terrado, M., Küster, M., Raldua, D., Lopez de Alda, M., Barcelo, D., Tauler, R. 2007. Use of chemometric and geostatistical methods to evaluate pesticide pollution in the irrigation and drainage channels of the Ebro river delta during the rice-growing season. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387, 1479-1488.

The International Union for the Conservation of the Nature (IUCN). 2018. Red List of Threatened Species. Version 2018-1. <https://www.iucnredlist.org>.

The International Union for the Conservation of the Nature (IUCN). 2019. Numbers of threatened species by major groups of organisms (1996–2019). Table 1b. <https://www.iucnredlist.org/about/summary-statistics>.

- Tilman, D. 1999.** Global environmental impacts of agricultural expansion: the need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 11, 5995–6000.
- Toledo, L.F., Zima, J-, Haddad, C.F.B. 2003.** Distribuição espacial e temporal de uma comunidade de Anfíbios Anuros do município de rio Claro, São Paulo, Brasil. *Holos Environmental*. 3, 136–149.
- Tompsett, A.R., Wiseman, S., Higley, E., Pryce, S., Chang, H., Giesy, J.P., Hecker, M. 2012.** Effects of 17 α -ethynylestradiol on sexual differentiation and development of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 156, 202–210.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2005.** Reregistration Eligibility Decision for 2,4-D. EPA 738-R-05-002. [Http://nepis.epa.gov/exe/zypdf.cgi/2000e8dy.pdf?dockkey¼2000e8dy](http://nepis.epa.gov/exe/zypdf.cgi/2000e8dy.pdf?dockkey¼2000e8dy)
- Urban, M.C. 2015.** Accelerating extinction risk from climate change. *Science*. 348(6234), 571–573.
- Uribe-Aranzábal, M.C. 2011.** Hormones and the Female Reproductive System of Amphibians. En: Norris, D.O., Lopez, K.H. (Eds.). *Hormones and reproduction of Vertebrates. Volume 2: Amphibians*. Academic Press. 55–78 p.
- Vaira, M., Akmentis, M., Attademo, M., Baldo, D., Barraso, D., Barrionuevo, S., Bassó, N., Blotto, B., Cairo, S., Cajade, R., Céspedes, J., Corbalan, V., Chilote, P., Duré, M., Falcione, C., Ferraro, D., Gutierrez, F.R., Ingaramo, M.R., Junges, C., Lajmanovich, R.C., Lescano, J.N., Marangoni, F., Martinazzo, L., Marti, R., Moreno, L., Natale, G.S., Pérez Iglesias, J.M., Peltzer, P.M., Quiroga, L., Rosset, S., Sanabria, E., Sánchez, L., Schaefer, E., Úbeda, C., Zaracho, V.H. 2012.** Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. 26(Sup. 1), 131–159.

- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P. 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13(2), 57–149.
- Van Rooij, P., Martel, A., Haesebrouck, F., Pasmans, F. 2015.** Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. *Veterinary Research*. 46(1), 137.
- Velásquez, T.M.T., Montes Rojas, C.M., Bernal Bautista, M.H. 2013.** Efectos letales y subletales del Glifosato (Roundup® activo) en embriones de anuros colombianos. *Acta Biologica Colombiana*. 18, 271–278.
- Venkov, P., Topashka-Ancheva, M., Georgieva, M., Alexeiva, V., Karanov, E. 2000.** Genotoxic effects of substituted phenoxyacetic acid. *Archives of Toxicology*. 74, 560–566.
- Vershinin, V.L. 1995.** Complex of amphibia species in ecosystems of a big industrial city. *Russian Journal of Ecology*. 26(4), 273–280.
- Vié, J.C., Hilton-Taylor, C., Stuart, S.N. 2009.** *Wildlife in a Changing World- An Analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species*. Gland, Switzerland: IUCN. 180 p.
- Villaamil Lepori, C., Bovi Mitre, G., Nassetta, M. 2013.** Situación actual de la contaminación por plaguicidas en Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29, 25–43.
- Vizgarra, C.G. 2018.** Aplicación de agroquímicos en las localidades de Las Palmas y La Leonesa, Provincia del Chaco. Efectos en la salud de la población. (Trabajo final integrador). Bernal, Argentina. Universidad Nacional de Quilmes. [Http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/849](http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/849).
- Wafa, T., Nakbi, A., Cheraief, I., Miled, A., Hammami, M. 2013.** Alteration of lipid status and lipid metabolism, induction of oxidative stress and lipid peroxidation by 2, 4-dichlorophenoxyacetic herbicide in rat liver. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 23(6), 449–458.

- Waite, D.T., Cessna, A.J., Grover, R., Kerr, L.A., Snihura, A.D. 2002.** Environmental concentrations of agricultural herbicides: 2,4-dd and triallate. *Journal of Environmental Quality*. 31(1), 129–144.
- Wake, D.B. 1991.** Declining amphibian populations. *Science*. 253, 860.
- Wake, D.B., Vredenburg, V.T. 2008.** Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academic of Sciences*. 105, 11466–11473.
- Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby, A.G., Augustijn-Beckers, P.W., Burt, 772 J.P. 1992.** The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 123, 1–55.
- Weir, S.M., Yu, S., Salice, C.J. 2012.** Acute toxicity of herbicide formulations and chronic toxicity of technical-grade Trifluralin to larval Green Frogs (*Lithobates clamitans*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31, 1–6.
- Wells, K.D. 1977.** The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour*. 25, 666–693.
- Widder, P.D., Bidwell, J. 2008.** Tadpole size, cholinesterase activity, and swim speed in four frog species after exposure to sub-lethal concentrations of chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology*. 88(1), 9–18.
- Wolf, J.C., Lutz, I., Kloas, W., Springer, T.A., Holden, L.R., Krueger, H.O., Hosmer, A.J., 2010.** Effects of 17 beta-estradiol exposure on *Xenopus laevis* gonadal histopathology. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29, 1091e1105.
- World Health Organization (WHO), International Programme on Chemical Safety & WHO Task Group on Environmental Health Criteria for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D: Environmental Aspects). 1989.** 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid 2,4-D: environmental aspects / published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization. Geneva: World Health Organization. [Http://www.who.int/iris/handle/10665/40019](http://www.who.int/iris/handle/10665/40019).

- World Health Organization (WHO). 2009.** The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard 1. World Health Organization, Geneva, Italy. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/44271?locale=es>.
- Woudneh, M.B., Sekela, M., Tuominen, T., Gledhill, M. 2007.** Acidic herbicides in surface waters of Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. *Journal of Chromatography A*. 1139(1), 121–129.
- Xie, L., Thrippleton, K., Irwin, M.A., Siemering, G.S., Mekebri, A., Crane, D., Berry, 798 K., Schlenk, D. 2005.** Evaluation of Estrogenic Activities of Aquatic Herbicides and Surfactants Using a Rainbow Trout Vitellogenin Assay. *Toxicological Sciences*. 87(2), 391–398.
- Young, B.E., Lips, K.R., Reaser, J.K., Ibanez, R., Salas, A.W., Cedeno, J.R., Coloma, L.A., Ron, S., La Marca, E., Meyer, J.R., Munoz, A., Bolanos, F., Chaves, G., Romo, D. 2001.** Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology*. 15, 1213–1223.
- Zar, J.H. 1999.** *Biostatistical Analysis*. 4th Edition, Prentice Hall, Upper Saddle River. 663 p.
- Zaracho, V.H., Céspedes, J.A., Álvarez, B.B., Lavilla, E.O. 2011.** *Anfibios de Corrientes. Guía de campo para la identificación de los Anfibios de la provincia de Corrientes (Argentina)*. Fundación Miguel Lillo, Ministerio de Educación de la Nación. 181 p.
- Zaya, R.M., Amini, Z., Whitaker, A.S., Kohler, S.L., Ide, C.F. 2011.** Atrazine exposure affects growth, body condition and liver health in *Xenopus laevis* tadpoles. *Aquatic Toxicology*. 104(3-4), 243–253.
- Zhang, H., Luo, Y., Wu, L., Huang, Y., Christie, P. 2015.** Residues and potential ecological risks of veterinary antibiotics in manures and composts associated with protected vegetable farming. *Environmental Science and Pollution Research*. 22, 5908–5918.
- Zhang, X., Li, Y., Liu, B., Wang, J., Feng, C., Gao, M., Wang, L. 2014.** Prevalence of veterinary antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the surface water of a livestock production region in northern China. *Plos One*. 9, e111026.

- Zhelev, Z.M., Popgeorgiev, G.S., Mehterov, N.H. 2015.** Changes in the hepatosomatic index and condition factor in the populations of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) from anthropogenically polluted biotopes in Southern Bulgaria. Part II. Bulgarian Journal of Agricultural Science. 21, 534–539.
- Zhelev, Z.M., Tsonev, S.V., Arnaudova, D.N. 2017.** Health status of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Ranidae) in Rice Paddy Ecosystem in Southern Bulgaria: Body Condition Factor and Fluctuating Asymmetry. Acta Zoologica Bulgarica. 8, 169–176.
- Zieri, R., Franco-Belussi, L., De Souza Santos, L.R., Taboga, S.R., De Oliveira, C. 2015.** Sex hormones change visceral pigmentation in *Eupemphix nattereri* (Anura): effects in testicular melanocytes and hepatic melanomacrophages. Animal Biology. 62, 21–32.
- Zieri, R., Taboga, S.R., Oliveira, C. 2007.** Melanocytes in the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae): histological, stereological and ultrastructural aspects. The Anatomical Record. 29, 795–800.
- Zimdahl, R.L. 1993.** Fundamentals of Weed Science, fourth ed, San Diego CA. Academic Press. 450 p.
- Zimmerman, B.L. 2001.** Transectas de bandas auditivas. En: Heyer, W.R., Donnelly, M.A., McDiarmid, R.W., Hayek, C., Foster, M.S. (Eds.) Medición y monitoreo de la diversidad biológica, Métodos estandarizados para Anfibios. Editorial Universitaria de la Patagonia. 87–93 p.

ANEXO

Tabla 1: Determinación de parámetros físico-químicos en muestras de agua de cultivo de arroz (CA 1) localizado en San Javier, y sitio de referencia (Ref 1) localizado en el departamento Garay, provincia de Santa Fe. Muestras tomadas en Febrero de 2016.

DETERMINACION	CA 1	Ref 1
pH	7,1	6,9
Turbiedad (U.N.T.)	35	15
Color (mg/l (Pt/Co))	>40	>40
Conductividad (µmhos/cm)	125,7	108
Residuos secos (mg/l)	86,9	74,3
Alcalinidad (mg/l)	42,6	35
Carbonatos (mg/l)	ND (0,05)	ND (0,05)
Bicarbonatos (mg/l)	52	42,7
Dureza total (mg/l)	46	30,6
Calcio (mg/l)	5,4	5,9
Magnesio (mg/l)	7,9	7,9
Hierro Total (mg/l)	0,13	0,06
Sulfato (mg/l)	17,4	13,2
Fluoruros	<0,2	<0,2
Cloruro	14,5	10,9
Nitratos	0,6	0,7
Nitritos	ND (0,002)	ND (0,002)
Amonio	0,92	0,70
Arsénico	<0,010	<0,010
Fósforo reactivo soluble	0,195	0,236

*ND: significa no detectado y el valor entre paréntesis corresponde a la concentración del límite de detección del método empleado. La determinación de arsénico se realizó por un método semicuantitativo.

*Realizado por Dra. María Alejandra Maine-Química Analítica-Facultad de Ingeniería Química-Universidad Nacional del Litoral.

Tabla 2: Determinación de plaguicidas en muestras de agua y suelo de muestras de agua de cultivo de arroz (CA 1) localizado en San Javier, y sitio

de referencia (Ref 1) localizado en el departamento Garay, provincia de Santa Fe. Muestras tomadas en Febrero de 2016.

Ref 1			
Muestra	Materia activa	Concentración hallada	L.C.(ug/kg)
Suelo ¹ (ug/kg)	^a Bentazon	1,1 ± 0,3	0,1
Agua ²	-	-	-
CA 1			
Muestra	Materia activa	Concentración hallada	L.C. (ug/l)
Suelo ¹ (ug/kg)	Bentazon	1,3 ± 0,4	0,01
	^b Clomazone	15 ± 5	0,01
	^c Imidacloprid	9 ± 3	0,01
	^d Tebuconazole	135 ± 20	0,01
	^e AMPA	25 ± 8	2,0
Agua ² (ug/l)	Bentazon	0,4 ± 0,1	0,0001
	^f Glifosato	0,9 ± 0,2	2,0
	AMPA	8 ± 2	2,0

*L.C.: límite de cuantificación

* Analista: Lic. M. R. Repetti

Procedimientos de ensayo:

¹Extracción con solvente, limpieza por extracción en fase sólida dispersiva (dSPE). Determinación de plaguicidas mediante Cromatografía de Gases con Detector de Captura de Electrones (GC-ECD) y Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masa en tándem (UHPLC-MS/MS).

Determinación de glifosato, AMPA y glufosinato de amonio mediante derivatización con FMOC-Cl, limpieza por extracción en fase sólida (SPE) y Cromatografía Líquida en tándem con Espectrometría de Masa Triplecuadrupolo (UHPLC-MS/MS).

²Extracción en fase sólida (SPE). Determinación de plaguicidas mediante Cromatografía de Gases con Detector de Captura de Electrones (GC-ECD) y Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masa en tándem (UHPLC-MS/MS).

Determinación de glifosato, AMPA y glufosinato de amonio mediante derivatización con FMOC-Cl, limpieza por extracción en fase sólida (SPE) y Cromatografía Líquida en tándem con Espectrometría de Masa Triplecuadrupolo (UHPLC-MS/MS).

^a**Bentazón**

Nombre químico: 3-Isopropil-1H-2,1,3-benzotiadiazin-4(3H)-ona 2,2-dioxido

Fórmula química: C₁₀H₁₂N₂O₃S

No. CAS: 25057-89-0

Tipo de plaguicida: Herbicida

Clasificación: Tiadiazina

Uso: Agrícola

Fuente: <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/bentazon.pdf>

^b**Clomazone**

Nombre químico: 2-(2-Clorobencil)-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-ona O 2-(2-clorobencil)-4,4-dimetilisoaxazolidin-3-ona

Fórmula química: C₁₂H₁₄ClNO₂

No. CAS: 81777-89-1

Tipo de plaguicida: Herbicida

Clasificación: Sal Orgánica

Uso: Agrícola

Fuente: <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/clomazone.pdf>

^c**Imidacloprid**

Nombre químico: (EZ)-1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilidenoamina

Fórmula química: C₉H₁₀ClN₅O₂

No. CAS: 138261-41-3

Tipo de plaguicida: Insecticida

Clasificación: Imida

Uso: Agrícola, urbano, industrial y pecuario

Fuente: <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/imidacloprid.pdf>

^dTebuconazole

Nombre químico: (RS)-1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)pentan-3-ol

Fórmula química: C₁₆H₂₂ClN₃O

No. CAS: 107534-96-3

Tipo de plaguicida: Fungicida

Clasificación: Benzimidazol

Uso: Agrícola

Fuente: <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/tebuconazole.pdf>

^eAMPA

El aminofosfonato ácido aminometilfosfónico es un ácido orgánico débil con un grupo fosfonato. Es uno de los principales productos de degradación del herbicida glifosato.

^fGlifosato

Nombre químico: N-(fosfonometil)glicina-isopropilamina (1:1) o isopropilaminio

N-(fosfonometil)glicinato

Fórmula química: C₆H₁₇N₂O₅P

No. CAS: 38641-94-0

Tipo de plaguicida: Herbicida

Clasificación: Fosfonometilglicina

Uso: Agrícola, urbano, industrial, jardinería

Fuente: <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/glifosato.pdf>

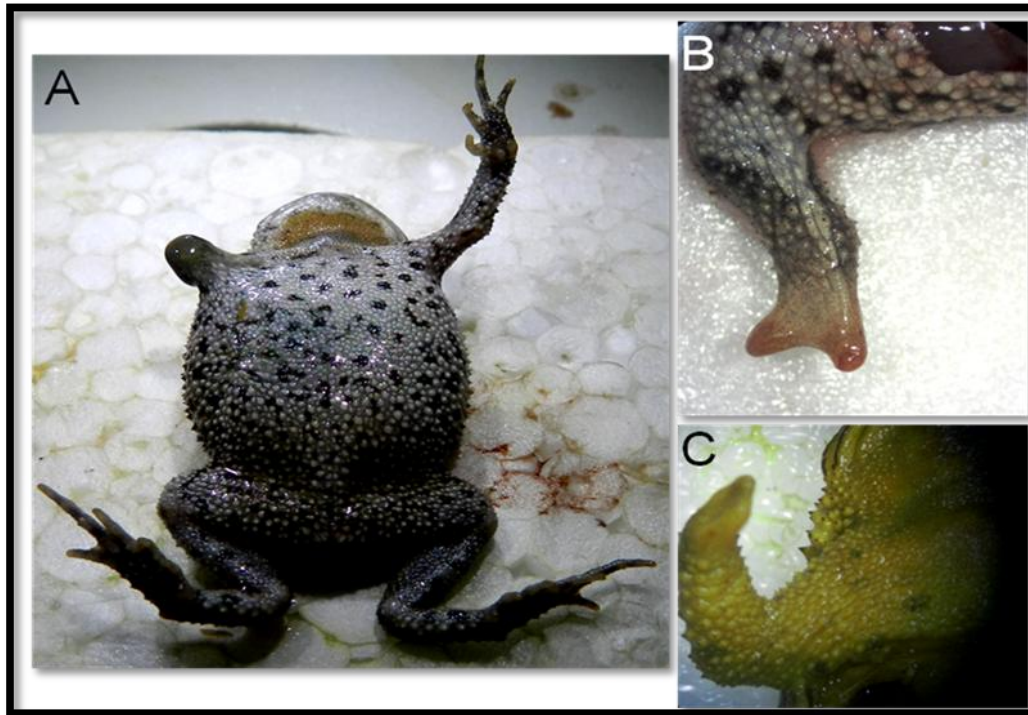


Figura A1. Anormalidades en individuos de *R. bergi* de sitio CA 2. Ectromelia (A); Sindactilia (B-C).

ABREVIACIONES UTILIZADAS

2,4-D Ácido 2,4-diclorofenociacético

A ancho

ANOVA Análisis de la varianza

ASIH American Society of Ichthyologists and Herpetologists/Sociedad Americana de Ictiólogos y Herpetólogos

CA 1 Cultivo de arroz en San Javier, Santa Fe

CA 2 Cultivo de Arroz en Las Palmas, Bermejo, Chaco

CAS Chemical Abstracts Service, es una división de Sociedad Americana de Química y se ocupa de asignar números de registro a cada compuesto químico que aparece publicado en la literatura científica

CE Contaminantes emergentes

CEQGs Canadian Environmental Quality Guidelines/Guías canadienses de calidad ambiental

CL50 Concentración letal 50

cm Centímetros

DEs Disruptores endócrinos

EI Espermatoцитos primarios

EII Espermatoцитos secundarios

EG Estadio de Gosner

Ep Espermátidas

Epg Espermatogonias

Epz Espermatozoides unidos a células de Sertoli

Epz libres Espermatozoides libres

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FBCB-UNL Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral

FCA Factor de Condición Animal

FETAX Frog embryo teratogenic assay *Xenopus*

g gramos

GI grados de libertad

h horas

H-E Hematoxilina-Eosina

IARC International Agency for research on Cancer/Agencia Internacional para la investigación del Cáncer

IUCN International Unión for Conservation of Nature/Unión Internacional para la conservación de la naturaleza

Kg Quilogramos

L longitud

l Litro

LHC Longitud hocico cloaca

LT Longitud total

M molar

MANOVA Análisis de la varianza multivariado

MANCOVA Análisis de la covarianza multivariado

mg Miligramos

mg/l Miligramos por litro

ml Mililitros

mm Milímetros

MMs Melanomacrófagos

OMS Organización mundial de la Salud

OT Ovocitos testiculares

P Probabilidad estadística

Pe Peso corporal

PF Productos farmacéuticos

Ph Potencial de hidrógeno

p/v peso por volumen

Ref 1 Sitio de referencia, departamento Garay, Santa Fe.

Ref 2 Sitio de referencia, Presidente de la Plaza, Chaco.

SENASA Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

µm micrómetro o micra

USEPA United States Environmental Protection Agency

VT volumen testicular

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

➤ **Publicaciones en revistas científicas en relación al tema de tesis.**

- 1) Huespe, I., Cabagna-Zenklusen, M., **Curi, L.M.**, Peltzer, P., Attademo, M.A., Villafañe, N., Lajmanovich, R.C. 2017. Melanomacrófagos hepáticos y actividad de la enzima Glutathion S-Transferasa en *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae) como biomarcadores de estrés oxidativo por la exposición a clorpirifos. Acta Biológica Colombiana. 22(2), 234-237.
- 2) **Curi, L.M.**, Peltzer, P.M., Sandoval, M.T., Lajmanovich, R.C. 2019. Acute Toxicity and Sublethal Effects Caused by a Commercial Herbicide formulated with 2,4D on *Physalaemus albonotatus* Tadpoles. Water, Air & Soil Pollution. 230, 22.

➤ **Presentaciones a congresos y/o reuniones científicas de temas relacionados a la tesis.**

- 1) XXIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste. 15 y 16 de junio de 2017. Resistencia, Chaco, Argentina. **Curi, L.M.**, Peltzer, P.M., Sandoval, M.T., Lajmanovich, R.C., Céspedes, J.A. Efectos letales y subletales causados por la exposición al herbicida 2,4D sobre larvas de *Physalaemus albonotatus* (Anura; Leptodactylidae). Modalidad: Expositor-Póster.
- 2) XVIII Congreso Argentino de Herpetología. 2 al 6 de Octubre de 2017. Salta, Argentina. **Curi, L.M.**, Peltzer, P.M., Sandoval, M.T., Lajmanovich, R.C. Alteraciones hepáticas y cuantificación de melanomacrófagos en renacuajos de *Physalaemus albonotatus* expuestos a 2,4D. Modalidad: Expositor-Póster.

- 3) XXIV Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste. 21 y 22 de Junio de 2018. Corrientes, Argentina. **Curi, L.M.**, Peltzer, P.M., Sandoval, M.T., Céspedes, J.A., Lajmanovich, R.C. Melanomacrófagos hepáticos como biomarcadores de exposición a xenobióticos. Modalidad: Expositor-Póster.
- 4) XX Congreso Argentino de Herpetología. 15 al 18 de Octubre de 2019. San Juan (Argentina). **Curi, L.M.**, Peltzer, P.M., Attademo, M.A., Lajmanovich, R.C. Efectos de los agroecosistemas sobre los anfibios anuros: análisis morfo-histológico de órganos blanco (hígado, gónadas). Expositor-Póster.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tencológicas (CONICET) por cofinanciar junto a la UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE, la beca doctoral bajo la cual realicé el doctorado en dicha institución.

Mi más sincero agradecimiento a quienes me dirigieron este trabajo de tesis: Rafael Lajmanovich y Paola Peltzer, por haber confiado en mí, brindado apoyo incondicional y transmitirme todos sus conocimientos, entusiasmo e incentivo para desarrollar la tarea científica. Agradezco sus consejos, correcciones, así como el valioso ejemplo que me han dado de seguir siempre en la lucha por lo que uno anhela y nunca bajar los brazos.

Un agradecimiento especial a Beatriz Álvarez y Jorge Céspedes por ser quienes me han permitido ingresar al laboratorio de Herpetología de la FaCENA-UNNE y comenzar con las investigaciones, aun siendo alumna de la carrera. Además a Maria Teresa Sandoval y Victor Zaracho, por la valiosa ayuda y predisposición siempre que la requerí.

A mis compañeros de Laboratorio de Herpetología (FaCENA-UNNE), de los cuales hace unos cuantos años, he aprendido mucho y también he entablado una hermosa relación de compañerismo. Entre ellos, María Teresa Sandoval, Victor Zaracho, Cinthia Calamante, Fernanda Abreliano, Lujan Gómez, Belen Arrieta, Jose Augusto Ruiz García, Miguel Regnet, Soledad Palomas, Fiana Fernandez, David Aguirre. A todos ellos muchas gracias!

Así como también a mis compañeros del Laboratorio de Ecotoxicología (UNL, Santa Fe) (Maximiliano Attademo, Agustín Bassó, Candela Martinuzzi y Silvia Seib) por la buena predisposición, y el valioso apoyo en tareas de campo, laboratorio, entre otras.

Gracias a mi mamá por permitirme estudiar lo que quería, es un gran privilegio que no todos podemos tenerlo. Y a mi hermana Florencia por ser el pilar que me sostiene todos los días de mi vida.

Y finalmente un agradecimiento para todas las personas que en estos años me acompañaron, no de forma académica pero si en el día a día.

