



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

Morfogénesis Gonadal de *Physalaemus santafecinus* y sus Alteraciones por Acción de Disruptores Estrogénicos

Tesis para optar al título de Doctor de la
Universidad Nacional del Nordeste en Biología

Tesista: Lic. María Luján Gómez

Directora de Tesis: Dra. Cristina Silvia Pérez Coll

Sub-director de Tesis: Dr. Fernando Javier Meijide

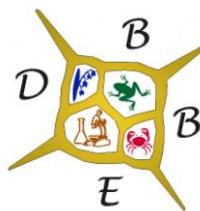
Diciembre 2019



Universidad Nacional
del Nordeste



Facultad de Ciencias Exactas
y Naturales y Agrimensura



UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

3iA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INGENIERÍA AMBIENTAL

**A LOS
AMORES DE
MI VIDA**

ABREVIATURAS

AFE: alquifenoletoxilado

C: corteza

CF: células foliculares

CG: células germinales

CGPs: células germinales primordiales

CGD: cuerpo graso derecho

CGI: cuerpo graso izquierdo

CL: concentración letal

CL₁₀: concentración letal 10

CL₅₀: concentración letal 50

CL₉₀: concentración letal 90

Cm: cromatóforos

CO: cavidad ovárica

CpSe: células preSertoli

CS: células somáticas

CSe: células de Sertoli

E: estadio

E₂: 17 β estradiol

EGD: esbozo gonadal derecho

EGI: esbozo gonadal izquierdo

E: célula epitelial

Eg: espermatogonias

gr/L: gramos por litro

H-E: hematoxilina – eosina

h: horas

UICN: Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza

L: litros

LC: longitud de la cola

LHC: longitud hocico – cloaca

LS: lóbulos seminíferos

LOEC: concentración más baja que produce efecto

M: médula

MEB: Microscopía Electrónica de Barrido

mg/L: miligramos por litro

mg/mL: miligramos por mililitro

ml: mililitros

ml/min: mililitros por minuto

mm: milímetros

min: minutos

µm: micrómetros

µg/L: microgramos por litro

nm: nanometros

NF: nonilfenol

NFE: nonilfenoletoxilado

NF1: 1 µg/L NF

NF10: 10 µg/L NF

NF100: 100 µg/L NF

NOEC: concentración más alta que no produce efecto

O: ovario

Ocp: oocitos en crecimiento primario

Og: oogonias

Omt: oocitos meióticos tempranos

RM: riñón mesonéfrico

RMD: riñón mesonéfrico derecho

RMI: riñón mesonéfrico izquierdo

T: testículo

UNNEC: Colección Herpetológica de la Universidad Nacional del Nordeste

UV-B: radiación ultravioleta B

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. Desarrollo gonadal y diferenciación sexual en anfibios	4
2. Los anfibios como bioindicadores de contaminación ambiental	11
3. Disruptores endocrinos. Efectos de compuestos estrogénicos	13
4. Especie empleada como modelo experimental: <i>Physalaemus santafecinus</i>	17
4.1. Clasificación taxonómica de la especie	19
OBJETIVOS e HIPÓTESIS	21
MATERIALES y MÉTODOS	23
1. Estudio de la morfogénesis del sistema urogenital	24
1.1. Tareas de campo	24
1.1.1. Obtención del material de estudio	24
1.2. Tareas de laboratorio	24
1.2.1. Cría en cautiverio	24
1.2.2. Selección y análisis de ejemplares	26
1.2.3. Análisis del sistema urogenital por MEB	26
1.2.4. Análisis histológico de las gónadas	27
2. Evaluación de los efectos de la exposición a nonilfenol	29
2.1. Bioensayos subcrónicos de toxicidad letal	30
2.2. Bioensayo crónico de toxicidad subletal	32
2.3. Análisis estadístico	34
2.4. Medición de las concentraciones reales de NF en el bioensayo crónico	35
3. Consideraciones éticas	36

RESULTADOS	37
1. Desarrollo del sistema urogenital	38
1.1. Mesonefros	38
1.2. Cuerpos grasos	40
1.3. Gónadas	42
1.4. Histología gonadal	44
1.4.1. Gónada indiferenciada	44
1.4.2. Diferenciación del ovario	45
1.4.3. Diferenciación del testículo	48
2. Evaluación de los efectos de la exposición a NF	51
2.1. Bioensayos subcrónicos de toxicidad letal	51
2.2. Bioensayo crónico de toxicidad subletal	54
2.2.1. Mortalidad durante el bioensayo	54
2.2.2. Tiempo hasta finalizar la metamorfosis	55
2.2.3. Tamaño corporal	55
2.2.4. Efectos sobre la proporción de sexos	56
2.2.5. Efectos sobre la estructura gonadal	58
2.2.6. Concentraciones reales de NF	64
DISCUSIÓN	67
1. Desarrollo del sistema urogenital	68
1.1. Anatomía del sistema urogenital	68
1.2. Desarrollo gonadal y diferenciación sexual	70
2. Efectos de la exposición a NF	75
2.1. Toxicidad letal	75
2.2. Efectos subletales	77

2.3. Concentraciones reales de NF	79
CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	83
APÉNDICE	107
ANEXO PUBLICACIONES	116
AGRADECIMIENTOS	119

Morfogénesis gonadal de *Physalaemus santafecinus* y sus alteraciones por acción de disruptores estrogénicos

RESUMEN

En el presente trabajo se examinó el proceso de desarrollo gonadal, tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica de barrido, en *Physalaemus santafecinus*, anuro autóctono de pequeño tamaño perteneciente a la familia Leptodactylidae. El proceso de diferenciación sexual responde a un patrón diferenciado, en el cual los esbozos gonadales se diferencian directamente en ovarios o testículos. Este patrón de diferenciación sexual es similar al de otras especies de anuros descriptas por otros autores, difiriendo únicamente en el momento de la diferenciación. En las hembras, la diferenciación histológica del ovario ocurrió en el E.34, mientras que los primeros folículos con oocitos en diplotene se observaron en el E.40. En los machos, la diferenciación del testículo se evidenció en el E.36, mientras que la formación de los lóbulos seminíferos se observó a partir del E.41. Estas observaciones indican un tipo básico de desarrollo gonadal para la especie en relación a su desarrollo somático.

En una segunda parte de este trabajo, se analizó el efecto de la exposición al compuesto estrogénico 4-nonalfenol (NF) en larvas de *P. santafecinus* mediante un método semiestático. En primer lugar, se evaluó la toxicidad letal del compuesto para larvas en E.25 a distintos tiempos de exposición dentro del rango de 72 a 168 h. Para 168 h de exposición, se estimaron valores de concentración letal incipiente comprendidos entre 150 y 175 µg/L, correspondientes a los valores de NOEC y LOEC, respectivamente. Posteriormente, se realizó un ensayo de exposición crónica desde el E.25 hasta el final de la metamorfosis con el fin de evaluar el efecto del NF y del estrógeno 17 β -estradiol (E₂) sobre la diferenciación sexual de los ejemplares. La exposición a E₂ durante el período de diferenciación sexual tuvo un notorio efecto estrogénico, direccionando el proceso de diferenciación hacia las hembras. La exposición a concentraciones relevantes de NF no tuvo un efecto estrogénico sobre la diferenciación gonadal de *P. santafecinus*.

Palabras Claves: Anfibios, Anuros, Leptodactylidae, desarrollo gonadal, diferenciación sexual, foliculogénesis, morfología, histología, bioensayos, toxicidad letal, efectos subletales, disruptores endocrinos, estrógenos ambientales, alquilenoles, nonalfenol, estradiol.

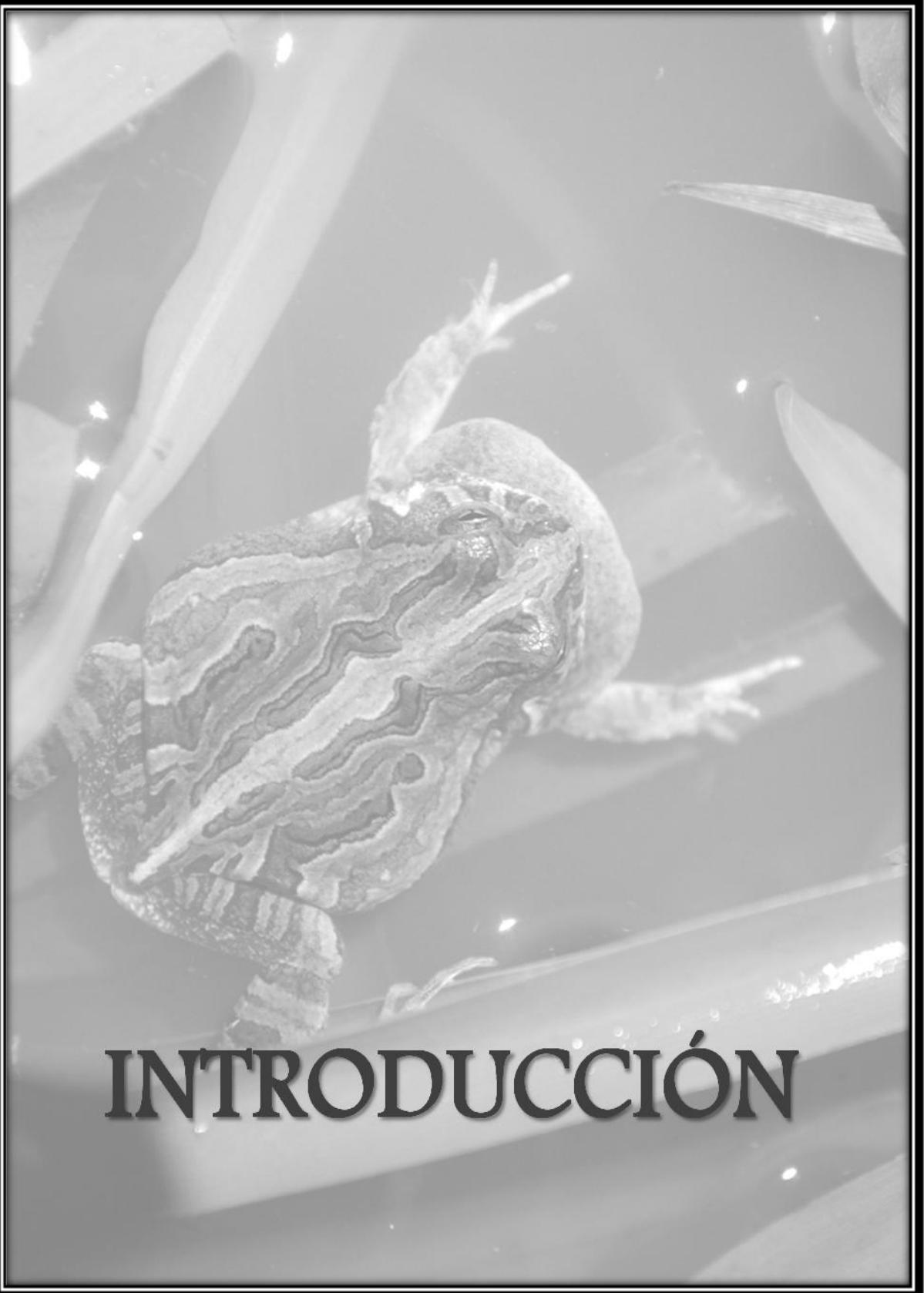
Gonadal morphogenesis of *Physalaemus santafecinus* and its alterations by the action of estrogenic disruptors

ABSTRACT

In the present work, the process of gonadal development was examined, both at the level of optic microscopy and scanning electron microscopy, in *Physalaemus santafecinus*, a native small anuran belonging to the family Leptodactylidae. The process of sex differentiation evidenced corresponds to a differentiated pattern, in which gonadal primordia differentiate directly into ovaries or testes. This pattern of sex differentiation is similar to that of other anuran species described by other authors, differing only in the time of differentiation. In females, histological differentiation of the ovary occurred at E.34, whereas the first follicles containing diplotene oocytes were observed at E.40. In males, testis differentiation was evidenced at E.36, whereas formation of seminiferous lobules was observed from E.41 onwards. These findings indicate a basic rate of gonadal development for the species in relation to somatic development.

In a second part of this work, we analyzed the effect of exposure to the estrogenic compound 4-nonylphenol (NF) on larvae of *P. santafecinus* by a semi-static method. First, lethal toxicity of NF for larvae in E.25 was assessed at different exposure periods within the range 72-168 h. For 168 h exposure, values of incipient lethal concentration were estimated between 150 and 175 µg/L, which correspond to NOEC and LOEC values, respectively. Subsequently, a chronic exposure test was conducted from E.25 until the end of metamorphosis in order to evaluate the effect of NF and the estrogen 17 β -estradiol (E_2) on sex differentiation of the specimens. The exposure to E_2 during the period of sex differentiation had a notorious estrogenic effect, directing the differentiation process towards the females. Exposure to relevant concentrations of NF did not have an estrogenic effect on gonadal differentiation of *P. santafecinus*.

Keywords: Amphibians, Anura, Leptodactylidae, gonadal development, sex differentiation, folliculogenesis, morphology, histology, laboratory essays, lethal toxicity, sublethal effects, endocrine disrupting compounds, environmental estrogens, alkylphenolic compounds, nonylphenol, estradiol.



INTRODUCCIÓN

1. Desarrollo gonadal y diferenciación sexual en anfibios.

En los anfibios, el sexo está determinado genéticamente (Sugita *et. al*, 2001; Nakamura, 2009; Yoshimoto e Ito, 2011; Miura, 2017). Algunas especies presentan heterogametismo masculino (machos XY) mientras que otras son heterogaméticas femeninas (hembras ZW). Sin embargo, aproximadamente sólo el 4% de los anfibios estudiados poseen cromosomas sexuales heteromórficos (Norris & López, 2011; Miura, 2017). Se conoce además que factores ambientales como la temperatura y los contaminantes, pueden influir en el proceso de diferenciación sexual en algunas especies de anfibios, resultando en desviaciones de la proporción 1:1 de sexos (Hayes, 1998; Wallace *et. al*, 1999; Bögi *et. al*, 2002; Eggert, 2004; Duarte-Guterman *et. al*, 2009; Nakamura, 2009, 2010; Langlois *et. al*, 2010; Sarre *et. al*, 2011; Flament, 2016; Lambert *et. al*, 2016; Bai *et. al*, 2017).

A nivel morfológico, las gónadas de los anfibios se organizan y desarrollan a partir de un par de crestas genitales de posición ventro-lateral a la vena cava, situada entre ambos riñones mesonéfricos. Las crestas genitales se forman por pliegues longitudinales del epitelio celómico en la región dorsal de la cavidad abdominal. Concomitantemente con la organización de las crestas genitales, ocurre la migración de las células germinales primordiales (CGPs) desde el endodermo presuntivo, en los anuros, o desde la placa mesodérmica lateral, en las salamandras (Humphrey, 1925; Franchi *et. al*, 1962; Viertel & Richter, 1999; Gilbert, 2010). Las CGPs se reúnen en la región central de las crestas genitales, permaneciendo los extremos libres de células germinales. Esta organización da lugar a tres regiones de la cresta genital. La región anterior o progonio da origen a los cuerpos grasos, la región central o mesogonio se organiza en el tejido gonadal propiamente dicho, mientras que el extremo posterior o epigonio permanece como un apéndice estéril, que puede ocasionalmente originar un cuerpo graso adicional (Witschi, 1929). Vistas en sección

transversal, las gónadas indiferenciadas aparecen como estructuras sólidas compuestas por una corteza externa que contiene tanto células somáticas como células germinales, y una médula interna, formada únicamente por células somáticas (Figura 1). Si bien el origen de las células medulares fue inicialmente un aspecto controversial de la gonadogénesis en anuros, en los últimos años diversos estudios han aportado claras evidencias de que la médula se origina a partir del epitelio celómico, al igual que la corteza (Merchant-Larios & Villalpando, 1981; Iwasawa & Yamaguchi, 1984; Tanimura & Iwasawa, 1988, 1989; Falconi *et. al*, 2004; Piprek *et. al*, 2010, 2017). Asimismo, algunos estudios han puesto en evidencia que las células medulares se organizan en “nudos” con distribución metamérica a lo largo de la gónada (Figura 2) (Ogielska & Kotusz, 2004; Piazza, 2006; Piprek *et. al*, 2014). Esta condición metamérica de la gónada de los anfibios fue descripta por primera vez por Witschi (1929), quien denominó gonómeros a los segmentos gonadales. Según el concepto de antagonismo córtico-medular (Witschi, 1929), se postula que la diferenciación sexual de la gónada depende del desarrollo diferencial de la corteza o la médula, y la regresión concomitante del otro tejido. Durante la diferenciación del ovario, la corteza se desarrolla con el progreso de la oogénesis, mientras que la médula se reduce al formarse la cavidad ovárica en su interior, permaneciendo las células medulares como un epitelio que reviste la cavidad en cada saco ovárico (Ogielska & Kotusz, 2004; Piazza, 2006; Piprek *et. al*, 2010) (Figuras 1, 2). En los machos, las células germinales invaden la médula, entremezclándose con las células somáticas. De este modo, la médula se reconoce por la distribución homogénea de ambos tipos celulares. Por su parte, la corteza queda reducida a un epitelio superficial que dará origen a la túnica albugínea (Figura 1). En ambos sexos, la gónada en desarrollo es invadida por fibroblastos y vasos sanguíneos provenientes del mesonefros, que ingresan a través del mesenterio gonadal y contribuyen al desarrollo del tejido intersticial. Dentro de los elementos celulares del tejido intersticial se encuentran los precursores de las células esteroidogénicas

(células tecales en el ovario y células de Leydig en el testículo) (Viertel & Richter, 1999; Piazza, 2006; Piprek *et. al*, 2010, Haczkiewicz & Ogielska, 2013).

Un concepto poco conocido en relación a la oogénesis en los vertebrados es la formación de estructuras denominadas cistos como intermediarias en el desarrollo de los folículos ováricos a partir de las oogonias. Los cistos están formados por células germinales (oogonias secundarias u oocitos en etapas tempranas de la meiosis) interconectadas por puentes citoplasmáticos como resultado de una citocinesis incompleta. Las células germinales del cisto se encuentran circundadas por células prefoliculares periféricas, las cuales rodean individualmente cada oocito cuando éstos alcanzan el estadio de diplotene de la profase meiótica. De este modo, se generan múltiples folículos a partir de cada cisto (Pepling, 2006; Marlow, 2010). La formación de los cistos es un aspecto conservado de la oogénesis, habiendo sido reportada en distintas especies de invertebrados, como insectos (de Cuevas *et. al*, 1997; Pepling *et. al*, 1999) y vertebrados, como peces teleósteos, anfibios anuros y mamíferos (Pepling *et. al*, 1999; Matova & Cooley, 2001; Kloc *et. al*, 2004; Pepling, 2006; Saito *et. al*, 2007; Mazzoni *et. al*, 2010; Quaglio-Grassiotto *et. al*, 2011; Wildner *et. al*, 2013; Meijide *et. al*, 2016).

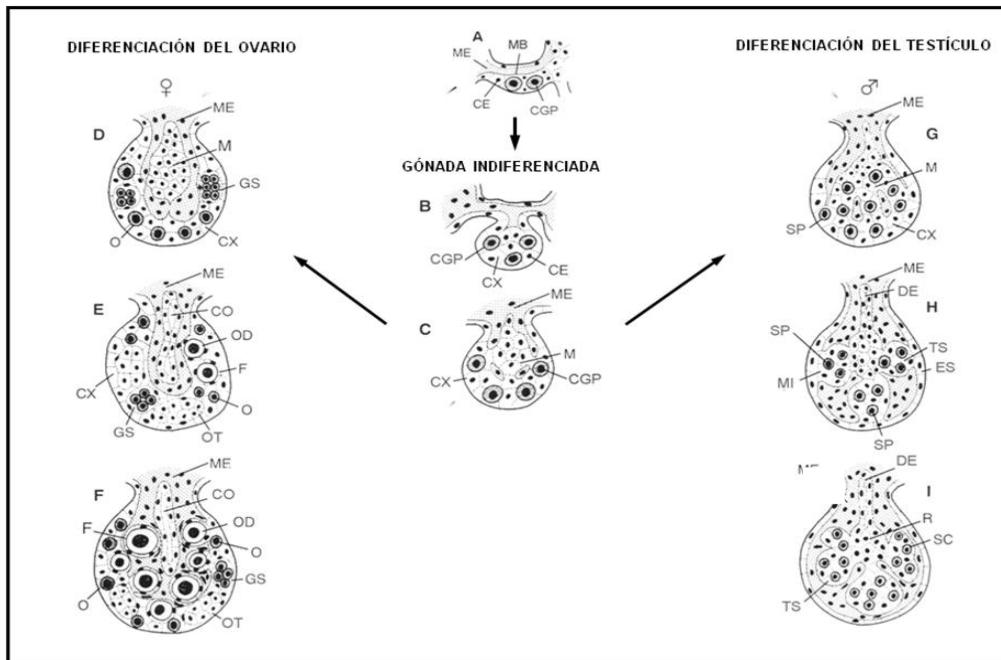


Figura 1. Representación esquemática del desarrollo de las gónadas (ovario y testículo) en anfibios anuros con diferenciación sexual directa. (A) Formación de la cresta genital. (B) Proliferación de células epiteliales celómicas en la gónada indiferenciada. (C) Corteza y médula parcialmente separadas. (D) Corteza y médula separados por tejido mesenquímico. (E) Regresión de la médula y formación de la cavidad ovárica. (F) Desarrollo de folículos. (G) Ingreso de células germinales hacia la médula, (H) Crecimiento del mesénquima hacia la zona interna, corteza reducida a un epitelio superficial, (I) Formación de lóbulos seminíferos, rete testis y ductos eferentes. CE: célula del epitelio celómico; CGP: célula germinal primordial; CO: cavidad ovárica; CX: corteza; DE: ducto eferente; ES: epitelio superficial; F: célula folicular; GS: gonia secundaria; M: médula; MB: membrana basal; ME: mesénquima; O: oogonia; OD: oocito en diplotene; OT: oocito en meiosis temprana (leptotene-paquitene); R: rete testis; SC: espermatocito; SP: espermatogonia; TS: túbulo (lóbulo) seminífero. Modificado de Viertel & Richter (1999).

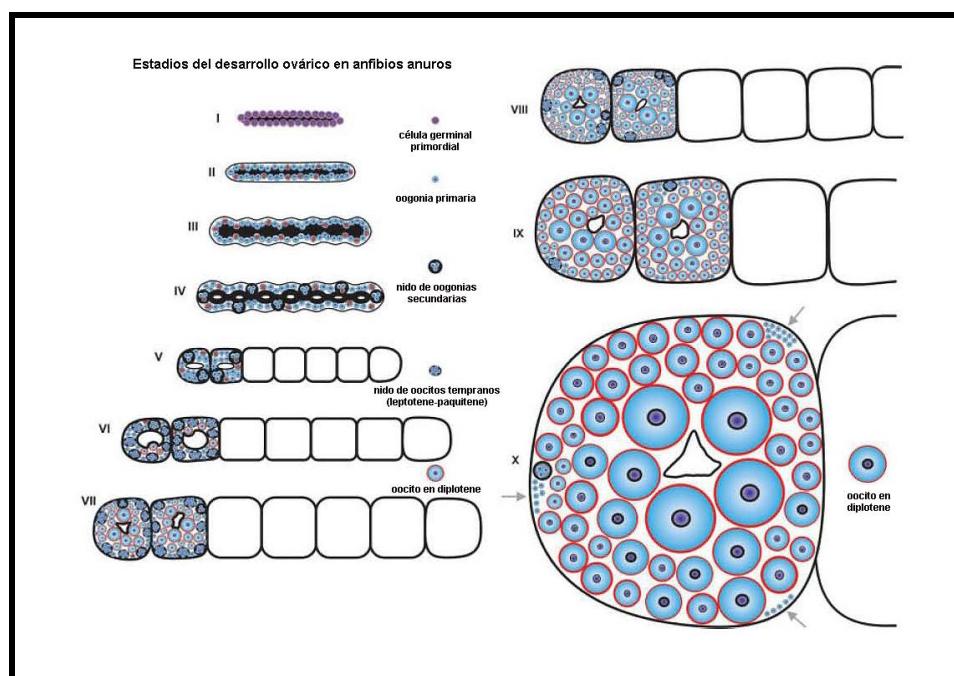


Figura 2. Patrón general de diferenciación ovárica en anfibios anuros, mostrado en una especie hipotética que presenta siete sacos ováricos. Los estadios I a III corresponden a la gónada indiferenciada mientras que los estadios IV a X corresponden a la diferenciación del ovario. Nótese que las células somáticas medulares forman “nudos” metaméricos en cuyo interior se forma la cavidad ovárica. Modificado de Ogielska & Kotusz (2004).

El desarrollo gonadal fue estudiado con diverso grado de detalle en varias especies de anuros, tales como *Rana sylvatica* (Witschi, 1929), *Rana cantabrigensis* (Cheng, 1932), *Rana esculenta* (Padoa, 1942), *Rana ornativentris* (Iwasawa, 1969), *Rana catesbeiana* (Hsu & Lyang, 1970), *Xenopus laevis* (Wylie *et al.*, 1976; Merchant-Larios & Villalpando, 1981; Iwasawa & Yamaguchi, 1984; Piprek *et. al*, 2017), *Lithobates pipiens* (Merchant-Larios & Villalpando, 1981), *Bufo japonicus formosus* (Tanimura & Iwasawa, 1986), *Pelophylax nigromaculatus* (Tanimura & Iwasawa, 1988), *Bombina orientalis* (Lopez, 1989), *Rhacophorus arboreus* (Tanimura & Iwasawa, 1989), *Pelophylax ridibunda* (Ogielska & Warner, 1990), *Clinotarsus curtipes* (Gramapurohit *et. al*, 2000), *Rana dalmatina* (Falconi *et. al*, 2001), *Bufo bufo* (Falconi *et. al*, 2004), *Rhinella arenarum* (Piazza, 2006), *Xenopus tropicalis* (Jamil *et. al*, 2008), *Bombina variegata* (Piprek *et. al*, 2010), *Pseudis platensis*, (Fabrezi *et. al*, 2010), *Euphlyctis cyanophlyctis* (Phuge & Gramapurohit, 2013), *Scinax fuscovarius* (Goldberg, 2015), *Hylarana malabarica* y *Microhyla ornata* (Mali & Gramapurohit, 2015), *Dendropsophus labialis* (Pinto-Erazo *et. al*, 2016) y *Leptodactylus latrans* (Bach, 2018). En el conjunto de dichas investigaciones, se destaca la escasez de estudios en especies neotropicales, solo abordados en años recientes.

En anfibios anuros, se han caracterizado dos modelos de diferenciación gonadal: 1) patrón diferenciado, en el cual la gónada indiferenciada se diferencia directamente en ovario o testículo, y 2) patrón indiferenciado, en el cual el esbozo gonadal se organiza inicialmente como ovario en todos los individuos y luego se diferencia en testículo en los machos, atravesando una fase de degeneración de oocitos (Hayes, 1998; Flament *et. al*, 2011; Mali & Gramapurohit, 2015). En algunas especies, se ha reportado un tercer tipo de diferenciación denominado semi-diferenciado, aunque se ha comprobado que éste representa en realidad una variante del tipo indiferenciado (Mali & Gramapurohit, 2015). La mayor parte de los anuros

presentan el patrón diferenciado; algunos ejemplos del patrón indiferenciado pueden encontrarse en *R. arboreus* (Tanimura & Iwasawa, 1989), *C. curtipes* (Gramapurohit *et. al.*, 2000), *P. platensis* (Fabrezi *et. al.*, 2010), *E. cyanophlyctis* (Phuge & Gramapurohit, 2013) y *H. malabarica* (Mali & Gramapurohit, 2015).

Por otro lado, existen variaciones entre las distintas especies de anuros en cuanto al momento de diferenciación sexual y la tasa de desarrollo gonadal en relación al estadio de desarrollo somático. Para el ovario, Ogielska & Kotusz (2004) describieron tres tipos de desarrollo: básico, acelerado y retardado. En las especies que presentan el patrón básico, la diferenciación del ovario ocurre durante la prometamorfosis (estadios 31-41 de Gosner) mientras que los primeros folículos se forman durante esta etapa, o más tardíamente, durante el clímax metamórfico (estadios 42-46 de Gosner) (ej: *P. nigromaculatus*, Tanimura & Iwasawa, 1988; *B. orinetalis*, Lopez, 1989; *R. temporaria*, Ogielska & Kotuzs, 2004; *P. platensis*, Fabrezi *et. al.*, 2010; *B. variegata*, Piprek *et. al.*, 2010; *H. malabarica*, Mali & Gramapurohit, 2015; *X. laevis*, Piprek *et. al.*, 2017). En las especies con patrón acelerado, la diferenciación del ovario ocurre durante la premetamorfosis (estadios 25-30 de Gosner) mientras que los primeros folículos pueden observarse durante esta etapa o poco después, durante la prometamorfosis (ej: *P. ridibunda*, Ogielska & Wagner, 1990; *C. curtipes*, Gramapurohit *et. al.*, 2000; *P. lessonae* y *P. esculentus*, Ogielska & Kotuzs, 2004; *E. cyanophlyctis*, Phuge & Gramapurohit, 2013; *S. fuscovarius*, Goldberg, 2015; *M. ornata*, Mali & Gramapurohit, 2015). Finalmente, en el patrón retardado, típico de Bufónidos, la diferenciación del ovario ocurre durante o luego de la metamorfosis, mientras que los primeros folículos aparecen en el período postmetamórfico (ej: *Bufo woodhousii*, King, 1908; *B. japonicus formosus*, Tanimura & Iwasawa, 1987; *B. bufo*, Falconi *et. al.*, 2004; *R. arenarium*, Piazza, 2006). En cuanto al testículo, se ha observado que el momento de diferenciación también presenta variaciones entre las distintas especies, pudiendo ocurrir

durante la etapa larval, durante la metamorfosis, o incluso tardíamente en el período postmetamórfico (Goldberg, 2015; Mali & Gramapurohit, 2015).

Las hormonas esteroides (estrógenos y andrógenos) juegan un rol fundamental en la diferenciación gonadal y el desarrollo de caracteres sexuales secundarios de los vertebrados (Adkins-Regan, 1987; Ottinger *et. al.*, 2001; Devlin & Nagahama, 2002; Norris & Lopez, 2011). Durante estos procesos se establece un mecanismo de señales intrínsecas entre las células sexuales y las células esteroidogénicas que controlan y dirigen la organización final de ovarios y testículos y regulan su función. Asimismo, las hormonas sexuales participan en la diferenciación del tracto reproductivo característico de cada sexo (Saunders *et. al.*, 2000; Britt *et. al.*, 2002, 2004; Pepe *et. al.*, 2002; Juengel *et. al.*, 2006; Arias-Alvarez *et. al.*, 2007; Burkhardt *et. al.*, 2010).

Diversos estudios efectuados en anfibios indican que los esteroides sexuales endógenos están implicados en la diferenciación gonadal (Yu *et. al.*, 1993; Zaccanti *et. al.*, 1994; Chardard *et. al.*, 1995; Petrini & Zaccanti, 1998; Chardard & Dournon, 1999; Miyata *et. al.*, 1999; Miyata & Kubo, 2000; Flament *et. al.*, 2011), si bien se han reportado casos en los que la diferenciación sexual precede el inicio de la esteroidogénesis gonadal (Gramapurohit *et. al.*, 2000). Asimismo, se demostró la capacidad de los esteroides sexuales, administrados en forma exógena, para inducir la reversión completa del sexo o la aparición de intersexos gonadales en varias especies de anfibios anuros (Chang & Witschi, 1956; Richards & Nace, 1978; Adkins-Regan, 1987; Villalpando & Merchant-Larios, 1990; Chang *et. al.*, 1996; Hayes, 1998; Hayes & Menéndez, 1999; Saidapur *et. al.*, 2001; Mackenzie *et. al.*, 2003; Hogan *et. al.*, 2008). En *R. arboreus* (Iwasawa *et. al.*, 1979), *Rana rugosa* (Ohtani *et. al.*, 1999) y *X. laevis* (Villalpando & Merchant-Larios, 1990) se demostró la existencia de un período crítico del desarrollo durante el cual las gónadas son sensibles a los esteroides sexuales. Por otra parte, ciertos estudios indican que un mismo esteroide puede inducir diferentes efectos en distintas

especies. Así, por ejemplo, la administración exógena de dosis similares de 17 β-estradiol (E₂) indujo masculinización de ovarios en *X. laevis* (Gallien, 1953), no tuvo efectos en *Rana japonica* (Yoshikura, 1962) y provocó la feminización testicular en *L. pipiens* (Richards & Nace, 1978). Gallien (1962) también destacó que en la familia Ranidae, la administración de bajas dosis de E₂ provoca feminización mientras que dosis elevadas producen el efecto contrario. Este mismo autor sugirió que los efectos de los esteroides sobre la diferenciación sexual estarían relacionados con el sexo heterogamético. Sin embargo, Hayes (1998) planteó que no existiría correspondencia entre la acción de estas hormonas y el sistema de determinación genética del sexo, ni con la filogenia del taxón. La variedad de efectos observados por la administración de esteroides dependería del tiempo y duración del tratamiento y particularmente de los mecanismos de incorporación y metabolismo hormonal, intrínsecos a cada especie (Chardard *et. al*, 2003).

2. Los anfibios como bioindicadores de contaminación ambiental

Los anfibios presentan características particulares por las cuales son considerados buenos bioindicadores de la calidad del ambiente: alta dependencia del medio en el que habitan, falta de migraciones, piel desnuda con elevada permeabilidad, huevos sin cáscara, imposibilidad de regular su temperatura corporal (ectotermia), y ciclo de vida bifásico dependiente tanto del medio acuático como del medio terrestre (Rabb, 1990; Blaustein & Kiesecker, 2002; Blaustein *et. al*, 2003). Al estar confinados al ambiente acuático durante la vida embrionaria y larval y criarse en áreas impactadas por desechos de la actividad agrícola, industrial y de zonas urbanas, los anfibios están a menudo expuestos a una gran variedad de sustancias químicas de origen antrópico. En particular, los embriones y larvas de anuros son organismos altamente susceptibles a los efectos adversos de diferentes xenobióticos, debido a su modo de vida y hábitos ecológicos. Por ello son buenos boindicadores de contaminación y

se utilizan comúnmente en evaluaciones ecotoxicológicas (Perez-Coll & Herkovits, 1990; Herkovits & Helguero, 1998; Kloas *et. al*, 1999; Hayes *et. al*, 2002; Lajmanovich *et. al*, 2003, 2011, 2013; Aronzon *et. al*, 2011; Hutler Wolkowicz *et. al*, 2011).

Desde la década del 80, la drástica reducción, y en ciertos casos desaparición, de algunas poblaciones de anfibios a nivel mundial comenzó a llamar la atención de la comunidad científica y herpetológica (Houlahan *et. al*, 2000; Lavilla *et. al*, 2000; Alford *et. al*, 2001; Stuart *et. al*, 2004; Young *et. al*, 2004). Desde entonces, se han llevado a cabo diversas investigaciones con el objetivo de identificar las causas de la disminución numérica global de las poblaciones de anfibios. Como resultado de estos estudios, se han propuesto varios factores como responsables de esta problemática, entre los cuales se destacan: a) la introducción de especies exóticas, b) el cambio climático, c) la radiación UV-B, d) la modificación y fragmentación del hábitat, e) las enfermedades emergentes, f) el comercio de especies, y g) la contaminación ambiental, particularmente el uso de plaguicidas (Davidson *et. al*, 2001; Young *et. al*, 2001; Lavilla, 2001; Collins & Storfer, 2003). Según la Unión Internacional para Conservación de la Naturaleza (UICN), las principales amenazas para la conservación de los anfibios son la pérdida del hábitat y la contaminación ambiental (Figura 3). En nuestro país, algunas investigaciones han detectado la existencia de estos factores y proponen que podrían estar actuando a nivel local como factores perjudiciales para las comunidades de anfibios (Lavilla, 2001; Lavilla & Heatwole, 2010). Entre ellos, se puede mencionar la pérdida de hábitats naturales o seminaturales por conversión en áreas agrícolas ganaderas y la contaminación química por metales pesados, productos farmacéuticos y agroquímicos (Paruelo *et. al*, 2006; Jofré *et. al*, 2012; Elorriaga *et. al*, 2013; Ronco *et. al*, 2016); la introducción de peces (Úbeda & Grigera, 2007; Barrionuevo & Ponssa, 2008) y anfibios exóticos (Pereyra *et. al*, 2006; Barrasso *et. al*, 2009; Akmentins & Cardozo, 2010; Sanabria *et. al*, 2011; Millitelo *et. al*, 2017), y finalmente el aumento en la incidencia de

enfermedades infecciosas emergentes, entre ellas ranavirus (Fox *et. al.*, 2006) y quitridiomicosis (Herrera *et. al.*, 2005; Arellano *et. al.*, 2009; Ghirardi *et. al.*, 2011; 2014; Delgado *et. al.*, 2012; Agostini & Burrowes, 2015; Agostini *et. al.*, 2015).

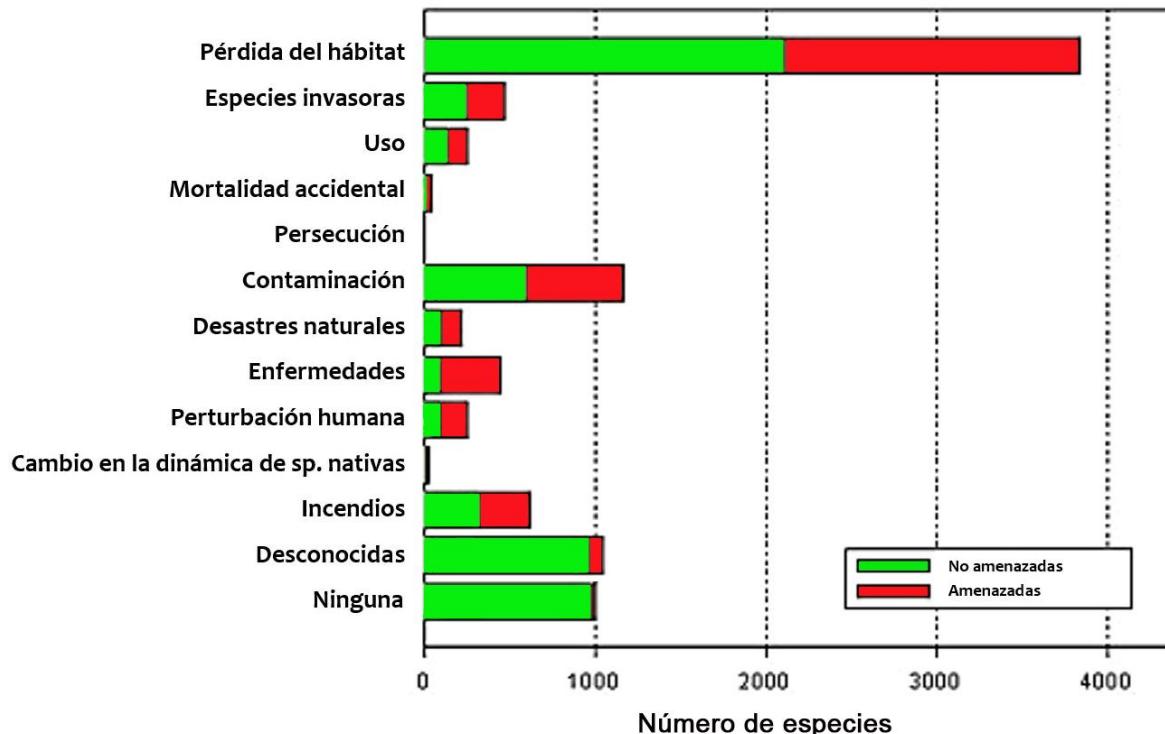


Figura 3. Principales amenazas para la conservación de los anfibios según la UICN. Modificado de <http://www.iucnredlist.org/initiatives/amphibians/analysis/major-threats>.

3. Disruptores endocrinos. Efectos de compuestos estrogénicos.

En las últimas décadas, la comunidad científica ha alertado acerca de que muchas sustancias contaminantes, que frecuentemente están presentes en los ecosistemas como consecuencia de diversas actividades antrópicas, pueden actuar como disruptores hormonales modificando el funcionamiento del sistema endocrino de los animales silvestres (Fry & Toone, 1989; Colborn & Clement, 1992; Guilette & Crain, 1996; Crisp *et. al.*, 1998; Arukwe & Goksoyr, 1998; Jobling *et. al.*, 1998; Tyler *et. al.*, 1998; Vos *et. al.*, 2000). Los disruptores endocrinos son sustancias que ejercen su efecto ya sea imitando la acción de las hormonas endógenas o interfiriendo en su producción, liberación, metabolismo o eliminación (Tabb & Blumberg, 2006). Los estrógenos ambientales o xenoestrógenos son una de las clases

principales de disruptores endócrinos hallados en el ambiente. Son compuestos que presentan una estructura molecular similar a la de los estrógenos endógenos. De modo general se unen a los receptores celulares interfiriendo la acción estrogénica (Soto *et. al*, 1991; Jobling & Sumpter, 1993; White *et. al*, 1994; Jobling *et. al*, 1996), aunque también pueden actuar a través de mecanismos independientes del receptor (Gillesby & Zacharewski, 1998; Lutz & Kloas, 1999). En este sentido, la alteración de las funciones normales de las hormonas sexuales puede modificar de manera significativa no sólo la morfogénesis y diferenciación del sistema genital sino que además podría conducir a cambios en el comportamiento de machos y hembras, e incluso a eventos de reversión del sexo.

Dado que la diferenciación sexual en los anfibios está regulada y controlada por mecanismos endócrinos, este proceso podría verse afectado por la exposición a disruptores hormonales, particularmente los estrogénicos. Como ya se ha mencionado, en la mayoría de las especies, la diferenciación sexual ocurre durante la etapa larval acuática, período en el cual pueden estar expuestos a distintos compuestos acumulados en los cuerpos de agua (Kolpin *et. al*, 2002). En este sentido, se ha comprobado que la exposición a sustancias estrogénicas o antiandrogénicas durante el periodo crítico de organización y/o diferenciación gonadal provoca cambios del sexo fenotípico y alteraciones de caracteres sexuales secundarios en renacuajos y juveniles de anfibios (Kloas *et. al*, 1999; Hayes *et. al*, 2002; Mackenzie *et. al*, 2003).

Los alquifenoletoxilados (AFeS) se cuentan entre los tensioactivos no iónicos más ampliamente utilizados por el hombre, y dentro de ellos, los nonilfenoletoxilados (NFeS) constituyen el subgrupo mayoritario. Los AFeS se emplean como ingredientes en la elaboración de detergentes domésticos y presentan además numerosas aplicaciones industriales donde se los utiliza como agentes emulsificantes, dispersantes y solubilizantes. Entre sus usos más difundidos, se pueden mencionar la fabricación de pinturas, agroquímicos,

cosméticos, plásticos, pulpa y papel, así como su empleo en la industria textil y alimenticia (Ferrara *et. al*, 2001; Ying *et. al*, 2002). Los derivados metabólicos de los AFEs son generados en sistemas acuáticos por degradación biológica y frecuentemente persisten aún después del tratamiento de los efluentes. Se ha comprobado que los AFEs y sus intermediarios metabólicos poseen actividad estrogénica mediante la unión a receptores de estrógenos tanto *in vivo* como *in vitro* (Soto *et. al*, 1991; Jobling & Sumpter, 1993; White *et. al*, 1994; Knudsen & Pottinger, 1999; Céspedes *et. al*, 2004). La toxicidad y persistencia en el ambiente de los compuestos derivados supera a la de los compuestos precursores y se considera que la disrupción del sistema endocrino, producida a través de mecanismos que mimetizan las funciones estrogénicas, constituye su mayor efecto adverso sobre las poblaciones animales a mediano y a largo plazo (Ying *et. al*, 2002).

Los AFEs y sus derivados son contaminantes ubicuos del ambiente acuático. El nonilfenol (NF) se encuentra entre los principales productos de su degradación. Debido a su baja solubilidad en agua, el NF se encuentra en mayor concentración en los sedimentos acuáticos que en las aguas superficiales. Asimismo, su carácter lipofílico le confiere la propiedad de acumularse en los tejidos grasos de los organismos acuáticos, es decir que es un compuesto bioacumulable (Ekelund *et. al*, 1990; Naylor, 1992; Ahel *et. al*, 1994). Si bien las vías de exposición a estos contaminantes son diversas, la exposición a través del agua contaminada es probablemente la ruta principal (Ying *et. al*, 2002), y por lo tanto sus efectos adversos pueden manifestarse en mayor grado en animales acuáticos. En la actualidad, es en general reconocido que el NF y sus compuestos asociados son capaces de interferir la actividad estrogénica en diversos organismos acuáticos. En cuanto a sus efectos sobre los anfibios, Mann & Bidwell (2000) observaron alteraciones en el desarrollo de cuatro especies de anuros australianos, luego de la exposición a NFE. Aronzon *et. al* (2014) describieron una gran diversidad de efectos subletales en embriones y larvas de *R. arenarium* expuestos a NF.

Sone *et. al* (2004) evaluaron el efecto del NF en embriones de *X. laevis* reportando retraso en el crecimiento, microcefalia, flexiones del cuerpo, edema y enrollamiento anormal del asa intestinal. En la misma especie, Kloas *et. al* (1999) observaron diferencias significativas en la proporción de hembras entre los tratamientos con NF y el tratamiento control. En base a estos resultados, plantearon la posibilidad de que este compuesto podría causar feminización durante la diferenciación sexual en los anfibios. Si bien se han reportado efectos adversos sobre el desarrollo de las góndadas de algunas especies, es escasa la información referente a los efectos del NF sobre la diferenciación sexual primaria, por lo que los aportes que puedan realizarse en esta temática contribuirán a ampliar los conocimientos sobre los riesgos de este compuesto para los anfibios anuros. La comparación de la respuesta de distintas especies a agentes hormonales exógenos es una información fundamental para estimar el riesgo que corren las poblaciones de anfibios expuestas a los disruptores endócrinos (Mackenzie *et. al*, 2003).

A pesar de que el empleo de los AFEs ha sido prohibido o restringido en numerosas naciones, como en la Unión Europea y Canadá, estos compuestos siguen siendo ampliamente utilizados en numerosos países, incluyendo Argentina. El NF es el compuesto con mayor preponderancia en los ambientes acuáticos y por lo general su concentración en agua superficial es inferior a 10 µg/L (Bennie, 1999; Soares *et. al*, 2008). En nuestro país, si bien la incidencia de los AFEs y sus productos de degradación como parte de la contaminación de los cuerpos de agua y sistemas terrestres asociados es desconocida, es de esperar una contaminación importante de dichos ambientes como consecuencia del uso extendido e irrestricto de estos tensioactivos. A pesar de que son muy escasos los estudios sobre concentraciones de AFEs y sus derivados en matrices ambientales, determinaciones realizadas en muestras de agua superficial de arroyos de zonas urbanizadas e industrializadas han

establecidos concentraciones de hasta 12,2 µg/L de equivalentes tóxicos NF (Babay *et. al*, 2014).

Lo anteriormente expuesto pone de manifiesto la necesidad de profundizar los estudios de la morfogénesis gonadal en diversas especies de anuros y aportar información que contribuya a ampliar los conocimientos de los mecanismos implicados en la diferenciación sexual. Actualmente, se conoce el patrón de gonadogénesis en menos del 1% de las especies de anfibios anuros existentes y el momento de la diferenciación morfológica de las gónadas sigue siendo un tema de debate. Por este motivo, resulta importante estudiar los patrones de desarrollo gonadal y diferenciación sexual en nuevas especies y establecer descripciones precisas de los mismos. Esta información es sumamente importante en estudios ecotoxicológicos que evalúen posibles efectos adversos de contaminantes ambientales sobre el desarrollo gonadal, ya sea utilizándola como línea de base para realizar comparaciones, así como para evaluar períodos críticos en los que una especie puede ser más vulnerable a la acción de plaguicidas, compuestos estrogénicos o productos farmacéuticos (Goldberg, 2015).

4. Especie empleada como modelo experimental: *Physalaemus santafecinus*

Physalaemus santafecinus Barrios, 1965 (Figura 4), conocida como rana enana o ranita maulladora, es un anuro de pequeño tamaño perteneciente a la familia Leptodactylidae. Es una especie que mide hasta 35 mm de longitud hocico-cloaca. Posee cuerpo globoso de aspecto bufonoide, con vientre blanquecino o levemente manchado y dorso ligeramente granular de color grisáceo con patrón de manchas irregulares, predominantemente longitudinales; cabeza redondeada en vista dorsal y hocico romo (Barrios, 1965). Son terrestres, más saltadoras que caminadoras. Habitán pastizales e isletas de montes cercanos a cuerpos de agua, muestran afinidad hacia los suelos arenosos (Zaracho *et. al*, 2011), como así también son habituales en zonas urbanas y ambientes agrícolas (Peltzer *et. al*, 2006; Duré *et.*

al, 2008). Se alimentan principalmente de isópteros, formícidos y ácaros (Duré, 1998; Duré *et. al*, 2008). Su distribución comprende a Paraguay (Brusquetti *et. al*, 2009) y las provincias de Santa Fe, Chaco, Formosa, Corrientes y Entre Ríos, en Argentina (Lavilla *et. al*, 2002; Vaira *et. al*, 2012) (Figura 5).

P. santafecinus es una especie muy similar a *P. biligonigerus*, constituyendo uno de los casos de especies crípticas dentro del género. Ambas especies pueden distinguirse por el canto nupcial, así como por escasos caracteres anatómicos entre los que se destaca el color de los testículo (blanco grisáceo en *P. santafecinus* y negro en *P. biligonigerus*) (Barrios, 1971).

P. santafecinus se reproduce en charchas temporales o lagunas semipermanentes y permanentes durante la estación estival, donde los machos vocalizan flotando desde la superficie del agua principalmente en regiones poco profunda y en áreas libres o con poca vegetación emergente, siendo fácilmente observables. Construye nidos de espuma flotantes o adheridos a pastos bajos (Figura 6). Su fecundidad oscila en alrededor de 500 huevos (Gallardo y Varela de Olmedo, 1992), de una tonalidad gris amarillenta y con un diámetro aproximado de 0,90 mm (Zaracho *et. al*, 2005). Los embriones se desarrollan en el nido y luego de la eclosión las larvas pasan al agua donde completan su desarrollo (Zaracho *et. al*, 2011). A pesar de estar categorizada como "preocupación menor" por la UICN (Lavilla *et. al*, 2004), la contaminación del suelo y aguas por efecto de agricultura, industrias y asentamientos humanos, suponen una amenaza a la conservación de esta especie, al igual que ocurre con la destrucción del hábitat. Debido a sus hábitos biológicos, *P. santafecinus* es una especie que podría estar expuesta y ser susceptible a diversos agentes contaminantes de origen antrópico como agroquímicos, desechos industriales y residuos urbanos. De aquí que los conocimientos que se generen a partir del presente estudio, adicionalmente constituirán información de base para estimar el grado de vulnerabilidad y amenaza para su conservación.

4.1. Clasificación taxonómica de la especie

Phylum: Chordata

Clase: Amphibia

Subclase: Lissamphibia

Orden: Anura

Familia: Leptodactylidae

Subfamilia: Leiuperinae

Género: *Physalaemus*

Especie: *Physalaemus santafecinus*



Figura 4. Ejemplar adulto de *Physalaemus santafecinus*. Escala: 5mm. Fuente: <https://deskgram.cc/explore/tags/AmphibiansConservation>.

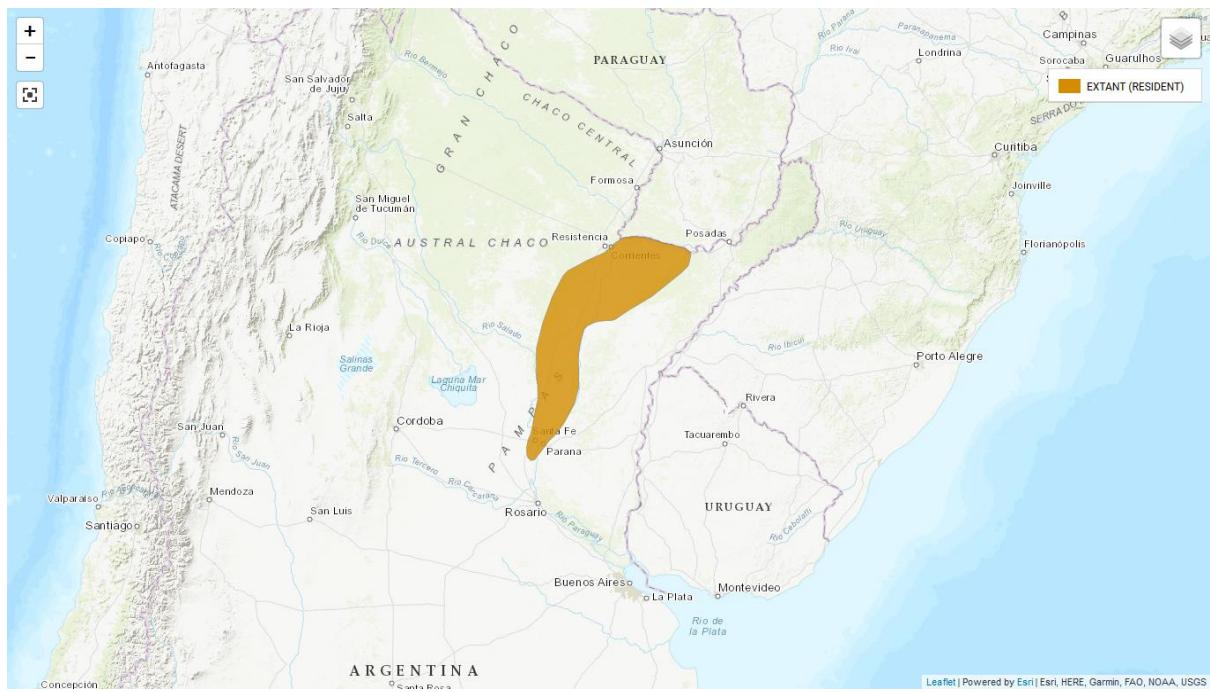


Figura 5. Mapa de distribución geográfica de *Physalaemus santafecinus*. Fuente: IUCN (International Union for Conservation of Nature), Conservation International & NatureServe. 2018. *Physalaemus santafecinus*. The IUCN Red List of Threatened Species.



Figura 6. Nido de espuma de *Physalaemus santafecinus*. Escala: 2 cm. Fuente: fotografía del autor.



OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivos generales

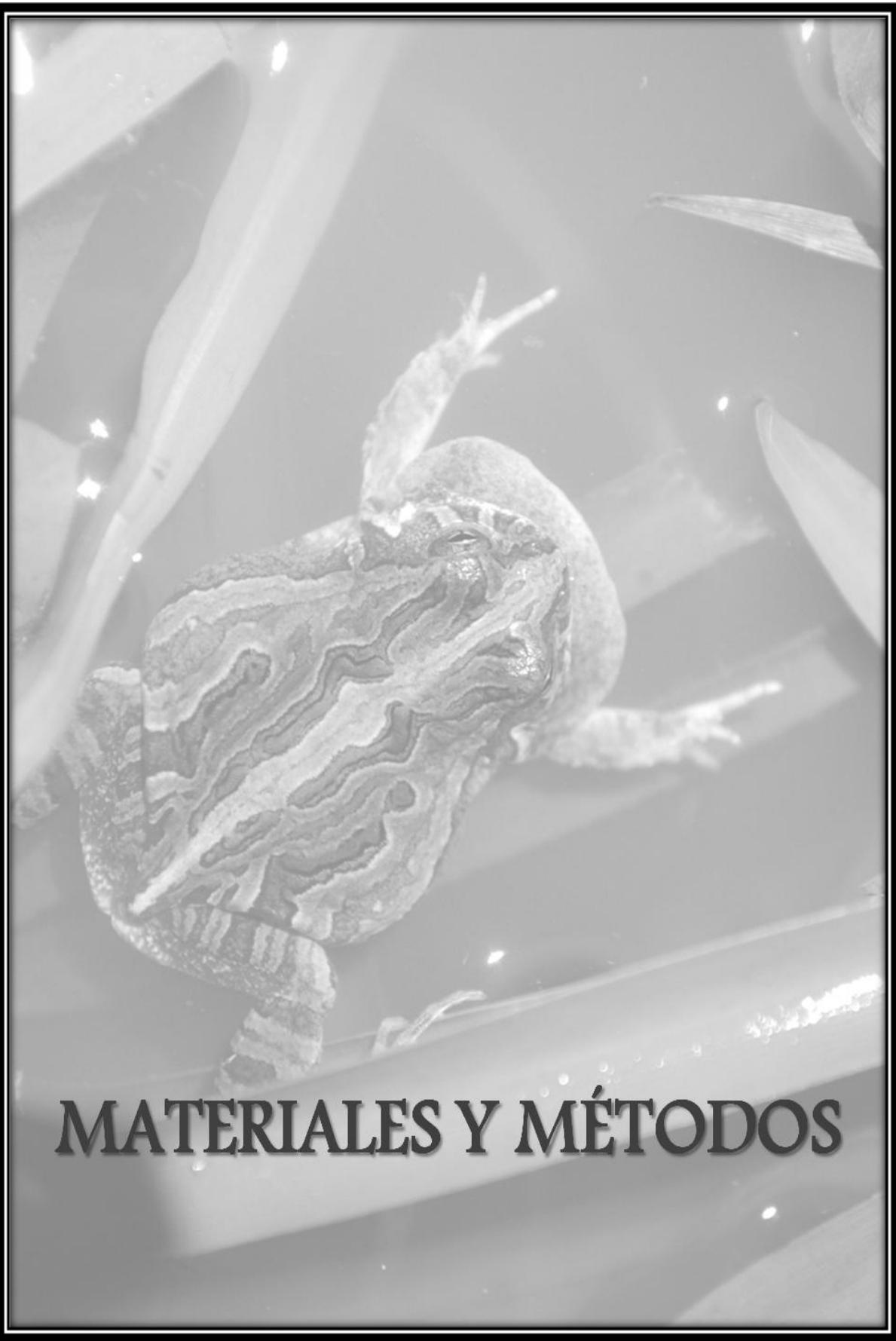
- ✓ Contribuir al conocimiento de los patrones de desarrollo y diferenciación gonadal en anuros Neotropicales.
- ✓ Caracterizar las alteraciones del desarrollo gonadal de anfibios anuros causadas por la exposición a disruptores estrogénicos.

Objetivos particulares

- ✓ Caracterizar el patrón morfogenético de ovarios y testículos durante las etapas larval, metamórfica y juvenil temprana de *P. santafecinus*.
- ✓ Secuenciar los eventos característicos del desarrollo gonadal en cada etapa.
- ✓ Establecer los estadios críticos de organización y diferenciación de ovarios y testículos.
- ✓ Comparar la secuencia organogenética de *P. santafecinus* con lo reportado para otras especies de anuros.
- ✓ Evaluar la toxicidad letal del xenoestrógeno NF en estadios larvales tempranos de *P. santafecinus*.
- ✓ Evaluar mediante bioensayos crónicos los efectos de la exposición a NF y E₂ sobre el desarrollo gonadal y la diferenciación sexual de la especie.
- ✓ Establecer la susceptibilidad de *P. santafecinus* a la acción de disruptores estrogénicos y compararla con lo reportado para otras especie de anuros.

Estos objetivos se plantearon con el fin de poner a prueba las siguientes **hipótesis**:

- ✓ Las gónadas de *P. santafecinus* se diferencian durante el período larval siguiendo un patrón diferenciado.
- ✓ La exposición a disruptores endócrinos estrogénicos afecta el desarrollo gonadal y la diferenciación sexual de la especie.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estudio de la morfogénesis del sistema urogenital

1.1. Tareas de campo

1.1.1. Obtención del material de estudio

Se colectaron puestas de *Physalaemus santafecinus* durante el periodo reproductivo, entre los meses de octubre y abril del periodo 2012 - 2017. Para ello se realizaron salidas de campo dentro de las dependencias del Campus Universitario Corrientes de la Universidad Nacional del Nordeste (27°28'4"S; 58°46'58"O), Corrientes, Argentina, luego de eventos de lluvia. Las puestas fueron localizadas a partir de la identificación de los nidos de espuma, colectadas con copo de mano y trasladadas inmediatamente al laboratorio (Figura 7).

El material biológico analizado para la descripción del desarrollo normal del sistema urogenital se encuentra depositado en la Colección Herpetológica de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNEC 11217-11226).

1.2. Tareas de laboratorio

1.2.1. Cría en cautiverio

Los nidos de espuma con embriones en desarrollo fueron mantenidos en el laboratorio a temperatura ambiente (24°C-27°C), en bateas plásticas de 5 L con agua corriente declorada. Luego de la eclosión, las larvas fueron alimentadas *ad libitum* con alimento granulado para peces (TetraColor Tropical Granules) (Figura 8). En el apéndice I se presenta la composición del alimento empleado.



Figura 7. a, b) Sitio de muestro Campus Universitario; c, d) detalle de la ubicación y el tamaño de los nidos de espuma de *Physalaemus santafecinus*.



Figura 8. a) Nido de espuma post-recolección en batea plástica. b) Detalle de las larvas de *Physalaemus santafecinus*

1.2.2. Selección y análisis de ejemplares

Se fijaron ejemplares en distintos estadios del desarrollo dentro de los períodos premetamórfico, prometamórfico y clímax metamórfico. Para ello, los ejemplares fueron previamente sacrificados por inmersión en una solución de benzocaína (100 mg/L). La fijación se realizó en formaldehido 10% para el análisis del sistema urogenital mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y en solución de Bouin para el análisis histológico de las gónadas. En ambos casos, se realizó un corte en la región abdominal a fin de optimizar la penetración del fijador. El estadio del desarrollo de los ejemplares se estableció en base a la clasificación propuesta por Gosner (1960). Asimismo, aproximadamente 50 individuos se mantuvieron luego del clímax metamórfico en recipientes con arena/tierra húmeda y alimentación a base de termitas, para el análisis del sistema urogenital en la etapa juvenil.

Los ejemplares fueron medidos con ocular micrométrico incorporado a lupa estereoscópica (Leica ES2) y calibre digital de 0,01 mm de precisión (ESSEX) (Figura 9a, b).

Los datos registrados fueron:

LHC: longitud hocico-cloaca

LC: longitud de la cola

1.2.3. Análisis del sistema urogenital por MEB

Las larvas fijadas en distintos estadios del desarrollo fueron disecadas bajo lupa estereoscópica a fin de localizar el complejo riñón-gónada. El mismo fue aislado y procesado según técnicas convencionales para MEB: deshidratación en soluciones de concentración creciente de acetona, secado a punto crítico y metalización con oro-paladio. En el caso de los especímenes de menor tamaño, se procesó el cuerpo entero del ejemplar, eliminando el tubo digestivo. Las observaciones se realizaron en un microscopio JEOL JSM-5800 LV

perteneciente al servicio de microscopía de la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE (Figura 9c).

Se caracterizó la topografía y morfología del complejo riñón-gónada en diferentes estadios del desarrollo larval y metamórfico de la especie, así como en individuos de 30 días postmetamorfosis. Se examinaron cinco ejemplares de cada estadio y de cada puesta con el fin de minimizar las diferencias morfológicas individuales dentro de una misma puesta y entre las mismas.



Figura 9. a) Calibre digital ESSEX; b) Lupa estereoscópica Leica ES2; c) Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-5800 LV.

1.2.4. Análisis histológico de las gónadas

El complejo riñón-gónada de tres ejemplares de cada estadio del desarrollo y de cada sexo (en la etapa posterior a la diferenciación sexual a nivel macroscópico) fue aislado y procesado según un protocolo convencional para preparaciones histológicas: deshidratación en soluciones de etanol de concentración creciente (70%, 80%, 96%) y alcohol butílico y posterior inclusión del material en parafina (Figura 10a, b). Las piezas fueron orientadas para

realizar cortes transversales con un micrótomo rotatorio ARACANO KD-1508A (Figura 10c). Las secciones de 7 μm de espesor fueron montadas y coloreadas con coloración convencional de hematoxilina-eosina (H-E) (Figura 10d). Las secciones histológicas fueron observadas y fotografiadas bajo un microscopio óptico Leica DM500 con una cámara digital Leica ICC50HD acoplada al mismo. La captura y el procesamiento de las imágenes se realizó con el programa ImageJ (Figura 10e).

Se analizó la estructura histológica de las góndadas en diferentes estadios del desarrollo larval y metamórfico y se caracterizaron los eventos morfogenéticos de gonadogenesis, incluyendo la formación inicial de los esbozos gonadales, la diferenciación de ovarios y testículos y el desarrollo ovárico y testicular hasta el fin del clímax metamórfico.



Figura 10. Protocolo de preparación histológica. **a)** Baños de deshidratación en alcoholes de gradación creciente; **b)** Inclusión del material en parafina; **c)** Cortes con micrótomo rotatorio manual tipo Spencer; **d)** Coloración convencional (H-E); **e)** Observación y registro de imágenes.

2. Evaluación de los efectos de la exposición a nonilfenol

La droga utilizada en los bioensayos fue 4-nonilfenol (NF) (Aldrich, pureza 97%) (Figura 11).

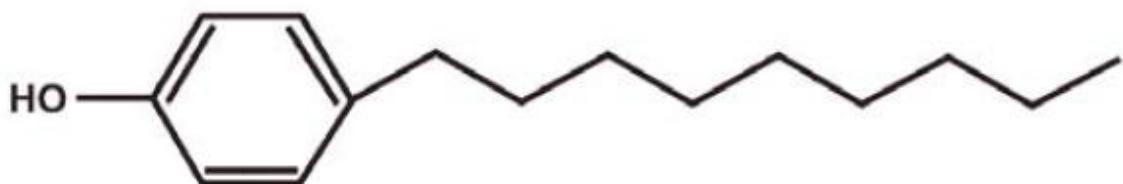


Figura 11. Estructura y formula molecular del 4-nonylphenol ($C_{15}H_{24}O$).

Se realizaron dos tipos de bioensayos:

- Exposición subcrónica hasta las 168 h, para evaluación de efectos letales del NF.
- Exposición crónica hasta el clímax metamórfico, para evaluación de efectos subletales del NF.

2.1. Bioensayos subcrónicos de toxicidad letal

Para los bioensayos de toxicidad letal, se siguieron los lineamientos de la Norma IRAM 29112 (2008): Calidad ambiental – Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce. Método semiestático.

En primer lugar se realizó un ensayo preliminar de búsqueda de rango a fin de determinar el intervalo de concentraciones a utilizar en el ensayo definitivo. Para ello, se empleó una serie de seis concentraciones en progresión geométrica con un factor de concentración de 2 a partir de una concentración de 10 µg/L de NF. El rango de concentraciones se seleccionó en base a datos de toxicidad letal aguda de alquilfenoles para larvas de anfibios anuros disponibles en la literatura científica. Se preparó una solución madre de 5 mg/mL de NF en acetona (calidad analítica), la cual fue almacenada en oscuridad a 4°C en frasco color caramelo. Como recipientes de ensayo se utilizaron cápsulas de Petri con 150 mL de agua corriente declorada. En cada tratamiento, se adicionó al agua de ensayo el volumen de solución madre necesaria para obtener la concentración final deseada. Se realizaron dos tratamientos control, uno con acetona al 0,01% y otro con agua declorada únicamente. En cada recipiente se colocaron 10 larvas de tamaño uniforme en estadio 25 (E.25). La exposición tuvo una duración de 96 h, renovándose diariamente el volumen total de solución de ensayo. La mortalidad fue evaluada cada 24 h, a partir de la ausencia de movimiento y/o el cambio de coloración y aspecto general de los ejemplares. Los individuos muertos fueron retirados y descartados. Durante el transcurso del bioensayo, las larvas fueron alimentadas con alimento para peces 5 h antes de la renovación del medio.

Siguiendo la misma metodología, se realizaron los bioensayos definitivos, en los que se estableció un rango de cinco concentraciones de NF en base a los resultados del ensayo preliminar. La duración de la exposición fue de 168 h. Las concentraciones de NF seleccionadas estuvieron comprendidas entre 125 µg/L - 225 µg/L, valores correspondientes a la concentración más alta no letal y a una concentración que producía la muerte de todas las larvas al cabo de 168 h de exposición, respectivamente. Se preparó una solución madre de 5 mg/mL de NF en acetona y a partir de la misma se adicionó el volumen necesario para obtener la concentración final correspondiente a cada tratamiento. Se realizaron dos tratamientos control, uno únicamente con agua declorada y el otro con acetona a la máxima concentración de ensayo (0,005%). Cada tratamiento se realizó por triplicado (Figura 12a). En cada recipiente se colocaron 10 larvas de tamaño uniforme en E.25. La relación biomasa/volumen en los recipientes de ensayo fue menor que 1 g/L. Cada 24 h, se evaluó la mortalidad y se renovó el volumen total de solución de ensayo. Las larvas fueron alimentadas durante el bioensayo con alimento para peces provisto 5 h antes del reemplazo del medio.

Los datos de mortalidad fueron analizados por el método Probit (Finney, 1971) mediante el empleo del programa Probit Analysis, versión 1.5 (USEPA, 2012) con el fin de estimar las concentraciones que producen 10%, 50% y 90% de mortalidad (concentraciones letales CL₁₀, CL₅₀ y CL₉₀) a distintos tiempos de exposición. A partir de dichos valores se graficaron las curvas que representan los perfiles de toxicidad (curvas TOP).

| La concentración letal incipiente se estimó, en base a los valores de CL₅₀, como el punto en el cual la curva 1/CL₅₀ vs tiempo de exposición se hace paralela al eje de las X, según Newman (2015). Asimismo, se calculó la concentración umbral de letalidad, según Metcalfe (2012), como la media geométrica de X₁ y X₂ ($CU = \sqrt{X_1 \cdot X_2}$), donde:

X₁= menor CL₅₀ registrada en el bioensayo.

X₂= concentración más alta en la que se registra una mortalidad < 50%.

A partir de las concentraciones ensayadas, se estimaron los parámetros LOEC (concentración más baja que produce efecto) y NOEC (concentración más alta que no produce efecto).

Además de la mortalidad, se registraron efectos subletales tales como alteraciones morfológicas, depigmentación y cambios en el comportamiento (aletargamiento, movimientos erráticos, pérdida del equilibrio).

Los bioensayos se realizaron en un ambiente con temperatura de 24,5±1,5°C y fotoperíodo de 12:12 h. Los ejemplares fueron aclimatados a las condiciones de laboratorio durante la semana previa a su realización. Durante las 24 h previas al inicio del bioensayo, se verificó que no aparecieran síntomas de enfermedad ni mortalidad en más del 10% de los organismos. Asimismo, los datos no fueron considerados en los casos en que la mortalidad en los controles fue superior al 10%. En el apéndice II se muestra la planilla utilizada para efectuar los registros durante los bioensayos.

2.2. Bioensayo crónico de toxicidad subletal

Se realizó un bioensayo crónico a fin de evaluar el efecto de la exposición a NF sobre el desarrollo gonadal y la diferenciación sexual de *P. santafecinus*. Las concentraciones nominales ensayadas fueron 1 µg/L, 10 µg/L y 100 µg/L NF, las cuales abarcan desde niveles ambientalmente relevantes (Ying *et. al*, 2002; Babay *et. al*, 2014) hasta concentraciones elevadas subletales. Asimismo, se realizó un tratamiento con 17β-estradiol (E₂) en una concentración de 10 µg/L como control positivo de efecto feminizante, y dos tratamientos control, uno con agua declorada y otro con acetona a la máxima concentración de ensayo (0,005%). Cada tratamiento se efectuó por triplicado en cápsulas de Petri con 150 ml de solución de ensayo (Figura 12b). En cada recipiente se colocaron 10 larvas en E.25. La

exposición se realizó bajo un diseño semiestático con renovación del volumen total de los recipientes cada 48 h. Las soluciones madre de NF y E₂ se prepararon en acetona (calidad analítica) cada 15 días y se almacenaron en oscuridad a 4°C durante el transcurso del bioensayo. Al realizar cada recambio, se adicionó al agua de ensayo el volumen de solución madre necesario para obtener la concentración final correspondiente a cada tratamiento.

El bioensayo se realizó en un ambiente con temperatura de 24,5±1,5°C y fotoperíodo de 12:12 h. La posición de los recipientes fue modificada semanalmente a fin de minimizar los efectos de la ubicación espacial sobre el desarrollo. Las larvas fueron alimentadas durante el transcurso del bioensayo con alimento para peces suministrado 24 h antes de la renovación del medio. De este modo, se alternaban los días de alimentación con los días de recambio de las soluciones de ensayo. La exposición se prolongó durante todo el período larval y se interrumpió cuando al menos el 85% de los ejemplares de cada recipiente había completado la metamorfosis. Durante el transcurso del bioensayo, se registraron la mortalidad y la incidencia de anomalías en el desarrollo (morfológicas y de comportamiento). Asimismo, se registró el día en que cada individuo alcanzó el estadio 46 (final de la metamorfosis), determinándose en ese momento la LHC. Posteriormente, cada individuo fue sacrificado por inmersión en una solución de benzocaína y procesado para el análisis macroscópico y microscópico de las gónadas. El fenotipo sexual de cada ejemplar fue establecido a partir del análisis histológico de las gónadas y clasificado como hembra, macho o intersexo (definido por la presencia simultánea de células germinales de ambos sexos). A partir de dichos registros se determinó la proporción de sexos correspondiente a cada tratamiento. En el apéndice II se muestra la planilla utilizada para efectuar los registros durante el bioensayo.

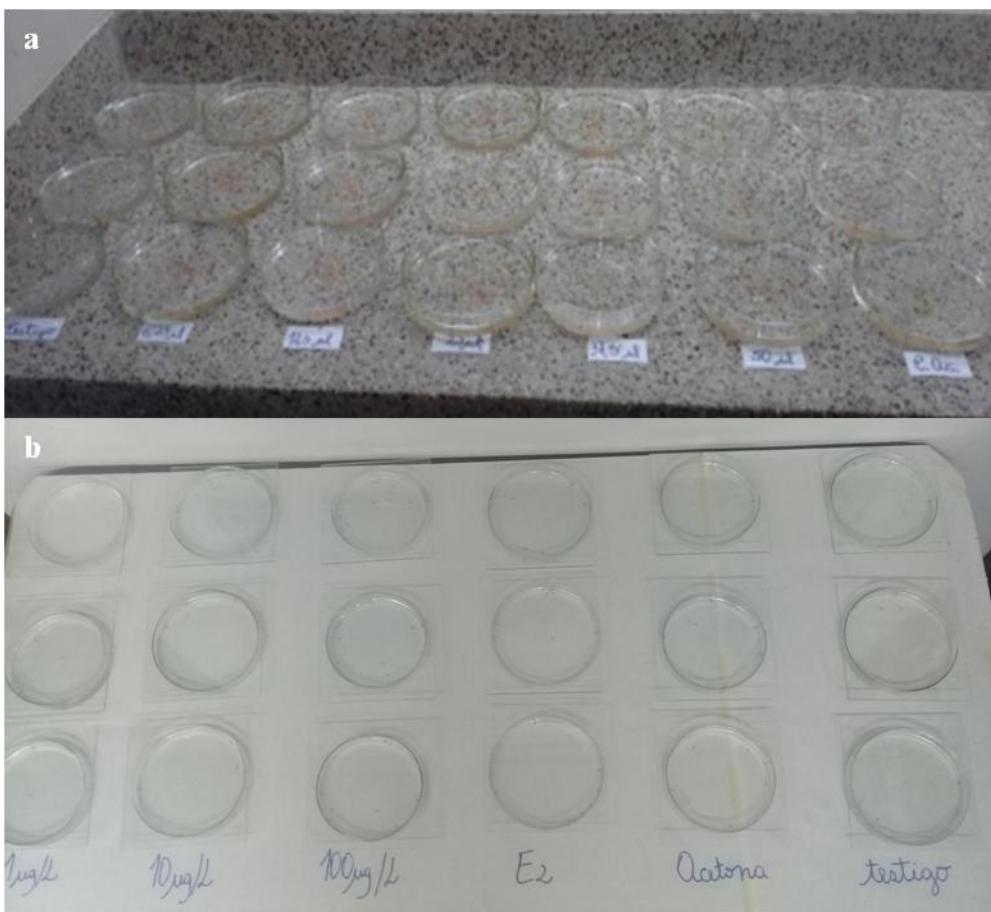


Figura 12. Bioensayos de toxicida letal (a) y subletal (b). Cada tratamiento se realizó por triplicado empleando cápsulas de Petri con 150 mL de solución de ensayo.

2.3. Análisis estadístico

Para la comparación de los valores de concentraciones letales de NF, se consideró una diferencia significativa cuando la relación CL mayor/CL menor superó el valor crítico correspondiente recomendado por APHA (1992).

Los valores de mortalidad luego de 168 h de exposición fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguida de comparaciones post-hoc de Tukey para estimar los valores NOEC (concentración más alta que no produce mortalidad significativa) y LOEC (concentración más baja que produce mortalidad significativa).

El tamaño corporal (LHC) de los ejemplares y el tiempo hasta finalizar la metamorfosis correspondiente a los distintos tratamientos fueron comparados mediante

ANOVA de una vía seguida de comparaciones post-hoc de Tukey. Los porcentajes de mortalidad y las proporciones de sexo fueron cotejados mediante la prueba exacta de Fisher.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Statistica 7.0. El nivel de significancia estadística para todas las pruebas se estableció con $p<0,05$.

2.4. Medición de las concentraciones reales de NF en el bioensayo crónico

A fin de evaluar la evolución temporal de las concentraciones reales de NF en el agua de ensayo, se prepararon recipientes con concentraciones nominales de 0 $\mu\text{g/L}$ (control de solvente), 10 $\mu\text{g/L}$ y 100 $\mu\text{g/L}$ NF, por duplicado. A partir de cada recipiente, se tomó una muestra de 50 ml del agua de ensayo, a las 0 h, 24 h y 48 h. Las muestras fueron preservadas mediante el agregado de 0,5 ml de formaldehido 40% v/v, almacenadas a 4°C en frascos de vidrio envueltos en papel de aluminio y procesadas durante la misma semana en que fueron obtenidas.

Las muestras correspondientes a la concentración de 100 $\mu\text{g/L}$ fueron directamente analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector de fluorescencia molecular, mientras que las correspondientes a la concentración de 10 $\mu\text{g/L}$ fueron previamente procesadas según el protocolo que se detalla a continuación:

- 1) Extracción en fase sólida en columnas de octadecil sílice (C-18) (Thermo Scientific, USA).
 - a) Acondicionamiento de la columna con 5 ml de metanol.
 - b) Equilibrio con 5 ml de agua miliQ.
 - c) Percolado de la muestra de agua con un flujo de 5 ml/min, mediante aplicación de vacío.
 - d) Elución de interferencias con 5 ml de agua miliQ.
 - e) Secado mediante aplicación de vacío durante 20 min.
 - f) Elución del analito con 5 ml de metanol, por gravedad.

Para armar las curvas de calibración se prepararon soluciones patrón de NF adicionando cantidades establecidas de una solución madre del compuesto al agua de ensayo. Las soluciones correspondientes a la curva de calibración para la concentración de 10 µg/L fueron procesadas en forma inmediata, del mismo modo que el indicado anteriormente.

El sistema cromatográfico empleado consistió en una bomba Spectra Series P-200 (Thermo Separation Products, USA) y un detector Linear Fluor LC-305 (Linear Instruments, USA), con longitudes de onda de excitación y emisión de 230 y 300 nm, respectivamente. Se utilizó una columna de fase reversa de C-8 (250 x 4,6 mm, 5 µm, Grace, USA). La fase móvil consistió en una mezcla de metanol:agua (80:20% v/v) a un caudal de 1 ml/min. El volumen de extracto inyectado fue de 50 µl. Los datos fueron adquiridos y analizados con el programa EZChrom 6.8. Para la cuantificación se construyeron curvas de calibración de área de pico en función de la concentración, empleando el método de cuadrados mínimos. Las concentraciones de NF en las muestras fueron calculadas por interpolación sobre la curva de calibración, a partir del área correspondiente a cada una de ellas. Con los valores de las distintas réplicas, se determinaron las medias y las desviaciones estándar de cada concentración a los tiempos establecidos.

3. Consideraciones éticas

Los animales empleados en esta investigación fueron tratados según los principios establecidos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (ILAR USA, 2011).



RESULTADOS

1. Desarrollo del sistema urogenital

1.1. Mesonefros

El riñón mesonéfrico comienza a esbozarse a partir del E.24-25. En el E.25, se observa bajo lupa estereoscópica una masa mesenquimatosa en la región dorsal posterior de la cavidad abdominal, próxima a la cloaca, en el lado derecho de la larva. En el lado izquierdo no se reconoce, bajo lupa estereoscópica, ninguna estructura comparable. El análisis con MEB revela la presencia de dos estructuras mesonéfricas, una derecha y otra izquierda, siendo la primera de mayor tamaño. La porción posterior de la masa mesonéfrica derecha es globosa, a diferencia de la porción anterior que se presenta comprimida lateralmente. La masa mesonéfrica izquierda no presenta diferencias apreciables en cuanto al diámetro lateral en toda su extensión. Estas características se presentan hasta aproximadamente el E.29 (Figura 13a-c). En los estadios subsiguientes, las masas mesonéfricas crecen en sentido antero-posterior (Figura 13d) manteniendo una clara diferencia de tamaño hasta aproximadamente el E.38. A partir del E.44, ambos riñones mesonéfricos muestran un tamaño semejante (Figura 13e).

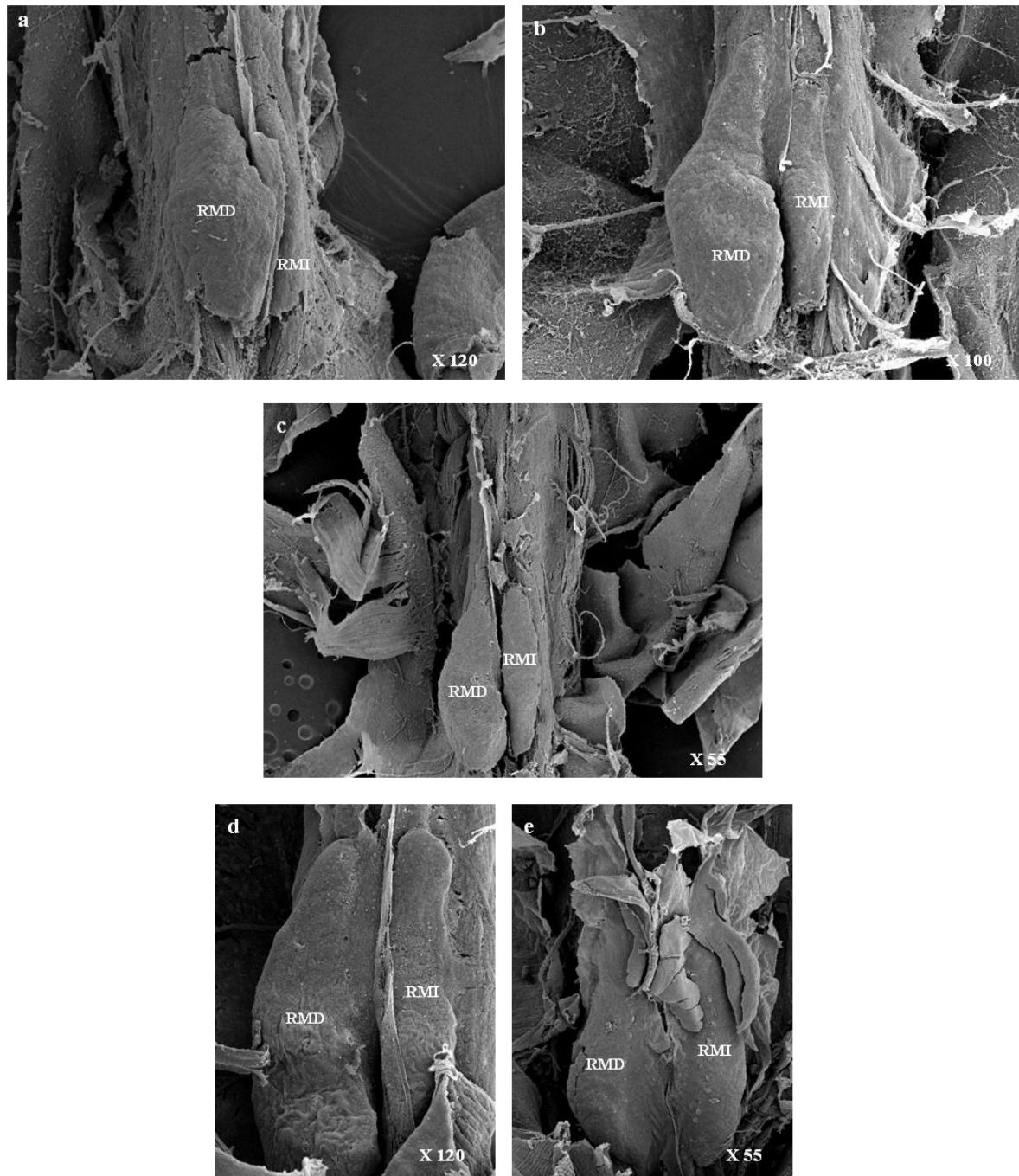


Figura 13. Desarrollo del riñón mesonéfrico de *Physalaemus santafecinus*. MEB. **a)** E. 25; **b)** E. 27; **c)** E. 29; **d)** E. 33; **e)** E. 44. **RMD:** riñón mesonéfrico derecho; **RMI:** riñón mesonéfrico izquierdo.

1.2. Cuerpos grados

A partir del E.25, se observan esbozos de cuerpos grados en el lado izquierdo de la cavidad abdominal, como masas de tejido ubicadas lateralmente al mesenterio dorsal, a la altura del bazo. Inicialmente son reconocibles hasta cuatro esbozos conteniendo células globosas (Figura 14a-c), de los cuales el posterior crece y se ramifica progresivamente, formando en estadios subsiguientes una estructura de aspecto digitiforme (Figura 14d, e). A partir del E.38, se observan los esbozos de los cuerpos grados del lado derecho, también como masas de tejido formadas por células globosas, en posición anterior a la gónada (Figura 14f). Al final del periodo metamórfico, se evidencia una notable asimetría en el grado de desarrollo de ambos cuerpos grados, siendo los del lado izquierdo de mayor tamaño que el derecho. En individuos de 30 días postmetamorfosis, los cuerpos grados se observan como estructuras de coloración blanquecina que presentan múltiples digitaciones y posición más o menos equivalente, aunque los del lado derecho siguen siendo de menor tamaño que los del lado izquierdo (Figura 14g).

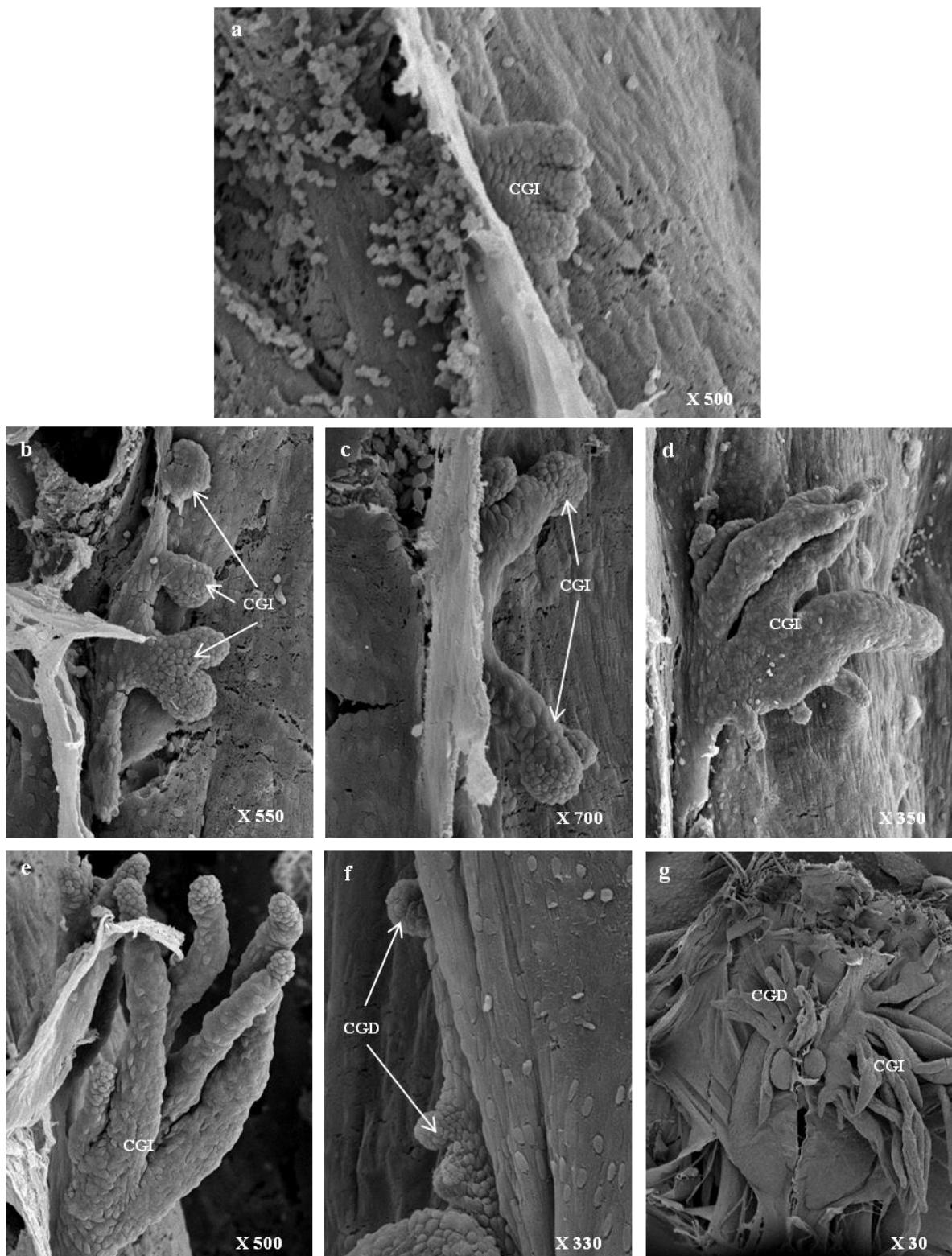


Figura 14. Desarrollo de los cuerpos grasos de *Physalaemus santafecinus*. MEB. a) E. 25; b), c) E. 27; d) E. 33; f) E. 38; g) 30 días postmetamorfosis. CGD: cuerpo graso derecho; CGI: cuerpo graso izquierdo.

1.3. Gónadas

Bajo MEB, los esbozos gonadales derecho e izquierdo se observan a partir del E.25 como delgados cordones de tejido ubicados en la región dorso-medial de la cavidad abdominal, entre los cuerpos grasos y el tejido mesonéfrico. En este estadio no es posible identificar, a nivel anatómico, el esbozo gonadal como masculino o femenino (Figura 15a). A partir del E. 29, se distinguen los ovarios por la presencia de lobulaciones en el primordio gonadal (Figura 15b), mientras que los testículos se reconocen como un par de estructuras globosas con forma de clava (Figura 15c). En el E.38, los ovarios se observan como masas alargadas con cuatro lóbulos, ubicados en la región ventro-medial anterior del mesonefros (Figura 15d). Los lóbulos ováricos aumentan de tamaño progresivamente en los estadios subsiguientes y hacia el clímax metamórfico se hacen contorneados e irregulares (Figura 15f). En contraste, los testículos muestran un escaso desarrollo y permanecen visibles como un par de estructuras ovoides y de contorno liso (Figura 15e, g). Hacia el fin de la metamorfosis, se observa bajo lupa estereoscópica la presencia de pigmentación gris oscura en las gónadas de ambos sexos, siendo esta más pronunciada en los testículos que en los ovarios (Figura 16a, b). En los ovarios es posible distinguir de 5 a 6 lóbulos, con pequeños oocitos previtelogénicos en su interior (Figura 16a). En individuos de 30 días postmetamorfosis, las gónadas de ambos sexos muestran un desarrollo pronunciado y son fácilmente reconocibles entre los cuerpos grasos y los riñones mesonéfricos (Figura 15h, i). Los ovarios muestran lobulaciones muy desarrolladas (Figura 15h) mientras que los testículos conservan su forma oval, siendo en ocasiones uno de mayor tamaño que el otro (Figura 15 i).

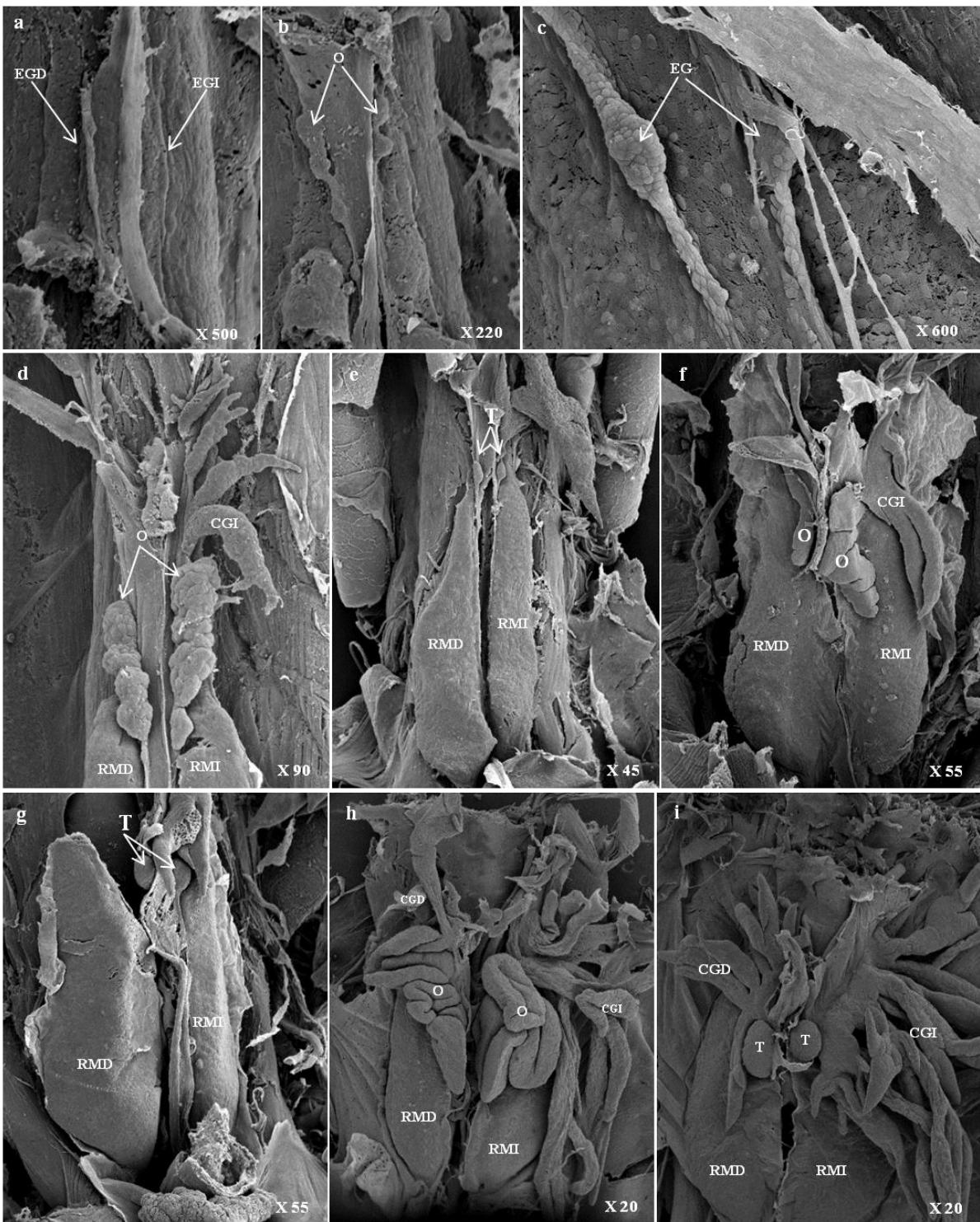


Figura 15. Desarrollo gonadal de *Physalaemus santafecinus*. MEB. **a)** E. 25; **b)** E. 29 (hembra); **c)** E. 29 (macho); **d)** E. 38 (hembra); **e)** E. 40 (macho); **f)** E. 44 (hembra); **g)** E. 44 (macho); **h)** 30 días postmetamorfosis (hembra); **i)** 30 días postmetamorfosis (macho). **CGD:** cuerpo graso derecho; **CGI:** cuerpo graso izquierdo; **EGD:** esbozo gonadal derecho; **EGI:** esbozo gonadal izquierdo; **O:** ovario; **RMD:** riñón mesonéfrico derecho; **RMI:** riñón mesonéfrico izquierdo; **T:** testículo.

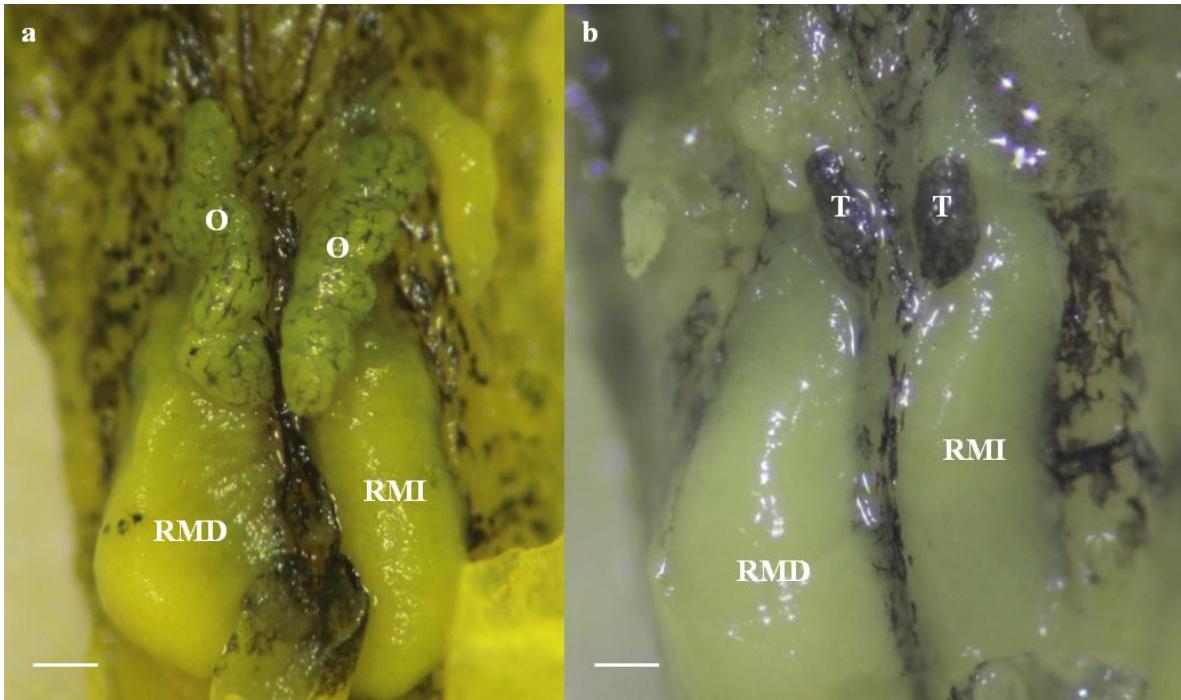


Figura 16. Complejos riñón-gónada de *Physalaemus santafecinus*. Microscopio estereoscópico. **a)** E. 46 (hembra); **b)** E. 46 (macho). **O:** ovario; **RMD:** riñón mesonéfrico derecho; **RMI:** riñón mesonéfrico izquierdo; **T:** testículo. El color amarillento se debe al fijador. Escala: 200μm.

1.4. Histología gonadal

1.4.1. Gónada indiferenciada

En larvas en E.27, se observan en corte transversal dos pequeños esbozos gonadales a ambos lados de la vena cava posterior, formados por una o dos células germinales, voluminosas, con núcleo lobulado translúcido, rodeadas por células somáticas pequeñas con núcleo basófilo (Figura 17a). Posteriormente, en el E.31, la gónada indiferenciada aumenta de tamaño y adquiere una estructura córtico-medular. La corteza está formada por células germinales, asociadas a células somáticas de sostén de posición periférica, mientras que la médula está formada únicamente por células somáticas (Figura 17b).

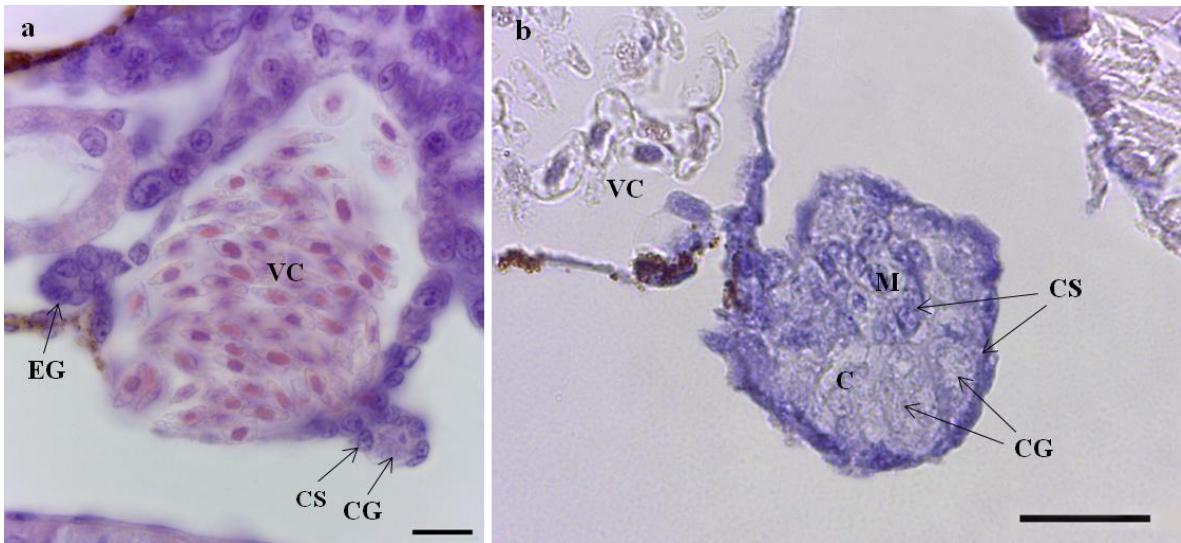


Figura 17. Gónada indiferenciada de *Physalaemus santafecinus*. MO. **a)** E. 27; **b)** E.31. **C:** corteza; **CG:** célula germinal; **CS:** célula somática; **EG:** esbozo gonadal; **M:** médula; **VC:** vena cava posterior. Escala: 10 μ m.

1.4.2. Diferenciación del ovario

Los primeros signos histológicos de diferenciación ovárica se visualizan en el E.34 a partir de la formación de la cavidad ovárica y el inicio de la actividad meiótica de las células germinales. La cavidad ovárica se forma en la zona medular y es discontinua a lo largo del ovario, por lo cual en algunas secciones transversales se visualiza la cavidad, mientras que en otras el ovario se presenta como una estructura maciza (Figura 18a, b). El inicio de la meiosis se evidencia por la aparición de grupos de oocitos meióticos tempranos en un mismo estadio de la oogénesis, separados unos de otros por células somáticas de ubicación periférica. Estas estructuras se denominan cistos de oocitos en etapas tempranas de la meiosis y las células somáticas periféricas reciben el nombre de células prefoliculares (Figura 18b). Las oogonias aparecen como células aisladas con núcleo lobulado translúcido, individualmente rodeadas por células somáticas de sostén (Figura 18a). En el E.36 se observa un incremento del tamaño de la cavidad ovárica en ciertas secciones, mientras que en otras se visualiza la estructura córtico-medular previamente descripta. La cavidad ovárica se encuentra tapizada por células somáticas medulares que forman un epitelio a su alrededor (Figura 18c). Hacia el fin de la

prometamorfosis (E.40), se evidencia el inicio de la foliculogénesis. Los folículos ováricos se forman cuando los oocitos que conforman un cisto alcanzan el estadio de diplotene y son individualmente rodeados por las células prefoliculares, las cuales pasan a denominarse células foliculares. Cada folículo está constituido por un oocito en crecimiento primario y células foliculares circundantes. Los núcleos de los oocitos en diplotene temprana son esféricos y de mayor tamaño que en los estadios previos de la meiosis, mientras que el citoplasma se torna ligeramente basófilo (Figura 18d). Durante el clímax metamórfico, se observan numerosos folículos en desarrollo en el interior del ovario. Los oocitos en crecimiento primario alcanzan hasta 40 µm de diámetro y se caracterizan por poseer un citoplasma basófilo y un núcleo esférico a ovalado, de gran tamaño, con múltiples nucléolos periféricos. Dichos oocitos se encuentran arrestados en diplotene de la profase meiótica. En el carioplasma, se visualizan los cromosomas plumulados como hebras de cromatina condensada que forman un retículo. En la mayor parte las secciones, la cavidad ovárica se encuentra muy reducida debido al gran número de folículos en desarrollo. En el tejido intersticial presente entre los folículos se visualizan escasos cromatóforos de coloración amarronada. En la región periférica del ovario se observan oogonias aisladas y cistos con oocitos en etapas tempranas de la meiosis (Figuras 18e, f).

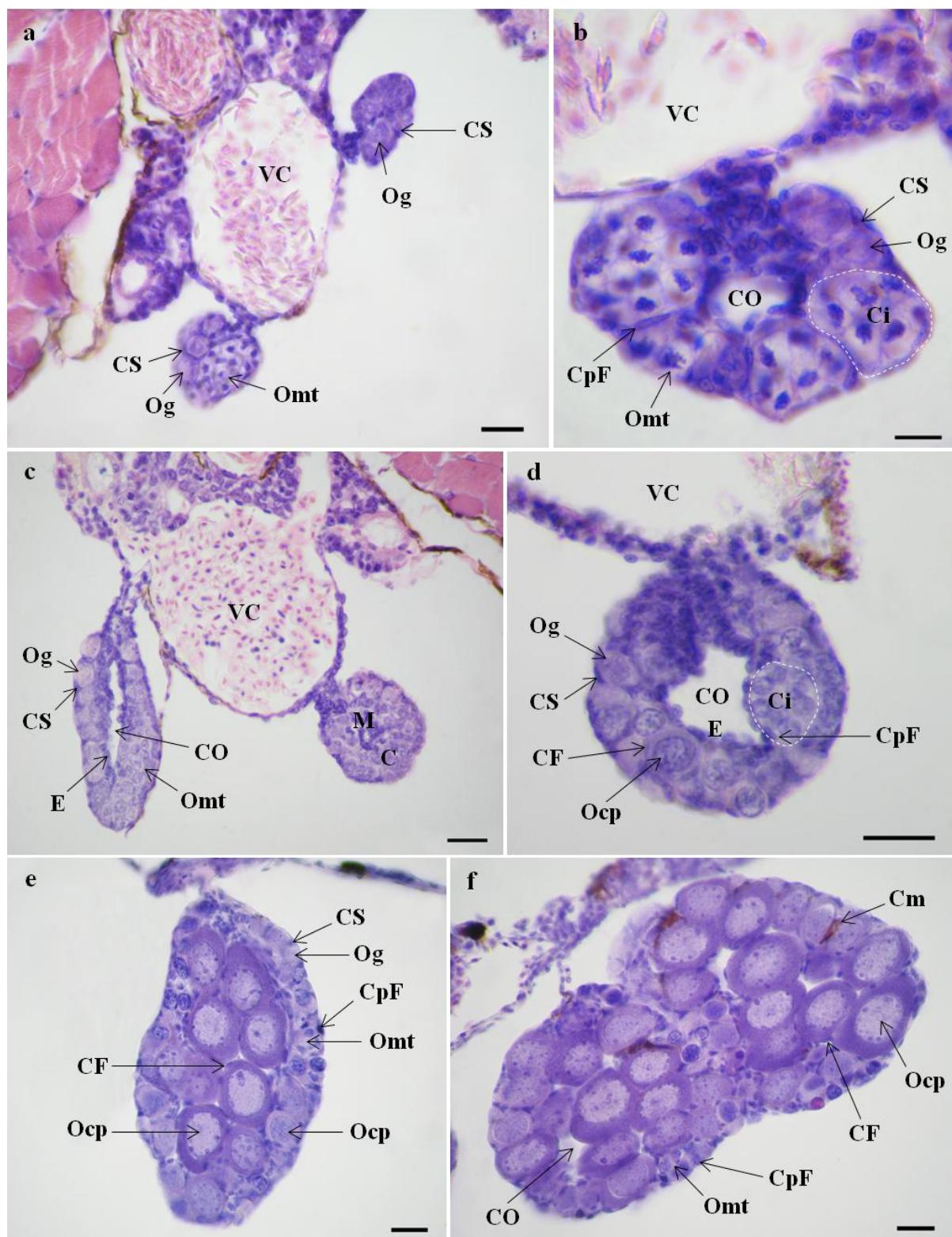


Figura 18. Diferenciación y desarrollo del ovario de *Physalaemus santafecinus*. MO. **a)** E.34; **b)** E.34; **c)** E.36; **d)** E.40; **e)** E.43; **f)** E.46. **C:** corteza; **Ci:** cisto; **Cm:** cromatóforos; **CF:** célula folicular; **CpF:** célula prefolícular; **CS:** célula somática de sostén; **CO:** cavidad ovárica; **E:** célula epitelial; **M:** médula; **Og:** oogonia; **Ocp:** oocito en crecimiento primario; **Omt:** oocito meiótico temprano; **VC:** vena cava posterior. Escalas: 20 μm (a, c, d, e, f); 10 μm (b).

1.4.3. Diferenciación del testículo

En larvas en E.36, los testículos se presentan como estructuras macizas formadas por células germinales y células somáticas con distribución homogénea, sin distinguirse una zona cortical y otra medular (Figura 19a). En el E.39, se incrementa el número de células germinales y de células somáticas observadas en cortes transversales. Las células germinales (espermatoцитas) presentan un núcleo lobulado y voluminoso, con cromatina laxa, y se encuentran asociadas a células somáticas (células de Sertoli) que poseen núcleos picnóticos de forma variable (Figura 19b). En los E. 41-44, se distinguen tabiques de células intersticiales planas entre los grupos de espermatoцитas y células de Sertoli, delimitando los primeros lóbulos o cordones seminíferos. El tejido intersticial que separa los lóbulos seminíferos se desarrolla desde la periferia hacia el centro y es reconocible por la presencia de cromatóforos de coloración amarronada. En la región externa del testículo se observan células epiteliales planas (Figura 19c, d, e). Al final de la metamorfosis (E.46), los testículos presentan lóbulos seminíferos más desarrollados que contienen numerosas espermatoцитas, rodeadas por células de Sertoli. El tejido intersticial que delimita los lóbulos seminíferos se engrosa y presenta una abundante cantidad de cromatóforos (Figura 19f).

En la Figura 20 se representan las características histológicas más sobresalientes del desarrollo gonadal y la diferenciación sexual de *Physalaemus santafecinus* en escala temporal.

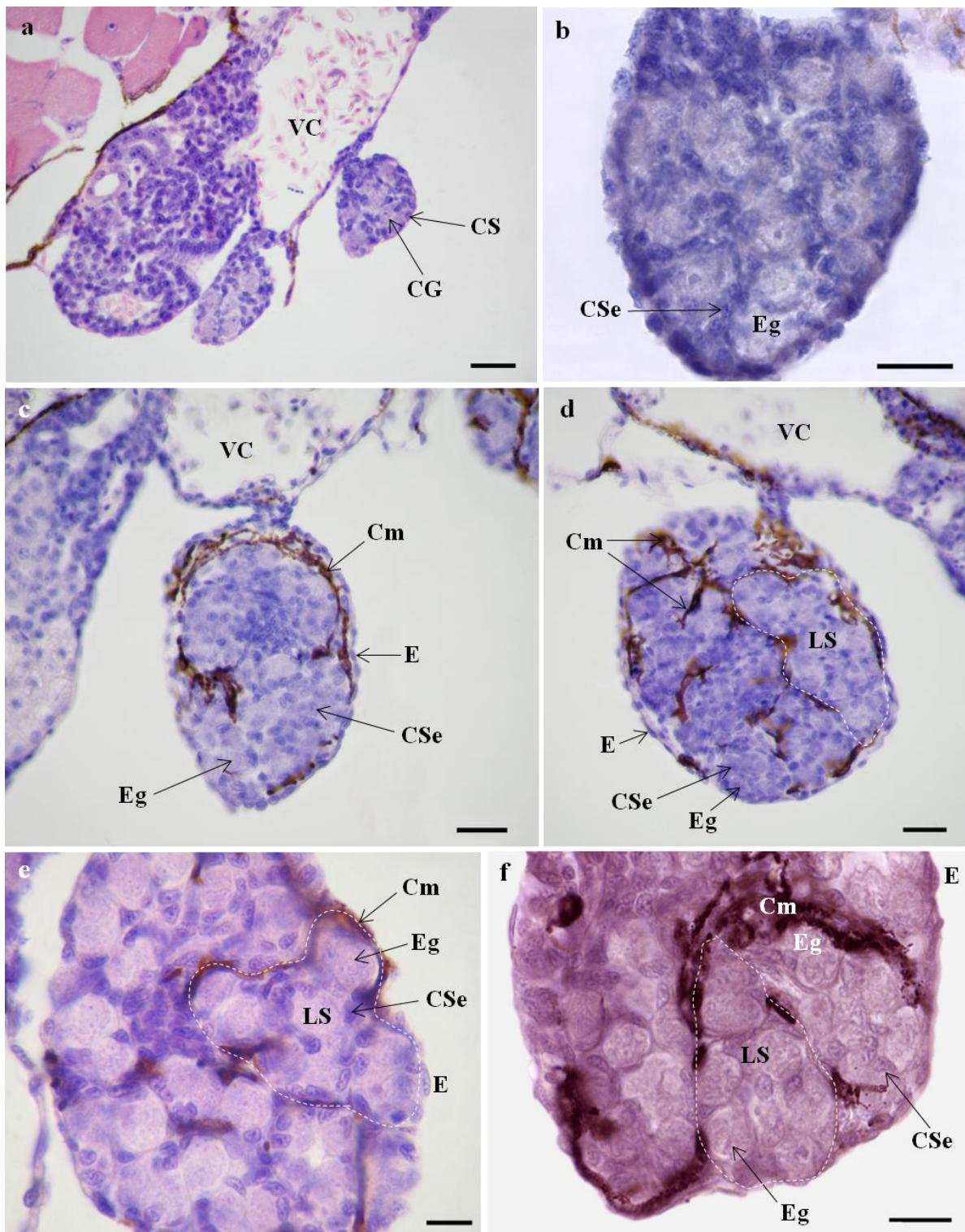
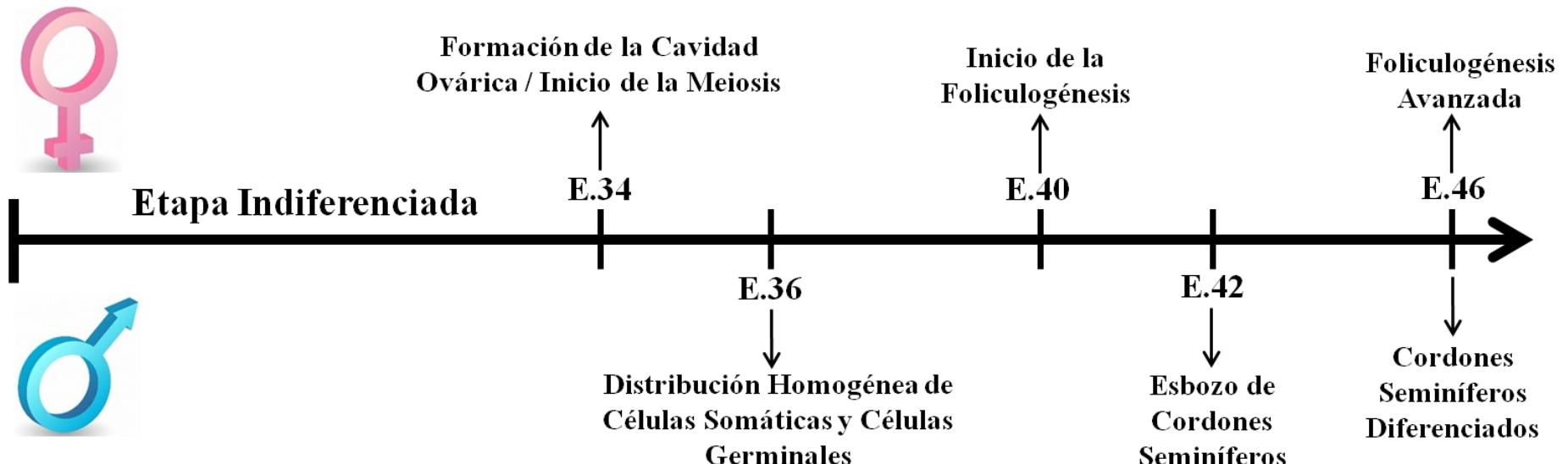


Figura 19. Diferenciación y desarrollo del testículo de *Physalaemus santafecinus*. MO. a) E.36; b) E.39; c) E.41; d) E.42; e) E. 44; f) E.46. CG: célula germinal; Cm: cromatóforos; CS: célula somática de sostén (preSertoli); CSe: célula de Sertoli; E: célula epitelial; Eg: espermatogonia; LS: lóbulo seminífero. Escalas: 20 μm (a, c, d); 10 μm (b, e, f).

DIFERENCIACIÓN OVÁRICA



DIFERENCIACIÓN TESTICULAR

Figura 20. Escala temporal de los eventos más sobresalientes del desarrollo gonadal de *Physalaemus santafecinus* a nivel histológico.

2. Evaluación de los efectos de la exposición a NF

2.1. Bioensayos subcrónicos de toxicidad letal

En la Tabla 1A-C se presentan las concentraciones letales (CL_{10} , CL_{50} y CL_{90}) del NF, con sus respectivos intervalos de confianza, a distintos tiempos de exposición (en el rango de 72 h a 168 h) para larvas de *P. santafecinus* en E. 25. Los datos del análisis Probit se consignan en el apéndice III. Cabe mencionar que los datos de mortalidad fueron adecuados para calcular las CLs recién a partir de las 72 h.

La CL_{50} a 72 h resultó significativamente mayor que las CL_{50} a 120 h, 144 h y 168 h pero no difirió de la CL_{50} a 96 h. A su vez, la CL_{50} a 96 h fue mayor que las CL_{50} a 144 h y 168 h pero no difirió de la CL_{50} a 120 h. Por otro lado, no se registraron diferencias significativas entre las CL_{50} a 120 h, 144 h y 168 h. La CL_{10} mostró el mismo patrón que la CL_{50} . En el caso de las CL_{90} , la CL_{90} a 72 h fue significativamente mayor que las CL_{50} a 144 h y 168 h pero no difirió de las CL_{90} a 96 h y 120 h. A su vez, no se registraron diferencias significativas entre las CL_{90} a 96 h, 120 h, 144 h y 148 h.

En la Figura 21 se representa gráficamente el perfil de toxicidad del NF (curvas TOP) construido en base a los parámetros de concentraciones letales en función del tiempo de exposición. Se observó un incremento gradual de la toxicidad del NF entre las 72 h y 144 h de exposición. A partir de las 144 h, las concentraciones letales mostraron una tendencia hacia valores estables. Por otro lado, se evidenció que para cada tiempo de exposición, la CL_{10} , la CL_{50} y la CL_{90} difirieron significativamente entre sí, mostrando un patrón $CL_{10} < CL_{50} < CL_{90}$.

A		Intervalo de confianza	
Tiempo de exposición (h)	CL ₁₀ ($\mu\text{g/L}$)	Límite Inferior ($\mu\text{g/L}$)	Límite Superior ($\mu\text{g/L}$)
72	175,60 ^a	166,55	181,17
96	166,23 ^{ab}	156,40	172,29
120	156,89 ^{bc}	147,18	163,09
144	147,63 ^c	137,92	153,87
168	145,67 ^c	135,86	151,99

B		Intervalo de confianza	
Tiempo de exposición (h)	CL ₅₀ ($\mu\text{g/L}$)	Límite Inferior ($\mu\text{g/L}$)	Límite Superior ($\mu\text{g/L}$)
72	191,11 ^a	186,06	196,09
96	183,71 ^{ab}	178,29	188,97
120	175,40 ^{bc}	169,83	180,79
144	166,39 ^c	160,80	171,83
168	164,78 ^c	159,12	170,26

C		Intervalo de confianza	
Tiempo de exposición (h)	CL ₉₀ ($\mu\text{g/L}$)	Límite Inferior ($\mu\text{g/L}$)	Límite Superior ($\mu\text{g/L}$)
72	207,99 ^a	201,88	218,53
96	203,04 ^{ab}	196,37	214,50
120	196,08 ^{ab}	189,16	207,61
144	187,56 ^b	180,52	199,29
168	186,39 ^b	179,27	198,27

Tabla 1 A-C. Concentraciones letales (CL₁₀, CL₅₀ y CL₉₀) del NF para larvas de *Physalaemus santafecinus* en E. 25 a distintos tiempos de exposición. Para cada tiempo, se indica la CL con su respectivo intervalo de confianza, calculados mediante el método Probit. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

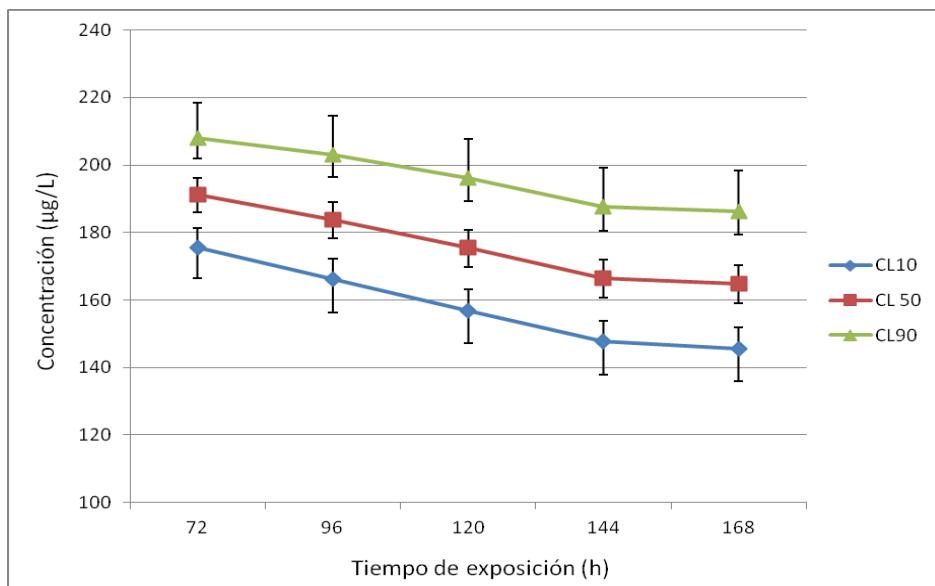


Figura 21. Perfil de toxicidad (curvas TOP) del NF para larvas de *Physalaemus santafecinus* en E. 25, construido en base a las concentraciones letales (CL₁₀, CL₅₀ y CL₉₀) a distintos tiempos de exposición. Los valores representan las concentraciones letales con sus respectivos intervalos de confianza, calculadas mediante el método Probit.

A partir de la curva de letalidad incipiente, se determinó un valor de CL₅₀ incipiente o umbral de 163,93 $\mu\text{g/L}$ (Figura 22). El cálculo de este parámetro por el método de la media geométrica proporcionó un valor de 157,22 $\mu\text{g/L}$ (X_1 : 164,78 $\mu\text{g/L}$; X_2 : 150 $\mu\text{g/L}$).

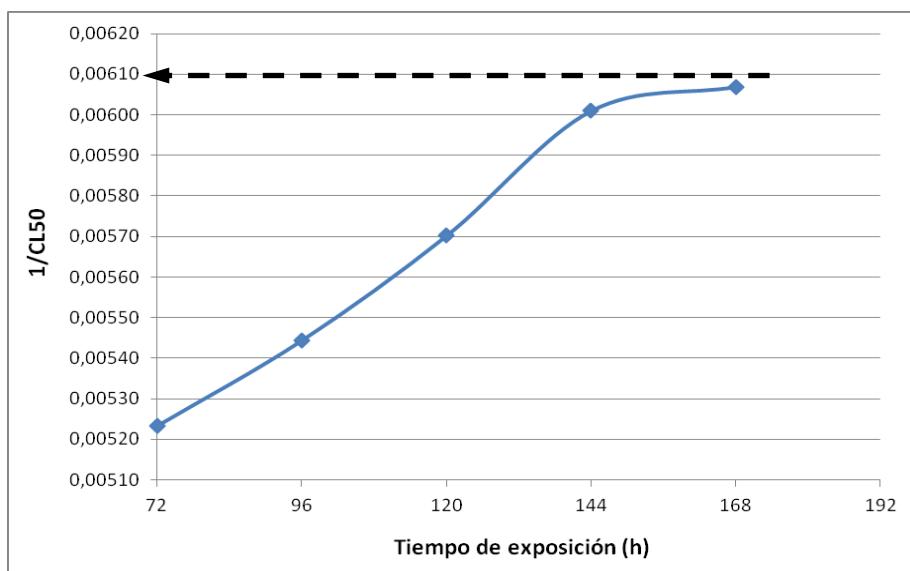


Figura 22. Curva de letalidad incipiente del NF para larvas de *Physalaemus santafecinus* en E. 25. La flecha indica el valor de 1/CL₅₀ incipiente.

A partir de los datos de mortalidad registrados durante la exposición subcrónica de 168 h, se estimaron los valores de las concentraciones NOEC y LOEC en 150 µg/L y 175 µg/L, respectivamente (Figura 23). En función de estos resultados, se estableció una concentración de 100 µg/L como la máxima a ser ensayada en el bioensayo crónico.

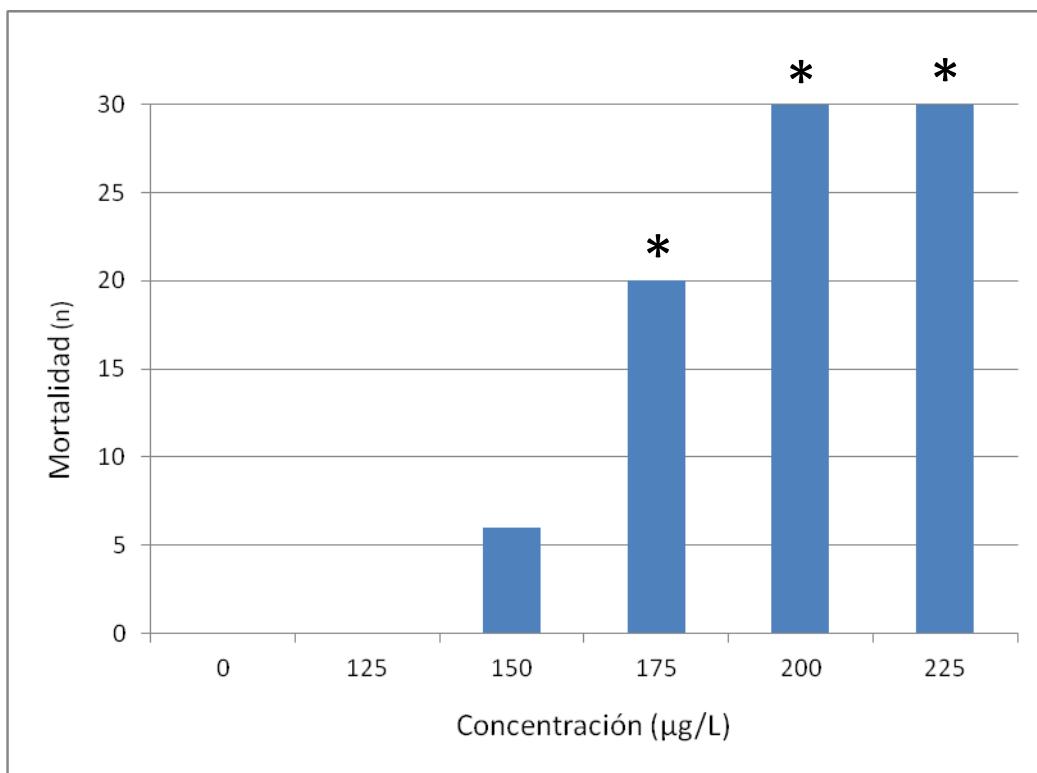


Figura 23. Curva concentración-respuesta de toxicidad letal del NF para larvas de *Physalaemus santafecinus* en E. 25 luego de 168 h de exposición. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control de solvente (0 µg/L) (ANOVA de una vía seguida de contrastes de Tukey, p<0,05).

2.2. Bioensayo crónico de toxicidad subletal

2.2.1. Mortalidad durante el bioensayo

Los datos de mortalidad correspondiente a cada tratamiento se consignan en la Tabla 2. En los tratamientos control se registró una mortalidad del 26,7 %, correspondiente a individuos en los que se observó una disminución de la ingesta de alimento durante el bioensayo. El mismo valor de mortalidad se registró en el tratamiento con E₂. En cuanto a los tratamientos con NF, las concentraciones de 1 µg/L y 10 µg/L mostraron valores similares de mortalidad que el resto de los tratamientos, mientras que en el tratamiento con 100 µg/L NF

se registró una mortalidad significativamente mayor (56,7%). Exceptuando la mayor concentración de NF, no se registraron diferencias significativas de mortalidad entre tratamientos. Por otro lado, no se observaron alteraciones morfológicas ni comportamentales de los ejemplares durante el bioensayo, en ninguno de los tratamientos.

Tratamiento	N inicial	N final	Mortalidad (%)
Control	30	22	26,66 ^a
C. Solvente	30	22	26,66 ^a
E2	30	22	26,66 ^a
NF1	30	23	23,33 ^a
NF10	30	22	26,66 ^a
NF100	30	13	56,66 ^b

Tabla 2. Mortalidad registrada durante la exposición crónica a NF a lo largo del período larval-metamórfico de *Physalaemus santafecinus*. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (prueba exacta de Fisher, p<0,05).

2.2.2. Tiempo hasta finalizar la metamorfosis

El tiempo transcurrido hasta el fin de la metamorfosis fue muy variable dentro de cada tratamiento, registrándose un tiempo mínimo de 36 días y un tiempo máximo de 102 días. A su vez, no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos con respecto a este parámetro (Figura 24).

2.2.3. Tamaño corporal

No se registraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos con respecto a la LHC de los individuos que alcanzaron el E. 45-46, correspondiente al final de la metamorfosis (Figura 25).

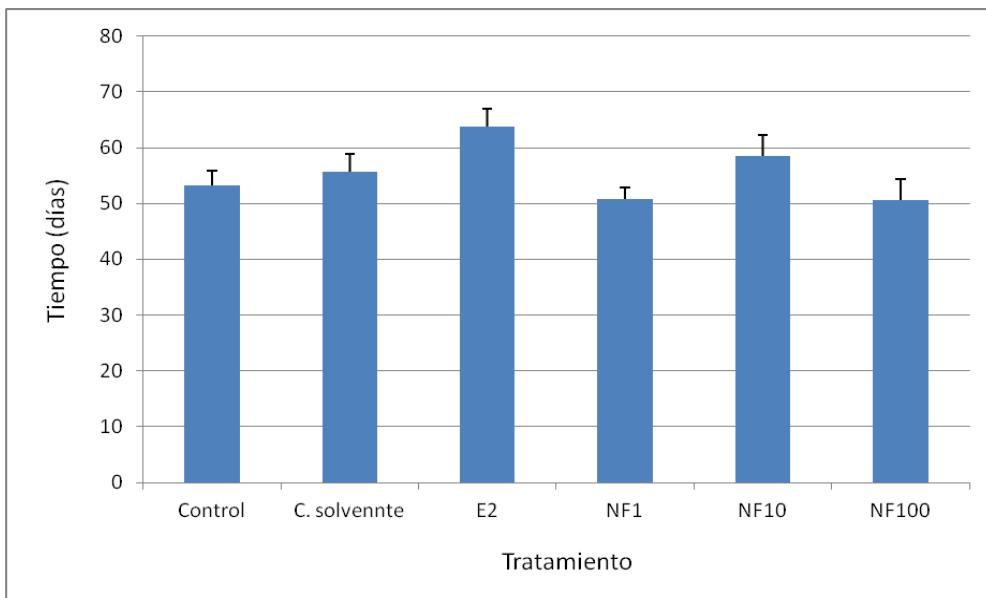


Figura 24. Tiempo transcurrido hasta el final de la metamorfosis (E. 45-46) registrado en cada tratamiento. Las barras indican la media \pm el error estándar. No se registraron diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía seguida de contrastes de Tukey, $p>0,05$).

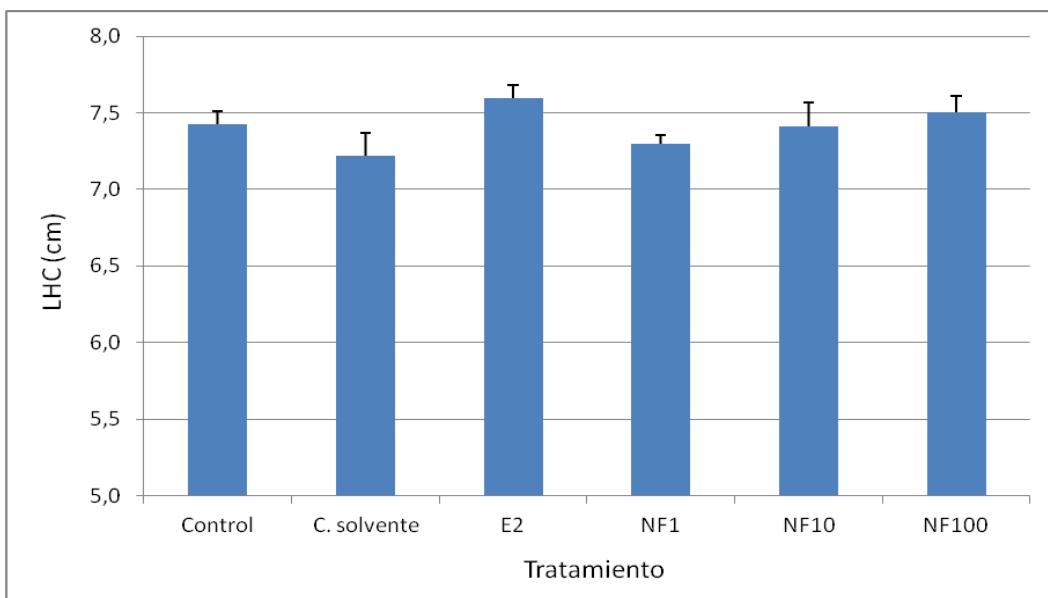


Figura 25. LHC de los ejemplares de *Physalaemus santafecinus* que alcanzaron el E. 45-46 en los distintos tratamientos. Las barras indican la media \pm el error estándar. No se registraron diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía seguida de contrastes de Tukey, $p>0,05$).

2.2.4. Efecto sobre la proporción de sexos

En la Tabla 3 se presenta el número de ejemplares de cada sexo registrado en cada uno de los tratamientos. Al analizar las proporciones de sexos, no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de machos y hembras correspondientes a ~ 56 ~

las distintas concentraciones de NF y los correspondientes a los tratamientos control y control de solvente. Por el contrario, la exposición a 10 µg/L E₂ tuvo un marcado efecto feminizante, registrándose un 100% de hembras en dicho tratamiento, siendo esta proporción significativamente mayor que en el resto de los tratamientos (Figura 26).

Tratamiento	Machos	Hembras
Control	7	11
C. Solvente	8	10
E2	0	22
NF1	13	10
NF10	9	13
NF100	9	4

Tabla 3. Número de individuos de cada sexo que alcanzaron el final de la metamorfosis (E. 45-46) en los distintos tratamientos. En los controles el n total es inferior a 22 debido a que hubo ejemplares que no pudieron ser sexados.

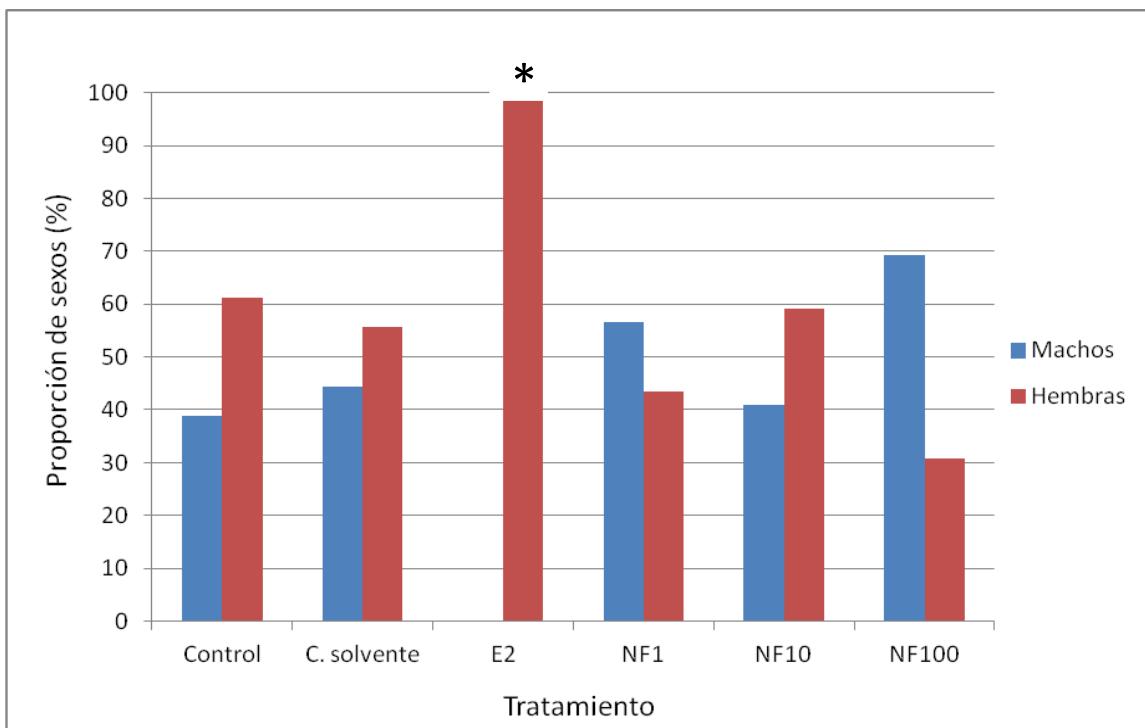


Figura 26. Proporciones de sexos correspondientes a los distintos tratamientos. El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa entre tratamiento con E_2 y los tratamientos restantes (prueba excata de Fisher, $p<0,05$).

2.2.5. Efectos sobre la estructura gonadal

No se observaron alteraciones macroscópicas en las gónadas de los ejemplares expuestos a las distintas concentraciones de NF. En el tratamiento con 10 $\mu\text{g/L}$ E_2 , se observaron ovarios de aspecto normal, semejantes a los controles, en el 100% de los individuos analizados. Anatómicamente, las gónadas de los individuos examinados en los distintos tratamientos se ubicaron en la región ventro-medial anterior del mesonefros. Los ovarios se reconocieron como estructuras lobulares, observándose entre dos y cinco lóbulos de tamaño variable en cada ovario (Figuras 27a, c, e; 28a, c, e). Los testículos presentaron una estructura ovoide y tamaño menor en relación al ovario (Figuras 29a, c; 30a, c, e).

A nivel histológico, las gónadas de los ejemplares analizados presentaron características similares en los diferentes tratamientos. En los ovarios de los individuos de todos los tratamientos se observaron folículos formados por oocitos en crecimiento primario y

células foliculares circundantes, así como oocitos en etapas tempranas de la meiosis. En el tejido intersticial presente entre los folículos se destacó la presencia de cromatóforos de una tonalidad marrón oscura. La cavidad ovárica resultó muy reducida y difícil de distinguir en las secciones histológicas, debido a que en su gran parte estaba ocupada por los folículos en desarrollo (Figuras 27b, d, f; 28b, d, f). En los testículos se observaron lóbulos seminíferos de desarrollo incipiente, constituidos por espermatogonias con núcleo lobulado contenido cromatina laxa, asociadas a células de Sertoli con núcleos conspicuos de forma variable. En el tejido intersticial que delimitaba los cordones seminíferos, se observaron cromatóforos de tonalidad marrón oscuro, similares a los observados en el ovario (Figuras 29b, d; 30b, d, f). no se registro presencia de intersexos gonadales en los ejemplares analizados.

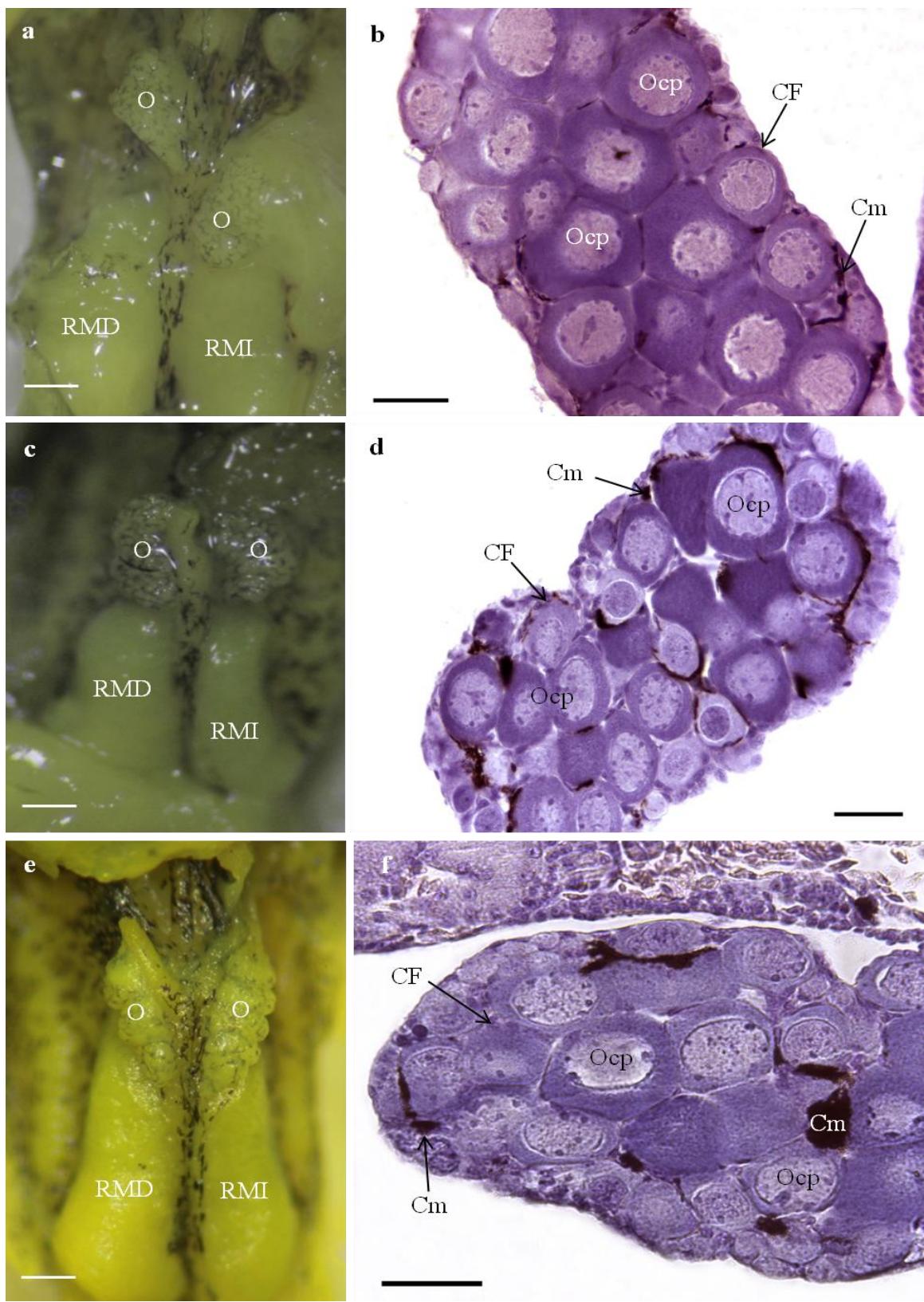


Figura 27. Estructura ovárica en individuos metamórficos (E.45-46) del ensayo crónico subletal. a), c), e) Morfología externa; b), d), f) Histología gonadal. a), b) Control; c), d) Control de solvente; e), f) E₂. **CF:** célula folicular; **Cm:** cromatóforos; **O:** ovario; **Ocp:** oocito en crecimiento primario; **Omt:** oocito meiótico temprano; **RMD:** riñón mesonéfrico derecho; **RMI:** riñón mesonéfrico izquierdo. Escalas: 200 µm (a, c, e); 20 µm (b, d, f).

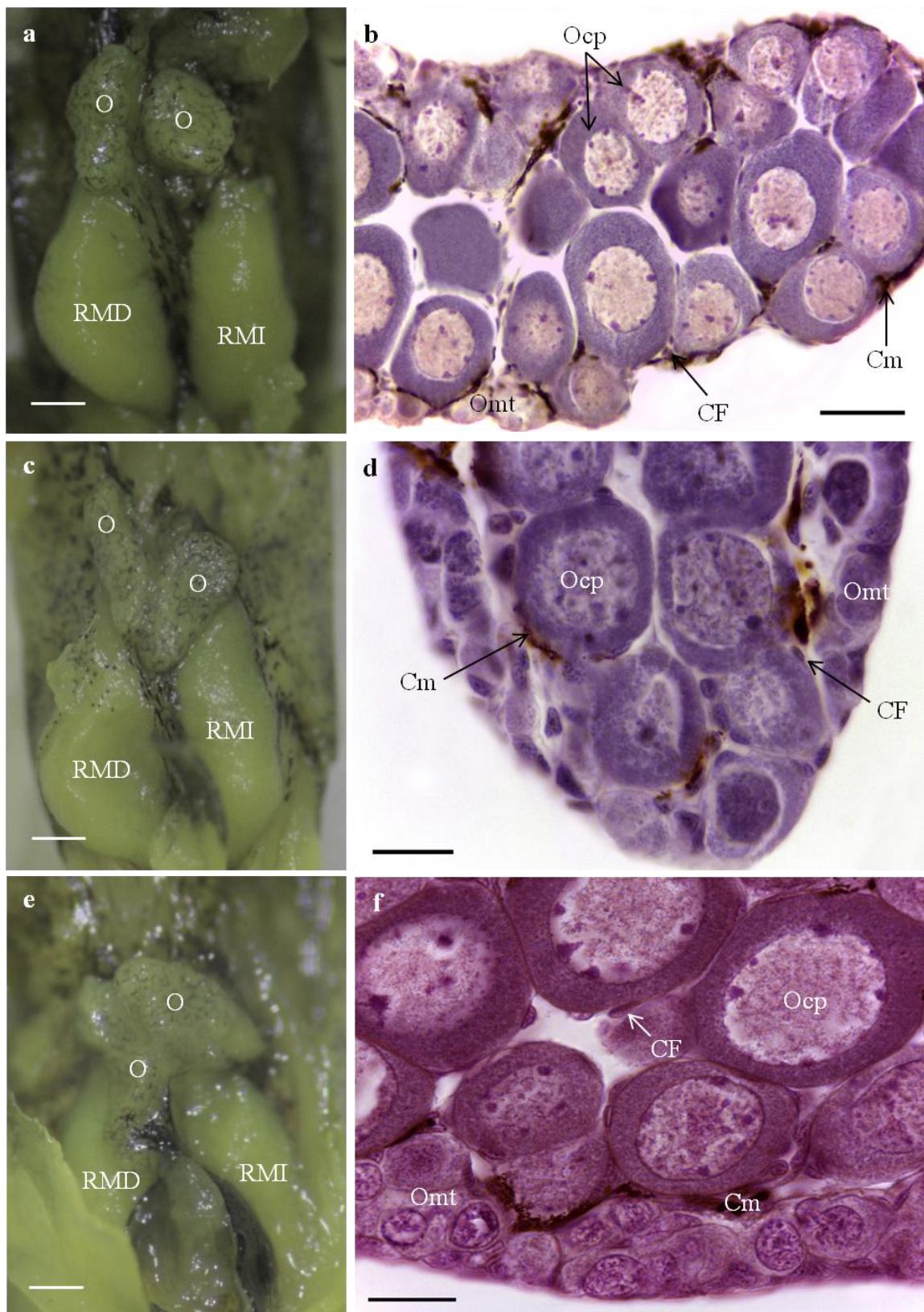


Figura 28. Estructura ovárica en individuos metamórficos (E.45-46) del ensayo crónico subletal. a), c), e) Morfología externa; b), d), f) Histología gonadal. a), b) NF1; c), d) NF10; e), f) NF100. **CF:** célula folicular; **Cm:** cromatóforos; **O:** ovario; **Ocp:** oocito en crecimiento primario; **Omt:** oocito meiótico temprano; **RMD:** riñón mesonéfrico derecho; **RMI:** riñón mesonéfrico izquierdo. Escalas: 200 µm (a, c, e), 20 µm (b); 10 µm (d, e).

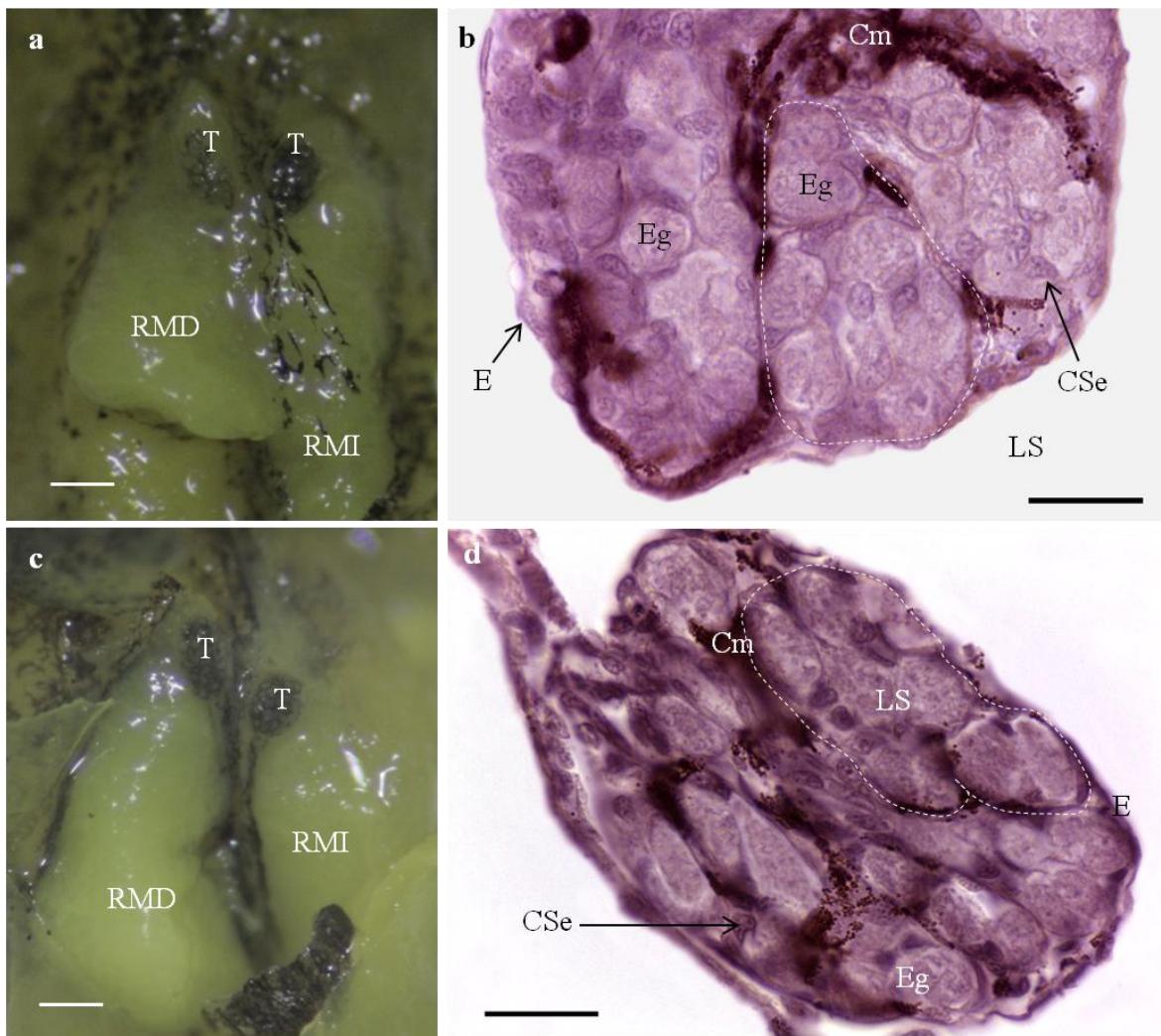


Figura 29. Estructura testicular en individuos metamórficos (E.45-46) del ensayo crónico subletal. a), e) Morfología externa; b), d), f) Histología gonadal. a), b) Control; c), d) Control de solvente. **Cm:** Cromatóforos; **CSe:** células de Sertoli; **E:** célula epitelial; **Eg:** espermatogonia; **LS:** lóbulo seminífero; **RMD:** riñón mesonéfrico derecho; **RMI:** riñón mesonéfrico izquierdo; **T:** testículo. Escalas: 200 μm (a, c); 10 μm (b, d).

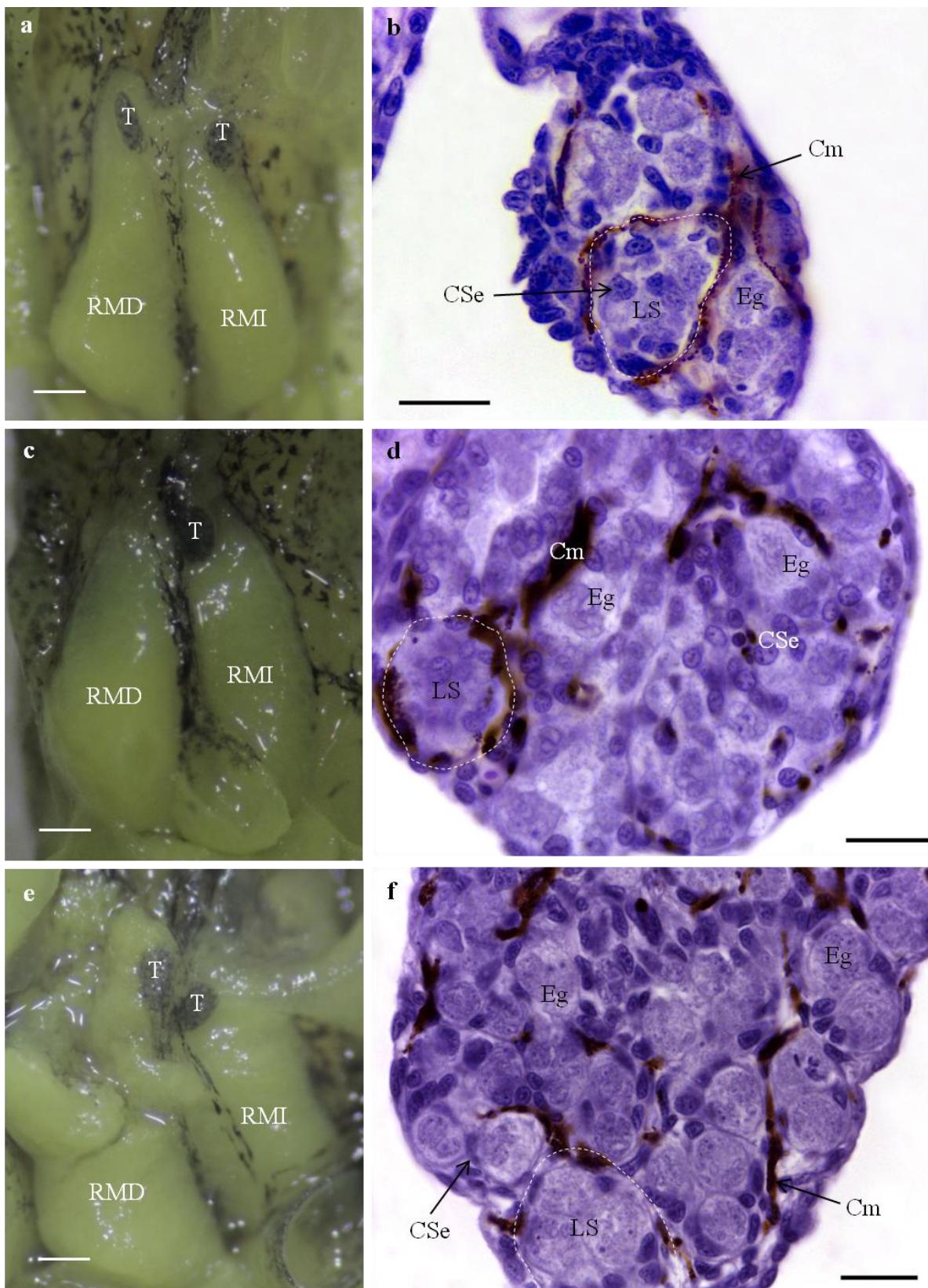


Figura 30. Estructura testicular en individuos metamórficos (E.45-46) del ensayo crónico subletal. a), c), e) Morfología externa; b), d), f) Histología gonadal. a), b) NF1; c), d) NF10; e), f) NF100. **Cm:** Cromatóforos; **CSe:** célula de Sertoli; **E:** célula epitelial; **Eg:** espermatogonia; **LS:** lóbulo seminífero; **RMD:** riñón mesonéfrico derecho; **RMI:** riñón mesonéfrico izquierdo; **T:** testículo. Escalas: 200 µm (a, c, e); 10 µm (b, d, f).

2.2.6. Concentraciones reales de NF

Las concentraciones de NF medidas en el agua de ensayo a las 0 h, 24 h y 48 h se muestran en la Tabla 4A, B. La diferencia entre la concentración nominal y la concentración medida en el tiempo 0 fue inferior al 10%. Para ambas concentraciones nominales analizadas, se registró un descenso pronunciado de la concentración real del analito. En los recipientes con concentración nominal de 100 µg/L, la concentración real al cabo de 24 h disminuyó al 49% de la concentración al tiempo 0, mientras que a las 48 h se redujo al 41% (Figura 31a). Para la concentración nominal de 10 µg/L, la concentración analítica fue del 74% de la concentración inicial al cabo de 24 h y disminuyó al 55% luego de 48 h (Figura 31b). No se detectó presencia de NF en los recipientes control. Los valores de los coeficientes de correlación de las curvas de calibración construidas a partir de las soluciones patrón fueron $R^2=0,986$ para la curva de 100 µg/L y $R^2=0,968$ para la curva de 10 µg/L.

A - Concentración Nominal 100 µg/L			
Tiempo (h)	Concentración Medida (µg/L)		% Concentración Nominal
	Media (2)	Desviación Standar	
0	109,43	5,49	109,43
24	53,05	1,03	53,05
48	44,87	1,46	44,87

B - Concentración Nominal 10 µg/L			
Tiempo (h)	Concentración Medida (µg/L)		% Concentración Nominal
	Media (2)	Desviación Standar	
0	9,25	0,93	92,49
24	6,91	0,24	69,10
48	5,15	0,18	51,45

Tabla 4. Concentraciones reales de NF en el agua de ensayo correspondientes a los tratamientos NF100 (**A**) y NF10 (**B**). Las determinaciones se realizaron en muestras de agua obtenidas 0 h, 24 h y 48 h después de adicionar el compuesto.

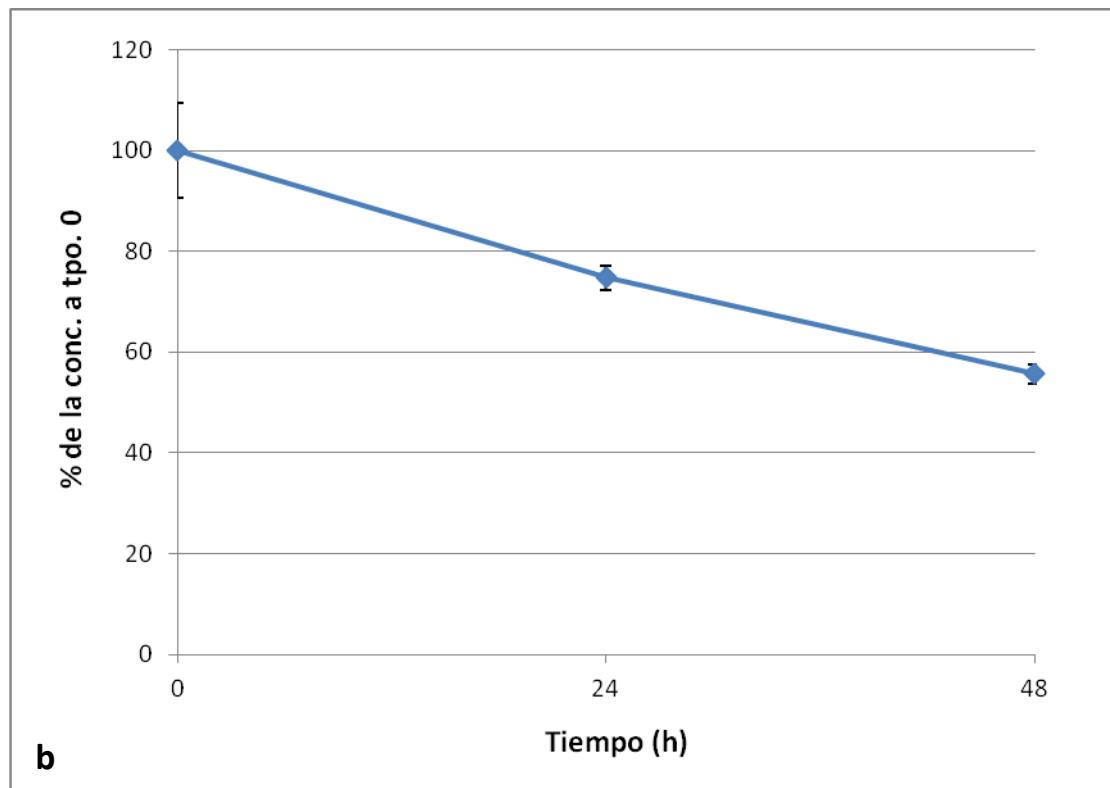
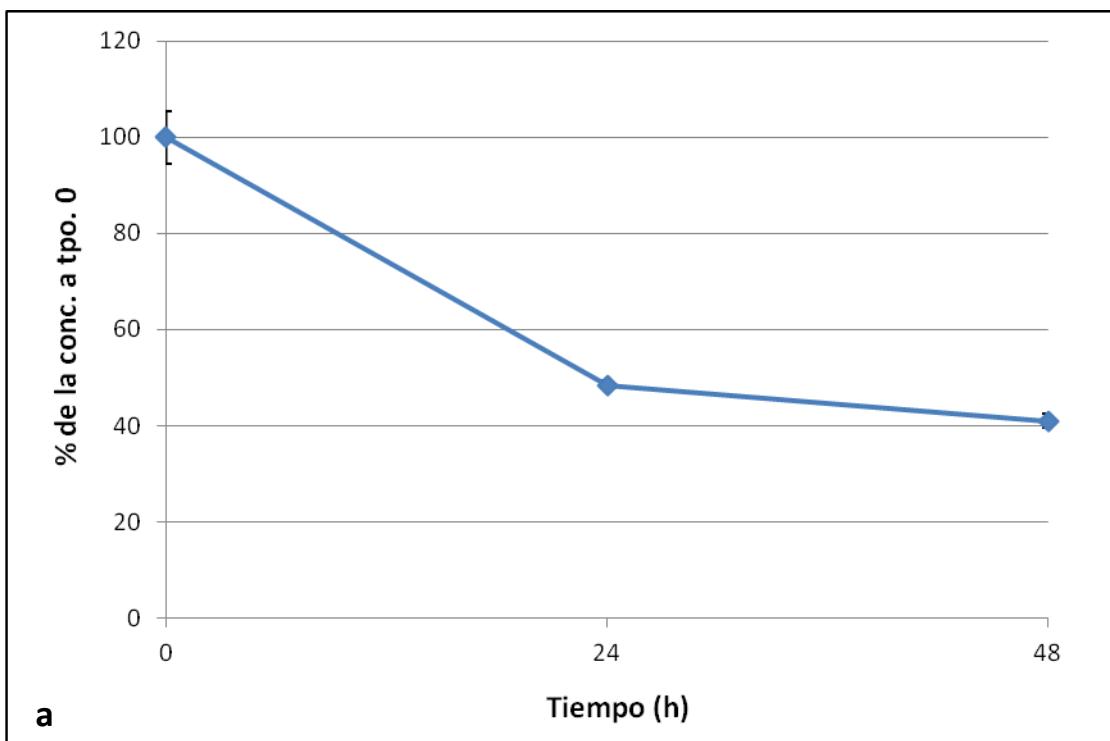


Figura 31. Evolución temporal de la concentración de NF medida en el agua de ensayo de los tratamientos NF100 (a) y NF10 (b).



DISCUSIÓN

1. Desarrollo del sistema urogenital

1.1. Anatomía del sistema urogenital

En los últimos años, el análisis de los eventos heterocrónicos durante el desarrollo ha cobrado gran interés debido fundamentalmente a sus implicancias no sólo ecomorfológicas sino también de índole evolutiva. Las variaciones en los patrones morfogenéticos, en particular aquellos relacionados con el tiempo de desarrollo, son considerados actualmente como importantes procesos involucrados en la aparición de novedades evolutivas dentro de un clado (McKinney & McNamara, 1991; Reilly *et. al*, 1997). Los cambios heterocrónicos de diversos procesos a nivel celular, genético o molecular pueden conducir a cambios de tipo fenotípicos, modificaciones estructurales de órganos específicos o maduración acelerada o retardada de ciertos órganos y sistemas, condicionando así la historia de vida de un taxón (Smith, 2003).

En el desarrollo del sistema urogenital se observó un patrón heterocrónico durante la ontogenia del mesonefros y los cuerpos grasos de *Physalaemus santafecinus*. Respecto al “onset” de los eventos analizados, se destaca una diferencia en el tiempo de formación del riñón mesonéfrico derecho con respecto al izquierdo. Los cuerpos grasos también siguen un patrón heterocrónico aunque de modo inverso al sistema urinario. Estas observaciones llevan a plantear que diferencias en el “onset” de ciertos eventos pueden manifestarse en órganos pares dentro de un mismo sistema. Durante el desarrollo de un órgano tienen lugar una serie de eventos en un contexto espacial y temporal preciso donde muchos de los procesos ontogenéticos dependen de la inducción de células o tejidos próximos o bien de señales hormonales. En referencia a las diferencias en el tiempo de desarrollo de los riñones mesonéfricos y los cuerpos grasos observadas en el presente estudio, se plantea el interrogante acerca de por qué ciertos campos morfogenéticos responderían de manera diferencial a una

misma señal, si la hubiere, o bien si algunos requieren de señales accesorias. En este contexto, dichos órganos constituirían unidades modulares independientes donde cada una tendría un tiempo de desarrollo propio. Por otra parte, en referencia al riñón mesonéfrico, se observó una marcada diferencia de tamaño entre el lado derecho e izquierdo, al menos hasta los estadios prometamórficos. Sin embargo, en los estadios metamórficos y en individuos adultos ambas estructuras presentan dimensiones similares. A este respecto, podríamos suponer que la tasa de crecimiento del mesonefros derecho es superior a la del izquierdo, o bien que el riñón derecho alcanza un determinado tamaño y cesa su crecimiento, el cual continuaría en el lado izquierdo hasta alcanzar el tamaño adecuado. Para el caso de los cuerpos grasos se observó, en los individuos juveniles, una clara diferencia respecto al tamaño de la estructura izquierda y derecha que podría explicarse por las diferencias en el tiempo de formación de las mismas, de modo que el retraso en la organización del cuerpo graso derecho podría condicionar su tamaño final. Esta misma asimetría en el momento de formación y el grado de desarrollo de ambos cuerpos grasos fue observada en *Leptodactylus latrans* (Bach, 2018), por lo cual podría constituir un característica de la familia Leptodactylidae. Desafortunadamente, no existen suficientes referencias ni evidencias que puedan sustentar estas presunciones, si bien estas observaciones plantean un interesante campo de estudio.

La organización y el desarrollo gonadal en *P. santafecinus* no mostró las particularidades observadas en el sistema renal y los cuerpos grasos, iniciándose la formación de ambas gónadas de forma sincrónica. Al igual que en otras especies de anuros estudiadas, los esbozos gonadales son observados a partir del E. 25, mediante técnicas de microscopía electrónica o el análisis histológico, pero no son reconocibles bajo microscopio estereoscópico. Anatómicamente, las gónadas indiferenciadas de los anuros se presentan como estructuras metaméricas con aspecto de collar de cuentas. Esta metamería gonadal fue descripta por primera vez por Witschi (1929) y responde a una distribución discontinua de las

células somáticas medulares a lo largo de la gónada. En el caso de las hembras, el ovario se desarrolla a partir de todos los metámeros, y en el interior de cada uno de ellos aparece una luz correspondiente a la cavidad ovárica. De este modo, el número de gonómeros en la gónada indiferenciada se corresponde con el número de sacos ováricos en el ovario diferenciado. A su vez, el número de sacos ováricos varía entre las distintas especies de anuros, habiéndose reportado desde 6-9 en *Pelophylax lessonae* y *Pelophylax ridibunda* hasta 20-23 en *Xenopus laevis* (Ogielska & Kotusz, 2004). En los machos, el testículo se diferencia a partir de los metámeros proximales, mientras que los segmentos distales degeneran en sentido póstero-anterior. Como resultado de este proceso morfogenético, los testículos sufren un acortamiento (Haczkiewicz & Ogielska, 2013). En el caso de *P. santafecinus*, el número de gonómeros parece ser reducido ya que en el ovario de individuos en E.46 se observaron hasta 5-6 sacos ováricos. A su vez, el acortamiento testicular parece darse tempranamente en el desarrollo y el testículo se desarrollaría a partir de uno o dos gonómeros proximales. Esto explicaría que en esta especie, la distinción morfológica entre ovarios y testículos presuntivos pueda realizarse a partir del E.29 por la presencia de lobulaciones en la gónada femenina. Esto permite, a diferencia de otras especies, la identificación del sexo de los ejemplares en el periodo premetamórfico.

1.2. Desarrollo gonadal y diferenciación sexual

En *P. santafecinus* el primordio gonadal es identificado a nivel histológico a partir del E.27. En secciones transversales, se observan en la gónada una o dos células germinales rodeadas por un número reducido de células somáticas. En otras especies de anuros tales como *Bombina variegata*, *Euphlyctis cyanophlyctis* y *L. latrans*, el esbozo gonadal puede ser reconocido más tempranamente, a partir del E.25 (Piprek *et. al.*, 2010; Phunge &

Gramapurohit, 2013; Bach, 2018), con características similares a las descritas para la especie objeto de este estudio. Hacia el E.31, el número de células germinales y de células somáticas aumenta y la gónada indiferenciada adquiere la estructura córtico-medular característica, descripta para la mayoría de las especies de anuros.

En este estudio, se comprobó que en *P. santafecinus* la diferenciación del ovario se evidencia a partir del E.34, con la formación de la cavidad ovárica y la aparición de figuras meióticas correspondientes a oocitos en etapas tempranas de la profase I. Dichos oocitos se encuentran agrupados en cistos, rodeados por células somáticas prefoliculares que no penetran dentro de los mismos. En el presente estudio, los grupos de células germinales con desarrollo sincrónico que aparecen rodeadas por células somáticas periféricas fueron identificados como cistos. La certeza definitiva en cuanto a esta designación estaría dada por la observación de puentes citoplasmáticos entre las células germinales mediante microscopía electrónica de transmisión. Estas estructuras han sido observadas durante la diferenciación ovárica temprana de otras especies de anuros, tales como *B. orinetalis* (Lopez, 1989), *Rana temporaria* (Ogielska & Kotuzs, 2004) y *L. latrans* (Bach, 2018), siendo identificadas generalmente como nidos de oogonias secundarias u oocitos tempranos. Sin embargo, el término “nido” suele emplearse en la literatura para referirse a regiones del epitelio germinal donde se agrupan células en distintos estadios de la oogénesis temprana, incluyendo oogonias primarias, oogonias secundarias y oocitos meióticos tempranos, lo cual lleva a confusión. Como se ha mencionado previamente, la formación de cistos es un aspecto conservado de la oogénesis, existiendo reportes de su presencia tanto en invertebrados como en vertebrados (de Cuevas *et. al*, 1997; Pepling *et. al*, 1999; Matova & Cooley, 2001; Kloc *et. al*, 2004; Pepling, 2006; Saito *et. al*, 2007; Mazzoni *et. al*, 2010; Quaglio-Grassiotto *et. al*, 2011; Wildner *et. al*, 2013; Meijide *et. al*, 2016). En *P. santafecinus*, los primeros folículos ováricos se forman a partir del E.40, cuando los oocitos que conforman el cisto alcanzan el estadio de diplotene y son

aislados unos de otros por células foliculares que los rodean individualmente. En este momento, se inicia la etapa de crecimiento primario, caracterizada por un aumento de tamaño del núcleo y del citoplasma, junto con un incremento de la basofilia citoplasmática, producto de la síntesis de ARN. Hacia el fin de la metamorfosis (E.46), el número y tamaño de los folículos en desarrollo se incrementa dentro del ovario, lo cual hace que la cavidad ovárica sea difícil de reconocer en secciones transversales.

En relación al desarrollo testicular, el análisis histológico mostró el primer indicio de diferenciación a partir del E.36. En este estadio, los testículos se identifican por la distribución uniforme de células germinales y células somáticas en secciones transversales, producto de la migración de las células germinales hacia la médula. Las células germinales son identificadas a partir de entonces como espermatogonias y las células somáticas asociadas a ellas como células de Sertoli. Posteriormente, durante el climax metamórfico, el tejido intersticial se desarrolla desde la periferia hacia el centro, lo cual da lugar a la formación de lóbulos o cordones seminíferos. Hacia el fin de la metamorfosis, los lóbulos seminíferos contienen numerosas espermatogónias pero no se observan indicios del comienzo de la espermatogénesis. Un rasgo notorio observado en el presente estudio es la gran cantidad de cromatóforos presentes en el tejido intersticial del testículo a partir del clímax metamórfico, en contraposición a lo observado en el ovario, en el que las células pigmentarias son escasas. Esta diferencia entre ovario y testículo en relación al grado de pigmentación se pone de manifiesto a nivel externo dado que, observados bajo lupa estereoscópica, la pigmentación superficial de los ovarios es discontinua, mientras que los testículos presentan coloración gris oscura uniforme. En machos adultos de *P. santafecinus*, los testículos se observan como estructuras ovoides de color blanco-grisáceo (Sandoval & Gómez, 2010), siendo la pigmentación testicular menos intensa que la reportada para otras especies del género, como *P. cuvieri* (de Oliveira *et. al*, 2002) y *P. biligonigerus* (Carezzano & Cabrera, 2010).

En la Figura 32 se representa el desarrollo gonadal en relación al desarrollo somático en distintas especies de anfibios anuros. Se observa que el patrón acelerado de diferenciación ovárica se registra en especies de las familias Hylidae (*S. fuscovarius*, *P. platensis*, *D. labialis*), Microhylidae (*M. ornata*), Dicromystidae (*E. cyanophryctis*) y Ranidae (*C. curtipes*, *H. malabarica*). El patrón básico se evidencia en especies del género *Bombina* (familia Bombinatoridae) y en la rana africana *X. laevis* (familia Pipidae), mientras que los representantes de la familia Bufonidae (*B. japonicus*, *R. arenarium*) exhiben el patrón retardado. Por otro lado, se comprueba que las especies con diferenciación directa en ovarios o testículos (patrón diferenciado) pueden presentar cualquiera de los tres tipos de desarrollo ovárico en relación al desarrollo somático (acelerado, básico o retardado); mientras que las especies con diferenciación testicular a partir de una fase ovárica con degenariación de oocitos (patrón indiferenciado) (*P. platensis*, *E. cyanophryctis*, *C. curtipes*, *H. malabárica*) presentan un desarrollo ovárico acelerado. En cuanto al desarrollo testicular, se observa que el testículo se diferencia con posterioridad al ovario en muchas especies, mientras que en otras, las gónadas de ambos sexos se diferencian hacia una misma etapa de la ontogenia. La aparición de folículos con oocitos en diplotene y la formación de los lóbulos seminíferos son rasgo morfológico comúnmente considerado en relación al desarrollo ovárico y testicular, respectivamente (Goldberg, 2015; Mali & Gramapurohit, 2015; Piprek *et. al*, 2017). Según este criterio, se comprueba que, salvo excepciones como *X. laevis* o los Bufónidos, el desarrollo del ovario precede al desarrollo testicular durante la ontogenia de los anuros.

En cuanto a la familia Leptodactylidae, a partir de las observaciones realizadas en este trabajo se estableció que *P. santafecinus* presenta un patrón de diferenciación sexual de tipo diferenciado, y un desarrollo ovárico de tipo básico (diferenciación del ovario y formación de los primeros folículos durante la prometamorfosis). Estos hallazgos coinciden con las observaciones realizadas por Bach (2018) en *L. latrans*. Asimismo, en ambas especies se

verifica que el testículo se diferencia durante la prometamorfosis, mientras que los lóbulos seminíferos se organizan durante el clímax metamórfico. El estudio del desarrollo gonadal en otras especies de la familia permitiría corroborar si estos patrones de gonadogenesis constituyen un carácter distintivo del taxón, tal como sucede con el patrón retardado para los Bufónidos.

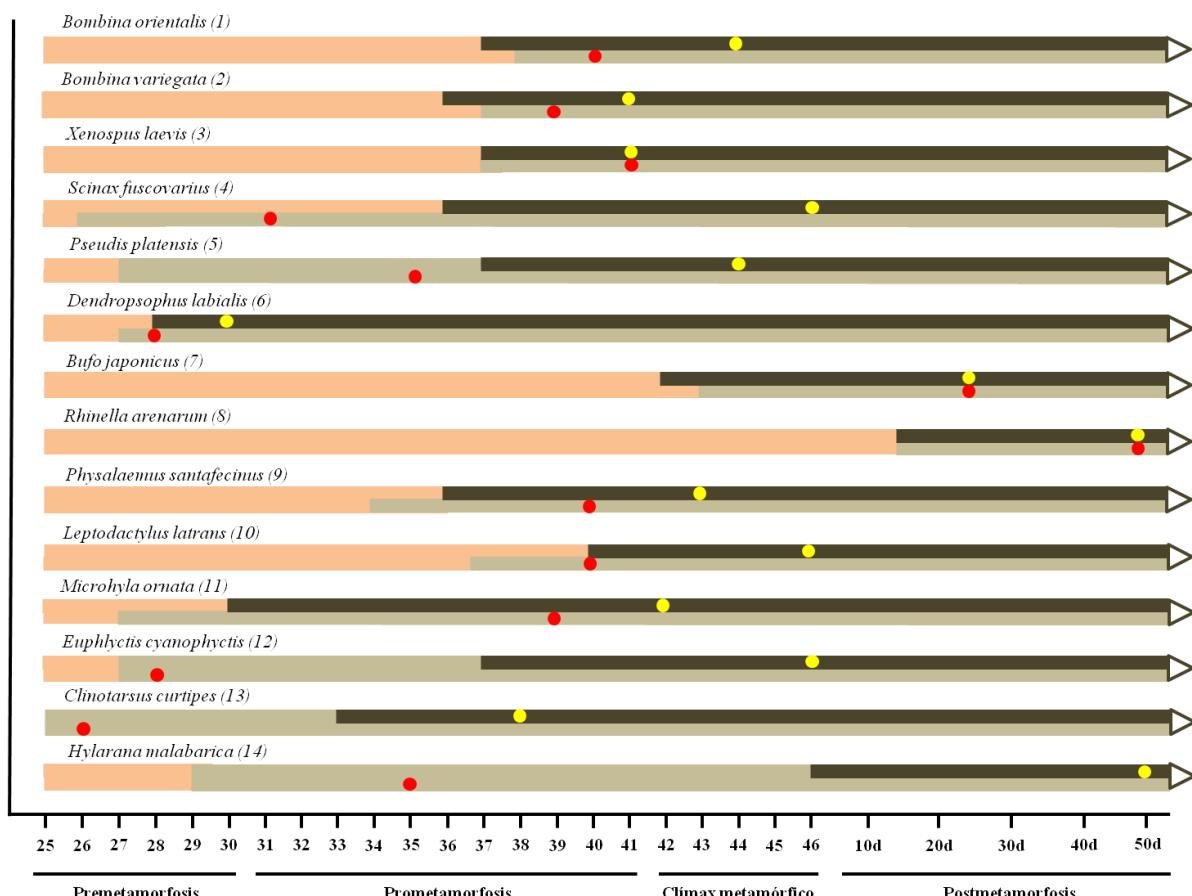


Figura 32. Tiempos relativos de desarrollo gonadal en relación al desarrollo somático para distintas especies de anuros. Las barras rosadas indican gónada indiferenciada. Las barras grises y negras indican desarrollo ovárico y testicular, respectivamente (el extremo izquierdo señala el momento de diferenciación de la gónada a nivel histológico). Los círculos rojos indican la aparición de folículos con oocitos en diplotene. Los círculos amarillos indican la formación de lóbulos seminíferos. Los datos para las distintas especies fueron recabados a partir del relevamiento de la literatura (1-Lopez, 1989; 2-Piprek et. al, 2010; 3-Piprek et. al, 2017; 4-Goldberg, 2015; 5-Fabrezi et. al, 2010; 6-Pinto Erazo et. al, 2016; 7-Tanimura & Iwasawa, 1986; 8-Piazza, 2006; 9-Este estudio; 10-Bach, 2018; 11-Mali & Gramapurohit, 2015; 12-Phuge & Gramapurohit, 2013; 13-Gramapurohit et. al, 2000; 14-Mali & Gramapurohit, 2015). Las especies se encuentran ordenadas según un criterio filogenético, en base a la filogenia de anfibios propuesta por Pyron & Wyens (2011).

2. Efectos de la exposición a NF

2.1. Toxicidad letal

Los perfiles de toxicidad del NF (curvas TOP) para larvas de *P. santafecinus* en E.25 muestran que las concentraciones letales (CL_{10} , CL_{50} y CL_{90}) disminuyeron gradualmente para los tiempos de exposición comprendidos entre 72 h y 144 h, indicando un aumento progresivo de la toxicidad del compuesto. A partir de las 144 h de exposición, las CLs tuvieron una tendencia hacia valores estables, alcanzando el valor asintótico a las 168 h. Asimismo, se evidenció que para cada tiempo de exposición, la CL_{10} , la CL_{50} y la CL_{90} difirieron significativamente entre sí, mostrando un patrón $CL_{10} < CL_{50} < CL_{90}$. La ausencia de solapamiento entre las CLs y sus estrechos intervalos de confianza a un determinado tiempo resulta un dato positivo en el sentido de que las concentraciones que pueden causar la muerte del 50 % de la población expuesta estarán alejadas de las que eventualmente sean letales para el 10% y 90% de la población, hecho que a menudo no sucede con otros contaminantes que muestran una alta variabilidad de respuesta en la susceptibilidad de la población.

En base a estos resultados, se seleccionó el tiempo de 168 h para la estimación de la concentración umbral de letalidad incipiente. Este parámetro fue calculado de dos formas diferentes, arrojando valores similares. El método gráfico del valor recíproco de la CL_{50} ($1/CL_{50}$) en función del tiempo de exposición establece que la CL_{50} incipiente se obtiene a partir del punto en el que la curva se hace paralela al eje X. En el caso del presente estudio, se obtuvo un valor de CL_{50} incipiente de 163,93 $\mu\text{g/L}$. Por su parte, el método de la media geométrica entre la menor CL_{50} registrada en el ensayo (164,78 $\mu\text{g/L}$) y la mayor concentración con mortalidad < 50% (150 $\mu\text{g/L}$) permitió estimar un valor de CL umbral de 157,22 $\mu\text{g/L}$. El parámetro de CL_{50} incipiente puede definirse como la concentración por

debajo de la cual el 50% de los individuos expuestos sobrevive indefinidamente a los efectos tóxicos del compuesto (Newman, 2015).

Un parámetro ecotoxicológico relacionado con la CL incipiente es la concentración máxima aceptable o concentración segura, que representaría la máxima concentración que permite la supervivencia de los organismos expuestos (Newman, 2015). Este parámetro es estimado como una concentración que se ubica dentro del intervalo comprendido por los valores de NOEC y LOEC. En el presente estudio, las concentraciones NOEC y LOEC del NF para larvas en *E. 25* fueron estimadas a partir de los datos de mortalidad a las 168 h, obteniéndose valores de 150 µg/L y 175 µg/L, respectivamente. En base a estos resultados, se cumple la condición de que la CL umbral o incipiente, calculada por cualquiera de los dos métodos, queda comprendida dentro del intervalo NOEC-LOEC, representando una concentración máxima aceptable para la supervivencia de las larvas de *P. santafecinus*. Por otra parte, el valor de CL₁₀, como estimación del LOEC, suele emplearse con fines regulatorios para establecer concentraciones máximas permitidas en el ambiente acuático, ya que el cálculo del NOEC y LOEC mediante las pruebas de hipótesis suele estar condicionado por el diseño experimental (Carriger *et. al*, 2011). En este estudio, la CL₁₀ a 168 h fue de 145,67 µg/L, que es un valor ligeramente menor, es decir un poco más conservador, que las CL umbrales calculadas por los otros métodos.

Cabe destacar que los valores umbrales de CL estimados son al menos un orden de magnitud mayor que las concentraciones de NF usualmente registradas en el ambiente acuático, por lo que la presencia de este xenobiótico en los cuerpos de agua no representaría una amenaza directa para las larvas de la especie estudiada en términos de supervivencia. En función de los resultados obtenidos en los ensayos de exposición subcrónica, se seleccionó una concentración de 100 µg/L como la máxima a ser ensayada en el bioensayo crónico.

Cuando las larvas de *P. santafecinus* fueron expuestas a NF desde el E.25 hasta el fin de la metamorfosis, la concentración de 100 µg/L produjo una mortalidad del 57%, la cual resultó significativamente mayor que la correspondiente a los tratamientos control, en los que se registró una mortalidad del 27%. Sin embargo, teniendo en cuenta la mortalidad de los controles (debida por lo general a una mala alimentación de los individuos), la mortalidad atribuible a efectos tóxicos del NF durante una exposición crónica sería del 30 %, es decir inferior al 50% según lo predicho a partir de los valores umbrales estimados en el ensayo subcrónico.

La CL₅₀ es el parámetro toxicológico más comúnmente usado para determinar la toxicidad relativa de un compuesto para un organismo determinado. En este sentido, la sensibilidad de *P. santafecinus* a los alquilfenoles puede ser evaluada comparativamente con otras especies de anuros cotejando valores de CL₅₀. La CL₅₀-96 h para larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a 4-tert-octilfenol (OF) en el E.26 fue de 251,8 µg/L (Piazza, 2006), mientras que la CL₅₀-96 h para larvas expuestas a NF en el E.25 fue de 370 µg/L (Aronzon *et. al*, 2014). Para *P. santafecinus*, el valor de CL₅₀-96 h del NF fue de 183,71 µg/L. Estos resultados indican que las larvas de *P. santafecinus* son más sensibles a los alquilfenoles que las de *R. arenarum*.

2.2. Efectos subletales

En el bioensayo crónico, el tiempo que tardaron las larvas en completar la metamorfosis resultó muy variable en todos los tratamientos, habiéndose registrado valores mínimos de 36 días y máximos de 102 días. A su vez, en todos los tratamientos hubo un número ejemplares que no progresaron en el desarrollo y nunca alcanzaron el clímax metamórfico, por lo cual se decidió interrumpir las exposiciones cuando el 85% de los

ejemplares alcanzaron el E.45-46 en cada tratamiento. La comparación del tiempo hasta el final de la metamorfosis por métodos estadísticos no mostró diferencias significativas entre tratamientos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Piazza (2006), quien no registró un efecto del OF sobre el tiempo hasta finalizar la metamorfosis en larvas de *R. arenarum* expuestas a partir del E.26. Sin embargo, contrastan con los correspondientes a otras investigaciones en las que la exposición a otros contaminantes estrogénicos retrasaron o, por el contrario, aceleraron el tiempo hasta alcanzar el clímax metamórfico (Hogan *et. al*, 2008; Brodeur *et. al*, 2009).

El tamaño (LHC) de los individuos que alcanzaron el E.45-46 no mostró diferencias significativas entre tratamientos. Nuevamente, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Piazza (2006), quien no registró un efecto del OF sobre el tamaño de ejemplares metamórficos de *R. arenarum* expuestos a partir del E.26.

El NF es un compuesto estrogénico comúnmente presente en el ambiente acuático, por lo cual podría afectar la diferenciación sexual de las especies de anuros, sobre todo cuando este proceso ocurre durante la etapa larval, como es el caso de *P. santafecinus*. Sin embargo, la exposición a concentraciones ecológicamente relevantes (1 µg/L y 10 µg/L) e incluso a concentraciones elevadas subletales (100 µg/L) de NF no tuvo efectos sobre el desarrollo gonadal de la especie. Las gónadas de los individuos tratados mostraron características anatómicas e histológicas semejantes a las de los individuos control, a la vez que no se registraron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto a las proporciones de sexos, ni la presencia de intersexos gonadales. La exposición a 10 µg/L E₂ (control positivo) tuvo por el contrario un marcado efecto feminizante, produciendo la diferenciación ovárica en el 100% de los individuos tratados. Estos resultados indican que en *P. santafecinus*, las gónadas en diferenciación son sensibles a la acción de un estrógeno fuerte como el E₂, mientras que no responden a xenobióticos con menor potencia estrogénica como el NF. Por lo tanto, se infiere

que el NF y otros xenoestrógenos débiles no ejercerían una acción estrogénica a nivel gonadal en esta especie, al menos en las concentraciones usualmente halladas en el ambiente.

Piazza (2006) observó una respuesta similar en larvas de *R. arenarum*, en las que las características macroscópicas y microscópicas de las gónadas de los individuos expuestos a OF resultó semejante a las de los controles, mientras que la exposición a E₂ resultó en una proporción significativamente mayor de hembras, sumado a la aparición ocasional de fenotipos gonadales intersexo (ovotestis). Por su parte, Mackenzie *et. al* (2003) comprobaron que la exposición de larvas de *Lithobates pipiens* y *Rana sylvatica* a E₂ y NF en concentraciones semejantes a las empleadas en este estudio indujo una elevada proporción de hembras en los tratamientos con E₂ y una alta incidencia de intersexos gonadales en los tratamientos con NF.

Los resultados expuestos sugieren que la sensibilidad a los mecanismos de acción de los estrógenos ambientales varía en las distintas especies de anfibios anuros, por lo cual resulta importante continuar con los estudios sobre los efectos de xenoestrógenos y otros disruptores endocrinos sobre el desarrollo gonadal y la diferenciación sexual dentro del taxón.

2.3. Concentraciones reales de NF

En los estudios en los que se emplean diseños de exposición semiestática, la diferencia entre las concentraciones nominales y las concentraciones reales del compuesto ensayado suelen ser notables. En este estudio, la concentración de NF disminuyó a un 49-74 % de la concentración inicial en el término de 24 h y alcanzó valores del 41-55 % al cabo de 48 h (tiempo correspondiente a la frecuencia de renovación de las soluciones). Una tendencia similar se evidenció en otras investigaciones en las que se emplearon métodos semiestáticos de exposición a compuestos estrogénicos (incluyendo NF, OF y E₂), registrándose descensos del 50 % o más en las concentraciones reales al cabo de 48 h (Gray & Metcalfe, 1997; Gray

et. al, 1999a, 1999b; Kinnberg *et. al*, 2000; Metcalfe *et. al*, 2001; Balch & Metcalfe, 2006, Meijide *et. al*, 2016). La caída en las concentraciones de estos compuestos en las soluciones de ensayo puede deberse a adsorción a las paredes del recipiente, fotodegradación, degradación microbiana y metabolización por los organismos de ensayo (Ekelund *et. al*, 1993; Ahel *et. al*, 1994; Lewis & Lech, 1996).

A diferencia de los sistemas de flujo continuo, los sistemas semiestáticos resultan en una exposición de tipo pulsátil, lo cual frecuentemente se asemeja a lo que sucede en el ambiente natural cuando la contaminación es causada por descargas puntuales sobre los cuerpos de agua. De este modo, la exposición regular por pulsos resulta ambientalmente relevante, ya que los organismos acuáticos no suelen estar expuestos a niveles constantes de contaminantes.



CONCLUSIONES

- ✓ *Physalaemus santafecinus* es una especie con un patrón de diferenciación sexual de tipo diferenciado, en la cual los esbozos gonadales se diferencian directamente en ovarios o testículos.

- ✓ La diferenciación histológica de las gónadas ocurre durante la etapa de prometamorfosis, en el E.34 los ovarios y en el E.36 los testículos, correspondiendo al tipo básico de desarrollo gonadal.

- ✓ En relación a su desarrollo somático, *P. santafecinus* presenta un desarrollo gonadal de tipo básico.

- ✓ *P. santafecinus* constituye un buen modelo para la realización de estudios del efecto de disruptores endócrinos sobre a diferenciación sexual de organismos acuáticos debido a que la diferenciación de las gónadas ocurre durante el período larval.

- ✓ El valor de toxicidad letal incipiente para larvas en E.25 luego de 168 h de exposición se ubicó en el rango 150-175 µg/L, correspondiente a los valores de NOEC y LOEC, respectivamente.

- ✓ La exposición a concentraciones subletales de NF no tuvo efecto sobre el desarrollo gonadal ni la diferenciación sexual de la especie, a diferencia del E₂, el cual evidenció una notable acción feminizante.



BIBLIOGRAFÍA

Adkins-Regan, E. 1987. Hormones and sexual differentiation. In "Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles". (D.O. Norris and R.E. Jones, Eds). Plenum, New York. Pp. 1-29.

Agostini, M.G. & P.A. Burrowes. 2015. Infection patterns of the chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, on anuran assemblages in agro-ecosystems from Buenos Aires Province, Argentina. *Phylomedusa: Journal of Herpetology* 142: 113-126.

Agostini, M.G.; A. Cortelezzi; I. Berkunsky; G. Soler & P. Burrowes. 2015. First record of *Batrachochytrium dendrobatidis* infecting threatened populations of Tandilean Red-belly toad (*Melanophryniscus* aff. *montevidensis*) in Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86: 826-828.

Ahel, M.; J. McEvoy & W. Giger. 1994. Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environmental Pollution*. 79: 243-248.

Akmentins, M.S. & D.E. Cardozo. 2010. American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) invasion in Argentina. *Biological Invasions* 12: 735-737.

Alford, R.A.; P.M. Dixon & J.H. Pechmann. 2001. Ecology: Global amphibian population declines. *Nature* 412: 499-500.

APHA. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater (18th ed). American Public Health Association. Washington DC.

Arias Álvarez, M.; R.M. García & P.L. Lorenzo. 2007. Desarrollo folicular en la coneja. *ITEA* 103(4):173-185.

Aronzon, C.M.; M.T. Sandoval; J. Herkovits & C.S. Pérez-Coll. 2011. Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology* 26 (4): 373-381.

Aronzon, C.M.; P.A. Babay & C.S. Pérez-Coll. 2014. Developmental toxicity and risk assessment of nonylphenol to the South American toad, *Rhinella arenarum*. Environmental toxicology and pharmacology 38: 634–642.

Arellano, M.L.; D.P. Ferraro; M.M. Steciow & E.O. Lavilla. 2009. Infection by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in the yellow belly frog (*Elachistocleis bicolor*) from Argentina. The Herpetological Journal 19: 217-220.

Arukwe, A. & A. Goksoyr. 1998. Xenobiotics, xenoestrogens and reproduction disturbances in fish. Sarsia 83: 225-241.

Babay, P.A.; R.F. Itria; E.E. Romero Ale; E.T. Becquart & E.A. Gautier. 2014. Ubiquity of endocrine disruptors nonylphenol and its mono- and di-ethoxylates in fresh water, sediments, and biosolids associated with high and low density populations of Buenos Aires, Argentina. Clean Soil Air Water 42: 731-737.

Bach, N.C. 2018. Efectos de herbicidas sobre la diferenciación sexual de *Leptodactylus latrans*. Tesis de Doctorado. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 195 pp.

Bai, Y.; X.Y. Li; Z.J. Liu & Y.H. Zhang. 2017. Effects of octylphenol on the expression of StAR, CYP17 and CYP19 in testis of *Rana chensinensis*. Environmental Toxicology and Pharmacology 51: 9-15.

Balch, G. & C. Metcalfe. 2006. Developmental effects in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to nonylphenol ethoxylates and their degradation products. Chemosphere 62: 1214–1223.

Barrasso, D.A.; R. Cajade; S.J. Nenda; G. Baloriani & R. Herrera. 2009. Introduction of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Anura: Ranidae) in natural and modified environments: an increasing conservation problem in Argentina. South American Journal of Herpetology 4: 69-75.

Barrio, A. 1965. El género *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) en la Argentina. *Physis* 25: 421- 448.

Barrio, A. 1971. Las especies cripticas en el proceso evolutivo de los batracios anuros. En: Simposio Sobre el Proceso Evolutivo. Recientes Adelantos en Biología: 213-231.

Barriónuevo, J.S. & L.M. Ponssa. 2008. Decline of three species of the genus *Telmatobius* (Anura: Leptodactylidae) from Tucumán Province, Argentina. *Herpetologica* 64: 47-62.

Bennie, D.T. 1999. Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. *Water Quality Research Journal of Canada* 34: 79–122.

Blaustein, A.R. & J.M. Kiesecker. 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters* 5: 597-608.

Blaustein, A.R.; J.M. Romansic; J.M. Kiesecker & A.C. Hatch. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* 9: 123-140.

Bögi, C.; G. Levy; I. Lutz & W. Kloas. 2002. Functional genomics and sexual differentiation in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 133: 559-570.

Britt, K.L.; J. Kerr; L. O'Donnell; M.E.E. Jones; A.E. Drummond; S.R. Davis, E.R. Simpson & J.K. Findlay. 2002. Estrogen regulates development of the somatic cell phenotype in the eutherian ovary. *The FASEB Journal* 16: 1389-1397.

Britt, K.L.; P.K. Saunders; S.J. McPherson; M.L. Misso; E. R. Simpson & J. K. Findlay. 2004. Estrogen Action on Follicle Formation and Early Follicle Development. *Biology of Reproduction* 71: 1712-1723.

Brodeur, J.C; G.Svartz; C.S. Perez-Coll; D.J.G. Marinob & J. Herkovits. 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 9: 161–170.
- Brusquetti, F.; F. Netto & N. Scott.** 2009. *Physalaemus santafecinus* Barrio, 1965 (Anura, Leiuperidae) en la República Del Paraguay. Cuaderno de Herpetología 23 (1): 63-65.
- Burkhart, M.N.; J.L. Juengel, P.R. Smith, D.A. Heath, G.A. Perry, M.F. Smith & H.A. Garverick.** 2010. Morphological development and characterization of aromatase and estrogen receptors alpha and beta in fetal ovaries of cattle from days 110 to 250. Animal Reproduction Science 117: 43–54.
- Carezzano, F.J. & M.R. Cabrera.** 2010. Morfohistología del testículo de *Physalaemus biligonigerus* (Amphibia, Leiuperidae) en un ecosistema agrícola. Boletín Asociación Herpetológica Española 21: 39-42.
- Carriger, J.F.; T.C. Hoang; G.M. Rand; P.R. Gardinali & J. Castro.** 2011. Acute toxicity and effects analysis of endosulfan sulfate to fresh water fish species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 60: 281–289.
- Céspedes, R.; M. Petrovic; D. Raldua; U. Saura; B. Pina; S. Lacorte; P. Viana; D. Barceló.** 2004. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry 378: 697–708.
- Chang, C.Y. & E. Witschi.** 1956. Genic control and hormonal reversal of sex determination in *Xenopus laevis*. Society for Experimental Biology and Medicin 93: 140-144.
- Chang, L.T.; N.W. Yu; C.Y. Hsu & H.W. Liu.** 1996. Gonadal transformation in male *Rana catesbeiana* tadpoles intraperitoneally implanted with estradiol capsules. General and Comparative Endocrinology 102: 299-306.
- Chardard, D. & C. Dournon.** 1999. Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the

- new *Pleurodeles waltl*. Journal of Experimental Zoology 283: 43-50.
- Chardard, D.; G. Desvages; C. Pican & C. Dournon.** 1995. Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. General and Comparative Endocrinology 99: 100-107.
- Chardard, D.; S. Kuntz; A. Chesnel & S. Flament.** 2003. Effects of androgens on sex differentiation of the urodele *Pleurodema waltl*. Journal of Experimental Zoology 296: 46-55.
- Cheng, T.H.** 1932. The germ cell history of *Rana cantabrigensis*. (Baird): I. Germ cell origin and gonad formation. Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie 16: 497-541.
- Colborn, T. & C. Clement.** 1992. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. Princeton: Princeton Scientific Publishing. 403 pp.
- Collins, J.P. & A. Storfer.** 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. Diversity and distributions 9: 89-98.
- Crisp, T.M.; E.D. Clegg; R.L. Cooper; W.P. Wood; D.G. Anderson; K.P. Baetcke; J.L. Hoffmann; M.S. Morrow; D.J. Rodier; J.E. Schaeffer; L.W. Touart; M.G. Zeeman & Y.M. Patel.** 1998. Environmental endocrine disruption: An effects assessment analysis. Environmental Health Perspectives 106: 11-56.
- Davidson, C.; H. Bradley Shaffer & M.R. Jennings.** 2001. Declines of the California red-legged frog: climate, UV-b, habitat, and pesticides hypotheses. Ecological Applications 11: 464-479.
- de Cuevas, M.; M.A. Lilly & A.C. Spradling.** 1997. Germline cyst formation in *Drosophila*. Annual Reviews of Genetics 31: 405-28.

- de Oliveira, C.; C. Zanetoni & R. Zieri.** 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). Revista Chilena de Anatomía 20 (3): 263-268.
- Delgado, C.S., G.S. Natale; R.H. Herrera & D.A. Barrasso.** 2012. First Record of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leiuperidae) for Buenos Aires province, Argentina. Herpetological Review 43: 84–85.
- Devlin, R. & Y. Nagahama.** 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture 208: 191-364.
- Duarte-Guterman, P.; V.S. Langlois; K. Hodgkinson; B.D. Pauli; G.M. Cooke; M.G. Wade & V.L. Trudeau.** 2009. 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.
- Duré, M.I.** 1998. Alimentación de *Physalaemus santafecinus* Barrio, 1965 (Anura, Leptodactylidae). Facena 14: 45-52.
- Duré, M.I., A.I. Kehr, E.F. Schaefer & F. Marangoni.** 2008. Diversity of amphibians in rice fields from northeastern Argentina. Interciencia 33: 523-527.
- Eggert, C.** 2004. Sex determination: the amphibian models. Reproduction Nutrition Development 44: 539-549.
- Ekelund, R.; A. Bergman; A. Granmo & M. Berggren.** 1990. Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals. A re-evaluation. Environmental Pollution 64: 107-120.
- Ekelund, R.; A. Granmo; K. Magnusson; M. Berggren & A. Bergman.** 1993. Biodegradation of 4-nonylphenol in seawater and sediment. Environmental Pollution 79: 59–61.
- Elorriaga, Y.; D.J. Marino; P. Carriquiriborde & A.E. Ronco.** 2013. Human pharmaceuticals in wastewaters from urbanized areas of Argentina. Bulletin of

- Environmental Contamination and Toxicology 90: 397-400.
- Fabrezi, M.; S.I. Quinzio & J. Goldberg.** 2010. The ontogeny of *Pseudis platensis* (Anura, Hylidae): Heterochrony and the Effects of Larval Development on Postmetamorphic Life. Journal of Morphology 271: 496-510.
- Falconi, R.; S. Petrini; A. Quaglia & F. Zaccanti.** 2001. Fine structure of undifferentiated gonads in *Rana dalmatina* tadpoles. Italian Journal of Zoology, 68: 15-21.
- Falconi, R.; D. Dalpiaz & F. Zaccanti.** 2004. Ultrastructural aspects of gonadal morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia, Anura) 1. Sex differentiation. Journal of Experimental Zoology 301(A): 378-388.
- Ferrara, F.; E. Funari; E. De Felip; G. Donati; M.E. Traina & A. Mantovani.** 2001. Alchilfenoli: valutazione dei rischi per gli ecosistemi acquatici e per la salute umana con particolare riferimento agli effetti endocrini. Annali dell'Istituto Superiore di Sanita, 37: 615-625.
- Finney, D.J.** 1971. Probit analysis (3rd ed). London: Cambridge University Press: 333 pp.
- Flament, S.** 2016. Sex reversal in amphibians. Sexual Development 10: 267-278.
- Flament, S.; D. Chardard; A. Chesnel & H. Dumond.** 2011. Sex Determination and Sexual Differentiation in Amphibians. En: Norris, D. O. and K. H. Lopez. Hormones and Reproduction of Vertebrates, Vol 2: Amphibians. Academic Press ELSEVIER. United States of America: 1-19.
- Fox, S.F.; A.L. Greer; R. Torres-Cervantes & J.P. Collins.** 2006. First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. Diseases of Aquatic Organisms 72: 87-92.
- Franchi, L.L.; A.M. Mandl & S. Zuckerman.** 1962. The development of the ovary and the process of oogenesis. En S. Zuckerman (ed.). *The Ovary* 1, New York: Academic Press: 1-88.

Fry, D.M. & C.K. Toone. 1989. DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* 231: 919-924.

Gallardo, J.M. & E. Varela de Olmedo. 1992. *Anfibios de la República Argentina: ecología y comportamiento*. Fauna de agua dulce de la República Argentina. PROFADU (CONICET): 166.

Gallien, L. 1953. Inversion totale du sexe chez *Xenopus laevis* à la suite d'un traitemen gynogéne par le benzoate d'oestradiol, administré pendant la vie larvaire. *C.R. Academie Sciences Paris* 240: 1565-1566.

Gallien, L. 1962. Comparative activity of sexual steroids and genetic constitution in sexual differentiation of amphibian embryos. *General and Comparative Endocrinology*, Supplement: 346-355.

Ghirardi, R.; M.G. Perotti; M.M. Steciow; M.L. Arellano & G.S. Natale. 2011. Potential distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Argentina: implications in amphibian conservation. *Hydrobiologia* 659: 111-115.

Ghirardi, R.; M.G. Levy; J.A. López; V. Corbalán; M.M. Steciow & M.G. Perotti. 2014. Endangered amphibians infected with the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in austral temperate wetlands from Argentina. *The Herpetological Journal* 24: 129-133.

Gilbert, S.F. 2010. *Developmental Biology*. 9^a Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.

Gillesby, B.E. & T.R. Zacharewski. 1998. Exoestrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 3-14.

Goldberg J. 2015. Gonadal Differentiation and Development in the Snouted Treefrog, *Scinax fuscovarius* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Journal of Herpetology* 49 (3): 468-478.

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

Gramapurohit, N.P.; B.A. Shanbhag & S.K. Saidapur. 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.A. & C.D. Metcalfe. 1997. Induction of testis-ova in japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1082–1086.

Gray, M.A.; K.L. Teather & C.D. Metcalfe. 1999a. Reproductive success and behaviour of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 2586–2594.

Gray, M.A.; A.J. Niimi & C.D. Metcalfe. 1999b. Factors affecting the development of testis-ova in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to octylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 1835–1842.

Guilette, L.J. Jr & D.A. Crain. 1996. Endocrine-disrupting contaminants and reproductive abnormalities in reptiles. *Toxicology Communications* 5: 381-399.

Haczkiewicz, K. & M. Ogielska. 2013. Gonadal sex differentiation in frogs: how testes become shorter than ovaries. *Zoological Science* 30: 125-134.

Hayes, T.B. 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *Journal Experimental Zoology* 281: 373-399.

Hayes, T.B. & K.P. Menendez. 1999. The effect of sex steroids on primary and secondary sex differentiation in the sexually dichromatic reed frog (*Hyperolius argus*. Hyperolidae) from the Arabuko Sokoke forest of Kenya. *Geneneral and Comparative Endocrinology* 115: 188-199.

Hayes, T.; A. Collins; M. Lee; M. Mendoza; N. Noriega; A. Stuart & A. Vonk. 2002.

Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 5476-5480.

Herkovits, J. & L.A. Helguero. 1998. Copper toxicity and copper-zinc interactions in amphibian embryos. The Science of the Total Environment 221: 1-10.

Herrera, R.A.; M.M. Steciow & G.S. Natale. 2005. Chytrid fungus parasitizing the wild amphibian *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) in Argentina. Diseases of Aquatic Organisms 64: 247-252.

Hogan, N.S.; P. Duarte; M.G. Wade; D.R.S. Lean & V.L. Trudeau. 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.

Houlihan, J.E.; C.S. Findlay; B.R. Schmidt; A.H. Meyer & S.L. Kuzmin. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. Nature 404: 752-755.

Hsu, C. & H. Lyang. 1970. Sex Races of *Rana catesbeiana* in Taiwan. Herpetologica 26: 214-221.

Hutler Wolkowicz, I.; J. Herkovits & C. Pérez Coll. 2011. Stage-dependent toxicity of Bisphenol A on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) embryos and larvae. Environmental Toxicology.

Humphrey, R.R. 1925. The primordial germ cells of *Hemidactylum* and other amphibian. Journal of Morphology 41 (1): 1-43.

ILAR. Institute for Laboratory Animal Research. 2011. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, National Academies Press. 220 pp.

IRAM 29112 (2008). Calidad ambiental - Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce. Método semiestático. Instituto

Argentino de Normalización y Certificación. 23 pp.

Iwasawa, H. 1969. Gonadal development in young frogs of *Rana ornativentris*, with special reference to sex differentiation and sex ratio. *Annotationes Zoologicae Japonese* 42: 183-192.

Iwasawa, H. & K. Yamaguchi. 1984. Ultrastructural study of gonadal development in *Xenopus laevis*. *Zoological Science Japan* 1: 591-600.

Iwasawa, H.; T. Maruyama & S. Tsukada. 1979. Relation between the time of androgen administration and the testicular differentiation of the female gonad in *Rhacophorus arboreus*. *Science Report Niigata University Series D (Biology)* 16: 29-34.

Jamil, A.E.; S. Magre; A. Mazabraud & M. Penrad-Mobayed. 2008. Early aspects of gonadal sex differentiation in *Xenopus tropicalis* with reference to an antero-posterior gradient. *Journal of Experimental Zoology: Ecological Genetics and Physiology* 309A (3): 127–137.

Jobling, S. & J.P. Sumpter. 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic in to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 27: 361-372.

Jobling, S.; D. Sheahan; J.A. Osborne; P. Matthiessen & J. Sumpter. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 194-202.

Jobling, S.; M. Nolan; C. R. Tyler; G. Brighty & J.P. Sumpter. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology* 32: 2498-2506.

Jofré, M.B.; R.I. Antón & E. Caviedes-Vidal. 2012. Lead and cadmium accumulation in anuran amphibians of a permanent water body in arid Midwestern Argentina. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 2889-2897.

Juengel, J.L.; D.A. Heath; L.D. Quirke & K.P. McNatty. 2006. Oestrogen receptor a and

- b, androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. *Reproduction* 131: 81–92.
- King, H.D.** 1908. The oogenesis of *Bufo lentiginosus*. *Journal of Morphology* 19: 369-438.
- Kinnberg, K.; B. Korsgaard; P. Bjerregaard & Å. Jespersen.** 2000. Effects of Nonylphenol and 17b-estradiol on Vitellogenin Synthesis and Testis Morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus*. *The Journal of Experimental Biology* 203: 171–181.
- Kloas, W.; I. Lutz & R. Einspanier.** 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*. *Science of the Total Environment* 225: 59-68.
- Kloc, M.; S. Bilinski; M.T. Dougherty; E.M. Brey & L.D. Etkin.** 2004. Formation, architecture and polarity of female germline cyst in *Xenopus*. – *Developmental Biology* 266:43-61.
- Knudsen, F.R. & T.G. Pottinger.** 1999. Interaction of endocrine disrupting chemicals, singly and in combination, with estrogen-androgen-, and corticosteroid-binding sites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 44: 159-170.
- Kolpin, D.W.; E.T. Furlong; M.T. Meyer; E.M. Thurman; S.D. Zaugg; L.B. Barber & H.T. Buxton.** 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36: 1202-1211.
- Lajmanovich, R.C.; M.T. Sandoval & P.M. Peltzer.** 2003. Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70: 612–618.
- Lajmanovich, R.C.; A.M. Attademo; P.M. Peltzer; C.M. Junges & M.C. Cabagna.** 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.; C.M. Junges; A.M. Attademo; P.M. Peltzer; M.C. Cabagna & A. Basso.** 2013. Individual and Mixture Toxicity of Commercial Formulations Containing Glyphosate, Metsulfuron-Methyl, Bispyribac-Sodium, and Picloram on *Rhinella arenarum* Tadpoles. Water Air Soil Pollut 224: 1404.
- Lambert, M.R.; A.B. Stoler; M.S. Smylie; R.A. Relyea & D.K. Skelly.** 2016. Interactive effects of road salt and leaf litter on wood frog sex ratios and sexual size dimorphism. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 74: 141-146.
- Langlois, V.S.; A.C. Carew; B.D. Pauli; M.G. Wade; G.M. Cooke & V.L. Trudeau.** 2010. Low levels of the herbicide atrazine alter sex ratios and reduce metamorphic success in *Rana pipiens* tadpoles raised in outdoor mesocosms. Environmental Health Perspectives 118(4): 552.
- Lavilla, E.O.** 2001. Amenazas, declinaciones poblacionales y extinciones en anfibios argentinos. Cuadernos de Herpetología 15: 59-82.
- Lavilla, E.O. & H. Heatwole.** 2010. Status of amphibian conservation and decline in Argentina. Amphibian Biology 9: 30-78.
- Lavilla, E.O.; M.L. Ponssa; D. Baldo; N. Basso; A. Bosso; J. Céspedes; J.C. Chebez; J. Faivovich; L. Ferrari; R. Lajmanovich; J.A. Langone; P. Peltzer; C. Úbeda; M. Vaira & F. Vera Candioti.** 2000. Capítulo 2. Categorización de los anfibios de Argentina. En: Lavilla, E.O.; E. Richard & G.J. Scrocchi (eds.). Categorización de los Anfibios y Reptiles de la República Argentina. Asociación Herpetológica Argentina, San Miguel de Tucumán.
- Lavilla, E.; J. Barriónuevo & J. Baldo.** 2002. Los anfibios insuficientemente conocidos de Argentina. Una reevaluación. Cuadernos de Herpetología 16 (2): 99-118.
- Lavilla, E.; A. Kwet; J. Langone; J. Faivovich & R. Lajmanovich.** 2004. *Physalaemus*

- santafecinus*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3. www.iucnredlist.org.
- Lewis, S.K. & J.J. Lech.** 1996. Uptake, disposition, and persistence of nonylphenol in rainbow trout. *Xenobiotica* 26: 813–819.
- Lopez, K.** 1989. Sex differentiation and early gonadal development in *Bombina orientalis* (Anura: Discoglossidae). *Journal of Morphology* 199 (3): 299-311.
- Lutz, I. & W. Kloas.** 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *Science of the Total Environment* 225: 49-57.
- Mackenzie, C.M.; M. Berrill; C. Metcalfe & B.D. Pauli.** 2003. Gonadal differentiation in frogs exposed to estrogenic and antiestrogenic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (10): 2466-2475.
- Mali, P.V. & N.P. Gramapurohit.** 2015. Pattern of gonadal differentiation and development up to sexual maturity in the frogs, *Microhyla ornata* and *Hylarana malabarica*: A comparative study. *Journal of Experimental Zoology* 323(A): 666-678.
- Mann, R.M. & J.R. Bidwell.** 2000. Application of the FETAX protocol to assess the developmental toxicity of nonylphenol ethoxylate to *Xenopus laevis* and two Australian frogs. *Aquatic Toxicology* 51: 19-29.
- Marlow, F.L.** 2010. Oogenesis: From Germline Stem Cells to Germline Cysts. *In Maternal Control of Development in Vertebrates: My Mother Made Me Do It!* Edited by Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael. Available.
- Matova, N. & L. Cooley.** 2001. Comparative aspects of animal oogenesis. *Developmental Biology* 231(2): 291-320.
- Mazzoni, T.S.; H.J. Grier & I. Quaglio-Grassiotto.** 2010. Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio*

- (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). The Anatomical Record 293(9): 1581-606.
- McKinney, M.L. & K. McNamara.** 1991. Heterochrony: the evolution of ontogeny. Plenum Press. New York.
- Meijide, F.J.; G. Rey Vázquez; H.J. Grier; F.L. Lo Nostro & G.A. Guerrero.** 2016. Development of the germinal epithelium and early folliculogenesis during ovarian morphogenesis in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Acta Zoologica (Stockholm). 97: 18–33.
- Metcalfe, C.** 2012. Ecological Risk Assessment. Curso dictado en el IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC Argentina). Buenos Aires, Argentina.
- Metcalfe, C.D; T.L. Metcalfe; Y. Kiparissis; B.G. Koenig; C. Khan; R.J. Hughes; T.R. Croley; R.E. March & T. Potter.** 2001. Estrogenic Potency of Chemicals Detected in Sewage Treatment Plant Effluents as Determined by *in vivo* Assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20 (2): 297–308.
- Merchant-Larios, H., & I. Villalpando.** 1981. Ultrastructural events during early gonadal development in *Rana pipiens* and *Xenopus laevis*. The Anatomical Record 199. 349-360.
- Millitelo, M.; N. Bach & J.M. Pérez-Iglesias.** 2017. *Lithobates catesbeianus* (American Bullfrog). Herpetological Review, Geographic distribution 48: 807.
- Miura, I.** 2017. Sex Determination and Sex Chromosomes in Amphibia. Sexual Development. En prensa.
- Miyata, S. & T. Kubo.** 2000. In vitro effects of estradiol and aromatase inhibitor treatment on sex differentiation in *Xenopus laevis* gonads. General and Comparative Endocrinology 119: 105-110.
- Miyata, S.; S. Koike & T. Kubo.** 1999. Hormonal reversal and the genetic control of sex differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

Nakamura, M. 2009. Sex determination in amphibians. In Seminars in Cell & Developmental Biology 20: 271-282.

Nakamura, M. 2010. The mechanism of sex determination in vertebrates—are sex steroids the key-factor? Journal of Experimental Zoology A 313: 381-398.

Naylor, C.G. 1992. Environmental fate of alkylphenol ethoxylates. Soap/Cosmetics/Chemical Specialities 72: 27-31.

Newman, M.C. 2015. Fundamentals of ecotoxicology. The science of pollution. 4th Edition. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton, USA. 654 pp.

Norris, D.O. & K.H. Lopez. 2011. Hormones and reproduction of vertebrates. Vol. 2: Amphibians. 240 pp.

Ohtani, H.; I. Miura & Y. Ichikawa. 1999. Estrogen-dependent ovary differentiation opens its gate just once for a day during the development of the frog *Rana rugosa*. Proc. Internat. Symp. On “The frontiers of the Biology of Amphibia”. Hiroshima, Japan. pp. 74.

Ogielska, M. & E. Wagner. 1990. Oogenesis and Ovary Development in European green frog, *Rana ridibunda* (Pallas). I. Tadpole stages until metamorphosis. Zoologische Jahrbücher Anatomie 120: 211-221.

Ogielska, M. & A. Kotusz. 2004. Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anuran amphibians. Journal of Morphology 259 (1): 41-54.

Ottinger, M.A.; S. Pitts & M.A. Abdelnabi. 2001. Steroid hormones during embryonic development in japanese quail: plasma, gonadal, and adrenal levels. Poultry Science, 80: 795-799.

Padoa, E. 1942. Il differenziamento del sesso invertitomediante la somministrazione di ormoni sessuali e corticosurrenali ricerche con diidrofollicolina, progesterone e acetato di desossicorticosterone, in *Rana esculenta*. Pubblicazioni della Stazione Zoologica di

Napoli 19: 185-232.

Paruelo, J.M.; J.P. Guerschman; G. Piñeiro; E.G. Jobbagy; S.R. Verón; G. Baldi & S.

Baeza. 2006. Cambios en el uso de la tierra en Argentina y Uruguay: marcos conceptuales para su análisis. Agrociencia 10: 47-61.

Peltzer, P.M.; R.C. Lajmanovich; A.M. Attademo & A.H. Beltzer. 2006. Anuran diversity across agricultural ponds in Argentina. Biodiversity and Conservation 15: 3499-3519.

Pepe,G.J.; R.B. Billar; M.G. Leavitt; N.C. Zachos; J.A. Gustafsson & E.D. Albrecht. 2002. Expression of estrogen receptor α and β in the baboon fetal ovary. Biology of Reproduction 66: 1054-1060.

Pepling, M.E. 2006. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. Genesis 44(12): 622-32.

Pepling, M.E.; M. de Cuevas & A.C. Spradling. 1999. Germline cysts: a conserved phase of germ cell development? Trends in Cell Biology 9(7): 257-62.

Perez-Coll, C.S. & J. Herkovits. 1990. Stage dependent susceptibility to lead in *Bufo arenarium* embryos. Environmental Pollution 63 (3): 239-245.

Pereyra, M.O.; J.D. Baldo & E.R. Krauczuk. 2006. La "rana toro" en la selva atlántica interior Argentina: un nuevo problema de conservación. Cuadernos de Herpetología 20: 37-40.

Petrini, S. & F. Zaccanti. 1998. The effects of aromatase and 5 alpha-reductase inhibitors, antiandrogen, and sex steroids on Bidder's organ development and gonadal differentiation in *Bufo bufo* tadpoles. Journal of Experimental Zoology 280: 245-259.

Phuge, S.K. & N.P. Gramapurohit. 2013. Gonadal sex differentiation, development up to sexual maturity and steroidogenesis in the skipper frog, *Euphlyctis cyanophlyctis*. General and Comparative Endocrinology 181: 65-71.

Piazza, Y. 2006. Desarrollo gonadal y diferenciación sexual en *Bufo arenarium* (Amphibia,

Anura). Efecto de la exposición al xenoestrógeno octilfenol. DBBE, FCEN, UBA. Tesis de Licenciatura: 92 pp.

Pinto-Erazo, M.A.; J. Goldberg & A. Jerez. 2016. Gonadal development in the Neotropical high Andean frog *Dendropsophus labialis* (Amphibia: Hylidae). Cuaderno de Herpetología 30 (2): 57-68.

Piprek, R.P.; A. Pocio & J.M. Szymura. 2010. Differentiation and Development of Gonads in the Yellow-Bellied Toad, *Bombina variegate* L., 1758 (Amphibia: Anura: Bombinatoridae). Zoological Science 27(1): 47-55.

Piprek, R.P., A. Pocio; M. Kloc; J.Z. Kubiak & J.M. Szymura. 2014. Evolutionary trend for metamery reduction and gonad shortening in Anurans revealed by comparison of gonad development. The International Journal of Developmental Biology 58: 929-934.

Piprek, R.P.; M. Kloc J.P. Tassan & J.Z. Kubiak. 2017. Development of *Xenopus laevis* bipotential gonads into testis or ovary is driven by sex-specific cell-cell interactions, proliferation rate, cell migration and deposition of extracellular matrix. Developmental Biology 432 (2): 298-310.

Pyron R.A. & J.J. Wiens. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. Molecular Phylogenetics and Evolution 61: 543-583.

Quagio-Grassiotto, I.; H. Grier; T.S. Mazzoni; R.H. Nóbrega & J.P. de Arruda Amorim. 2011. Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): germline cysts, follicle formation and oocyte development. Journal of Morphology 272(11): 1290-1306.

Rabb, G.B. 1990. Declining amphibian populations. Species 13: 33-34.

Reilly, S.M.; E.O. Wiley & D.J. Meinhardt. 1997. An integrative approach to heterochrony: the distinction between interspecific and intraspecific phenomena. Biological Journal of

- the Linnean Society 60 (1): 119-143.
- Richards, C.M. & G.W. Nace.** 1978. Gynogenetic and hormonal sex reversal used in tests of the XX-XY hypothesis of sex determination in *Rana pipiens*. Growth 42: 319-331.
- Ronco, A.E.; D.J.G. Marino; M. Abelando; P. Almada & C.D. Apartin.** 2016. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. Environmental Monitoring and Assessment 188: 1-13.
- Saidapur, K.S.; N.P. Gramapurohit & B.A. Shanbhag.** 2001. Effects of sex steroids on gonadal differentiation and sex reversal in the frog, *Rana curtipes*. General and Comparative Endocrinology 124: 115-123.
- Saito, D.; C. Morinaga; Y. Aoki; S. Nakamura; H. Mitani; M. Furutani-Seiki; H. Kondoh & M. Tanaka.** 2007. Proliferation of germ cells during gonadal sex differentiation in medaka: Insights from germ cell-depleted mutant zenzai. Developmental Biology 310: 280.
- Sanabria, E.A.; G. Debandi; L.B. Quiroga; F. Martínez & V. Corbalán.** 2011. First record of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) in Mendoza province, Argentina. Cuadernos de Herpetología 25: 55-58.
- Sandoval, M.T. & M. L. Gómez.** 2010. Desarrollo y Morfología del Sistema Urogenital de *Physalaemus santafecinus* Barrio 1965 (Anura: Leiuperidae). FACENA 26: 29-41.
- Sarre, S.D.; T. Ezaz & A. Georges.** 2011. Transitions between sex-determining systems in reptiles and amphibians. Annual Review of Genomics and Human Genetics 12: 391-406.
- Saunders, P.T.K.; M.R. Millar; K. Williams; S. Macpherson; D. Harkiss; R.A. Anderson; B. Orr; N.P. Groome; G. Scobie & H.M. Fraser.** 2000. Differential Expression of Estrogen Receptor- α and β and Androgen Receptor in the Ovaries of Marmosets and Humans. Biology of Reproduction 63: 1098-1105.

- Smith, K.K.** 2003. Time's arrow: heterochrony and the evolution of development. International Journal of Developmental Biology 47: 613-621.
- Soares, A.; B. Guieysse; B. Jefferson; E. Cartmell & J.N. Lester.** 2008. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. Environment International 34: 1033–1049.
- Sone, K.; M. Hinago; A. Kitayama; J. Morokuma; N. Ueno; H. Watanabe & T. Iguchi.** 2004. Effects of 17 β-estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. General and Comparative Endocrinology 138: 228-236.
- Soto, A.M.; H. Justicia; J.W. Wray & C. Sonnenschein.** 1991. *P*-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene. Environmental Health Perspectives 92: 167-173.
- Stuart, S.N.; J.S. Chanson; N.A. Cox; B.E. Young; A.S. Rodrigues; D.L. Fischman & R.W. Waller.** 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. Science 306: 1783-1786.
- Sugita, J.; M. Takase & M. Nakamura.** 2001. Expression of Dax-1 during gonadal development of the frog. Gene 280: 67-74.
- Tabb, M.M. & B. Blumberg.** 2006. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. Molecular Endocrinology 20: 475-482.
- Tanimura, A. & H. Iwasawa.** 1986. Development of Gonad and Bidder's Organ in *Bufo japonicus formosus*: Histological Observation. . Science Reports Niigata University Series D (Biology) 23: 11-21.
- Tanimura, A. & H. Iwasawa.** 1988. Ultrastructural Observations on the Origin and Differentiation of Somatic Cells during Gonadal Development in the Frog *Rana nigromaculata*. Development Growth & Differentiation 30 (6): 681-691.
- Tanimura, A. & H. Iwasawa.** 1989. Origin of somatic cells and histogenesis in the

- primordial gonad of the Japanese tree frog, *Rhacophorus arboreus*. Anatomy and Embryology 180: 165–173.
- Tyler, C.R.; S. Jobling & J.P. Sumpter.** 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. Critical Reviews in Toxicology 28: 319-361.
- Úbeda, C. & D. Grigera.** 2007. El grado de protección de los anfibios patagónicos de Argentina. Ecología Austral 17: 269-279.
- USEPA.** 2012. Probit Analysis Program, Version 1.5. <http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm>.
- Vaira, M., Akmentins, M., Attademo, M., Baldo, D., Barrasso, D., Barriónuevo, S., Basso, N., Blotto, B., Cairo, S., Cajade, R., Cespedez, J., Corbalan, V., Chilote, P., Dure, M., Falcione, C., Ferraro, D., Gutierrez, F.R., Ingaramo, M.R., Junges, C., Lajmanovich, R., Lescano, J.N., Marangoni, F., Martinazzo, L., Martí, R., Moreno, L., Natale, G.S., Perez Iglesias, J.M., Peltzer, P., Quiroga, L., Rosset, S., Sanabria, E., Sanchez, L., Schaefer, E., Ubeda, C. & Zaracho, V.** 2012. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. Cuadernos de Herpetología 26 (Supl. 1): 131-159.
- Viertel, B. & S. Richter.** 1999. Anatomy: Viscera and Endocrines. En McDiarmid, R.W. & R. Altig (Eds.): Tadpole: The Biology of Anuran Larvae. The University of Chicago Press, London: 92-148.
- Villalpando, I. & H. Merchant-Larios.** 1990. Determination of the sensitive stages for gonadal sex-reversal in *Xenopus laevis* tadpoles. The International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.
- Vos, J.G.; E. Dybing; A. Greim; O. Ladefoged; C. Lambré; J.V. Tarazona; I. Brandt & A.D. Vethaak.** 2000. Health effects of endocrine disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. Critical Reviews in Toxicology 30: 71-133.

- Wallace, H.; G.M.I. Badawy & B.M.N. Wallace.** 1999. Amphibian sex determination and sex reversal. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 901-909.
- White, R.; S. Jobling; S.A. Hoare; J.P. Sumpter & M.G. Parker.** 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*. 135: 175-182.
- Wildner, D.D.; H. Grier & I. Quagio-Grassiotto.** 2013. Female germ cell renewal during the annual reproductive cycle in Ostariophysians fish. *Theriogenology* 79: 709–724.
- Witschi, E.** 1929. Studies on sex differentiation and determination in amphibians: I. Development and sexual differentiation of the gonads of *Rana sylvatica*. *Journal of Experimental Zoology*. 52: 235-265.
- Wylie, C.C. & T.B. Roos.** 1976. The Formation of the gonadal ridge in *Xenopus laevis*: III. The behavior of isolated primordial germ cells *in vitro*. *Journal of Embryology Experimental Morphology* 35: 149-157.
- Wylie, C.C. M. Bancroft & J. Heasman.** 1976. The Formation of the gonadal ridge in *Xenopus laevis*: II. A scanning electron microscope study. *Journal of Embryology Experimental Morphology* 35: 139-148.
- Ying, G.G.; B. Williams & R. Kookana.** 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates- a review. *Environment International* 28: 215-226.
- Yoshikura, M.** 1962. Effects of estrogens on the gonads of hypophy-sectomized frog larvae, with special reference to the time factor in the responses of sex primordial. *Kunamoto Journal of Science* 6: 13-51.
- Yoshimoto, S. & M. Ito.** 2011. A ZZ/ZW-type sex determination in *Xenopus laevis*. *The FEBS Journal* 278: 1020-1026.
- Young, B.E.; K.R. Lips; J.K. Reaser; R. Ibáñez; A.W. Salas; J.R. Cedeño; L.A. Coloma; S. Ron; E. La Marca; J.R. Meyer; A. Muñoz; F. Bolaños; G. Chaves & A. Muñoz.** 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America.

Conservation Biology 15: 1213-1223.

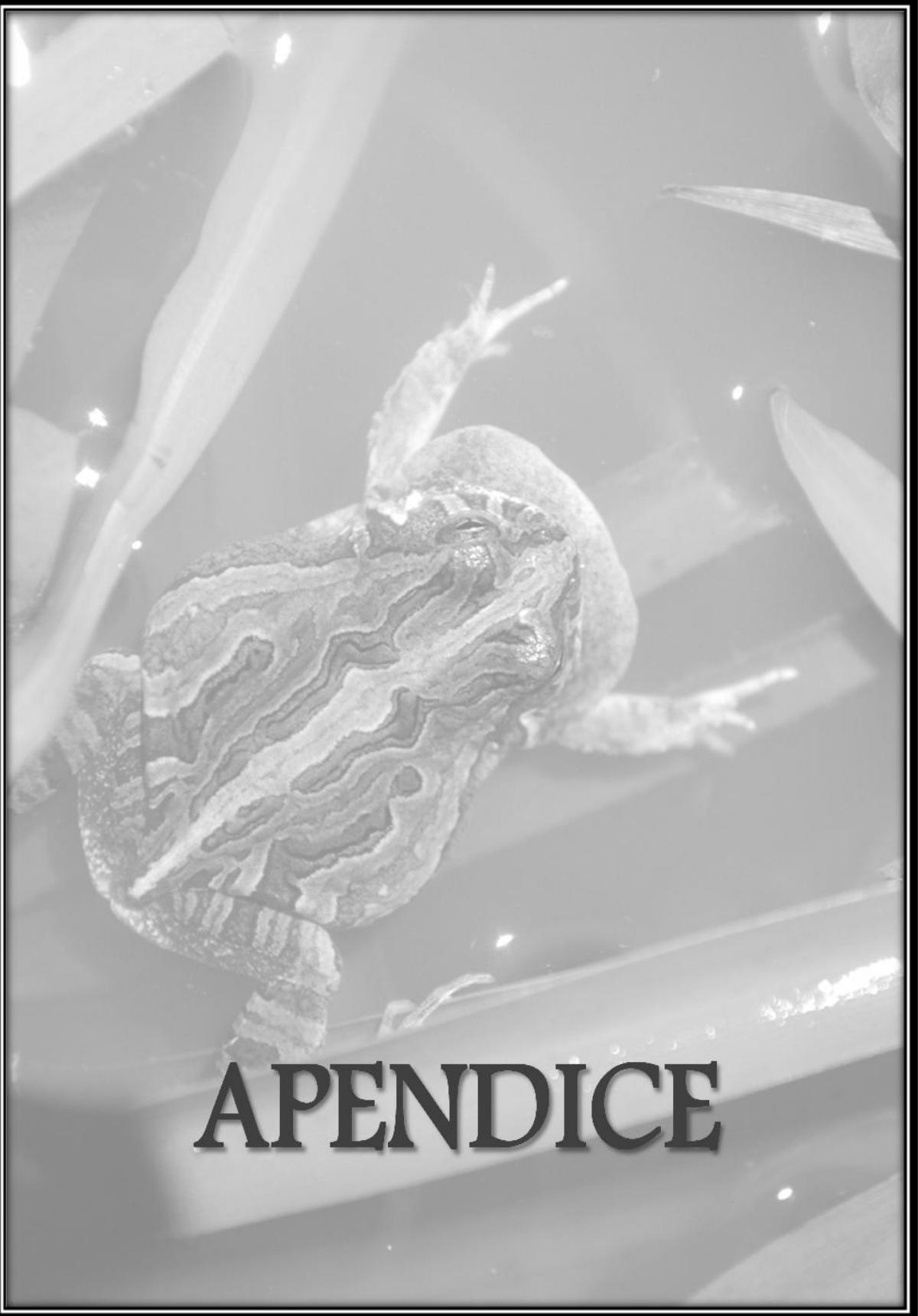
Young, B.E.; S.N. Stuart; J.S. Chanson; N.A. Cox & T.M. Boucher. 2004. Disappearing Jewels: The Status of New World Amphibian. Nature Serve. Virgina, USA.

Yu, N.W.; C.Y. Hsu; H.H. Ku; L.T. Chang & H.W. Liu. 1993. Gonadal differentiation and secretions of estradiol and testosterone of the ovaries of *Rana catesbeiana* tadpole treated with 4-hydroxyandrostenedione. The Journal of Experimental Zoology 265: 252-257.

Zaccanti, F.; S. Petrini; M.L. Rubatta; A.M. Stagni & P.P. Giorgi. 1994. Accelerated female differentiation of the gonad by inhibition of steroidogenesis in amphibia. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 107(1): 171-179.

Zaracho, V.H.; J.A. Cespedez & B.B. Alvarez. 2005. Aspectos Reproductivos de Anfibios de las provincias de Corrientes y Chaco, Argentina. Temas de la Biodiversidad del Litoral fluvial argentino II. INSUGEQ, Miscelanea. 14: 417-426.

Zaracho, V.H.; J.A. Cespedez; B.B. Alvarez & E.O. Lavilla. 2011. Anfibios de Corrientes: Guía de Campo. Fundación Miguel Lillo, Universidad Nacional del Nordeste.



APENDICE

APENDICE I

TetraColor Tropical Granules

Alimento balanceado para peces de acuario.

Ingredientes: harina de pescado, harina de soja, harina de germen de trigo, harina de trigo, gluten de maíz, harina de avena, proteína de papa, harina de camarón, levadura en polvo, gluten de trigo, fosfato monobásico de calcio, monohidrocloruro de L-lisina, lecitina, harina de algas, aceite de soja, extracto de levadura, ácido ascórbico (fuente de vitamina C), inositol, lacina, A-tocoferol-Acetato, riboflavina-5-fosfato, L-ascorbil-2-polifosfato (Vit.C estabilizada), cloruro de colina, D-pantotenato cálcico, mononitrato de tiamina, hidrocloruro de piridoxina, palmitato de vitamina A, bisulfito sódico de menadiona, ácido fólico, biotina, suplemento vitamina B12, chlecalciferol (fuente de Vit.D3), sulfato de manganeso, sulfato de zinc, sulfato ferroso, acetato de cobalto.

Colorantes: Rojo N°3.

Conservantes: etoxiquina y ácido cítrico.

Composición centesimal: proteína cruda (mín.) 47,5%. Grasa cruda (mín.) 6,5%. Fibra cruda (máx.) 2%. Humedad (máx.) 6%. Fósforo (mín) 1,5%. Vitamina C (mín.) 100 mg/kg. Omega-3 (mín.) 8000 mg/kg.

APENDICE II

PLANILLA DE REGISTRO PARA BIOENSAYOS DE TOXICIDAD LETA DEL NF EN *Physalaemus santafecinus*

Inicio del ensayo: DD / MM / AAAA - Hora: ---h - Estadio: E. 25. - [NF] SM = 5 mg/mL

n=10 ejemplares por cápsula (3 réplicas)

Renovación del medio cada 24h, alimentación 5 h antes del recambio.

	T°	Hum	Control de acetona (0,005%)			NF 125 µg/L			NF 150 µg/L			NF 175 µg/L			NF 200 µg/L			NF 225 µg/L		
			A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Tiempo de exposición (h)																				
24																				
48																				
72																				
96																				
120																				
144																				
168																				
N individuos muertos																				
Total de individuos muertos																				

PLANILLA DE REGISTRO PARA BIOENSAYOS DE EFECTOS SUBLETALES DEL NF EN *Physalaemus santafecinus*

Inicio del ensayo: DD / MM / AAAA – Hora: ---- h - Estadio: E. 25 - [NF] SM = 5 mg/mL

n=10 ejemplares por cada cápsula (3 réplicas)

Renovación del medio cada 48 h, alimentación 24 h antes del recambio.

Tº	Control			Control de acetona (0,002%)			E ₂ 10 µg/L			NF 1 µg/L			NF 10 µg/L			NF 100 µg/L		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Tiempo de exposición (días)																		
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		
7																		
8																		
9																		
10																		
.....																		

APENDICE III

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM
USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES
Version 1.5

CL50 72

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls	Predicted Proportion Responding
125.0000	30	0	0.0000	0.0000	0.0000
150.0000	30	0	0.0000	0.0000	0.0001
175.0000	30	3	0.1000	0.1000	0.0911
200.0000	30	22	0.7333	0.7333	0.7545
225.0000	30	30	1.0000	1.0000	0.9933

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 0.318
 Chi - Square for Heterogeneity
 (tabular value at 0.05 level) = 7.815

Mu = 2.281282
 Sigma = 0.028675

Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence Limits
<hr/>			
Intercept	-74.555954	13.410704	(-100.840935, -48.270973)
Slope	34.873348	5.873173	(23.361929, 46.384766)

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000

CL50 72

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	163.899	150.784	171.405
LC/EC 5.00	171.441	160.948	177.644
LC/EC 10.00	175.603	166.546	181.170
LC/EC 15.00	178.469	170.366	183.661
LC/EC 50.00	191.110	186.063	196.086
LC/EC 85.00	204.645	199.091	213.679
LC/EC 90.00	207.985	201.876	218.530
LC/EC 95.00	213.035	205.929	226.079
LC/EC 99.00	222.838	213.473	241.265

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM
USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES
Version 1.5

CL50 96

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls	Predicted Proportion Responding
125.0000	30	0	0.0000	0.0000	0.0000
150.0000	30	1	0.0333	0.0333	0.0047
175.0000	30	5	0.1667	0.1667	0.2668
200.0000	30	27	0.9000	0.9000	0.8618
225.0000	30	30	1.0000	1.0000	0.9953

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 7.308

Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 7.815

Mu = 2.264136

Sigma = 0.033894

Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence Limits
<hr/>			
Intercept	-61.799683	11.023643	(-83.406021, -40.193340)
Slope	29.503384	4.861107	(19.975615, 39.031155)

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000

CL50 96

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	153.210	139.174	161.396
LC/EC 5.00	161.578	150.242	168.355
LC/EC 10.00	166.225	156.402	172.294
LC/EC 15.00	169.437	160.634	175.079
LC/EC 50.00	183.711	178.294	188.960
LC/EC 85.00	199.189	193.177	208.924
LC/EC 90.00	203.037	196.374	214.495
LC/EC 95.00	208.876	201.044	223.205
LC/EC 99.00	220.285	209.789	240.870

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM
USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES
Version 1.5

CL50 120

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls	Predicted Proportion Responding
125.0000	30	0	0.0000	0.0000	0.0000
150.0000	30	2	0.0667	0.0667	0.0361
175.0000	30	12	0.4000	0.4000	0.4898
200.0000	30	29	0.9667	0.9667	0.9344
225.0000	30	30	1.0000	1.0000	0.9979

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 2.348

Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 7.815

Mu = 2.244008
Sigma = 0.037787

Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence Limits
<hr/>			
Intercept	-54.385681	9.307181	(-72.627754, -36.143604)
Slope	26.464117	4.139449	(18.350798, 34.577438)

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000

CL50 120

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	143.253	129.615	151.523
LC/EC 5.00	152.003	140.876	158.906
LC/EC 10.00	156.884	147.175	163.096
LC/EC 15.00	160.267	151.518	166.061
LC/EC 50.00	175.391	169.828	180.789
LC/EC 85.00	191.942	185.701	201.753
LC/EC 90.00	196.081	189.161	207.613
LC/EC 95.00	202.378	194.235	216.803
LC/EC 99.00	214.739	203.786	235.535

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM
USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES
Version 1.5

CL50 144

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls	Predicted Proportion Responding
125.0000	30	0	0.0000	0.0000	0.0011
150.0000	30	5	0.1667	0.1667	0.1333
175.0000	30	19	0.6333	0.6333	0.7053
200.0000	30	30	1.0000	1.0000	0.9755
225.0000	30	30	1.0000	1.0000	0.9994

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 1.854

Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 7.815

Mu = 2.221146
Sigma = 0.040561

Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence Limits
<hr/>			
Intercept	-49.760166	8.535229	(-66.489212, -33.031116)
Slope	24.654013	3.834347	(17.138693, 32.169334)

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000

CL50 144

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	133.902	120.371	142.174
LC/EC 5.00	142.701	131.606	149.626
LC/EC 10.00	147.626	137.921	153.866
LC/EC 15.00	151.046	142.287	156.869
LC/EC 50.00	166.397	160.801	171.831
LC/EC 85.00	183.309	176.981	193.265
LC/EC 90.00	187.555	180.523	199.286
LC/EC 95.00	194.029	185.726	208.750
LC/EC 99.00	206.778	195.552	228.127

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM
USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES
Version 1.5

CL50 168

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls	Predicted Proportion Responding
125.0000	30	0	0.0000	0.0000	0.0020
150.0000	30	6	0.2000	0.2000	0.1643
175.0000	30	20	0.6667	0.6667	0.7343
200.0000	30	30	1.0000	1.0000	0.9780
225.0000	30	30	1.0000	1.0000	0.9994

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 1.721

Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 7.815

Mu = 2.216897
Sigma = 0.041771

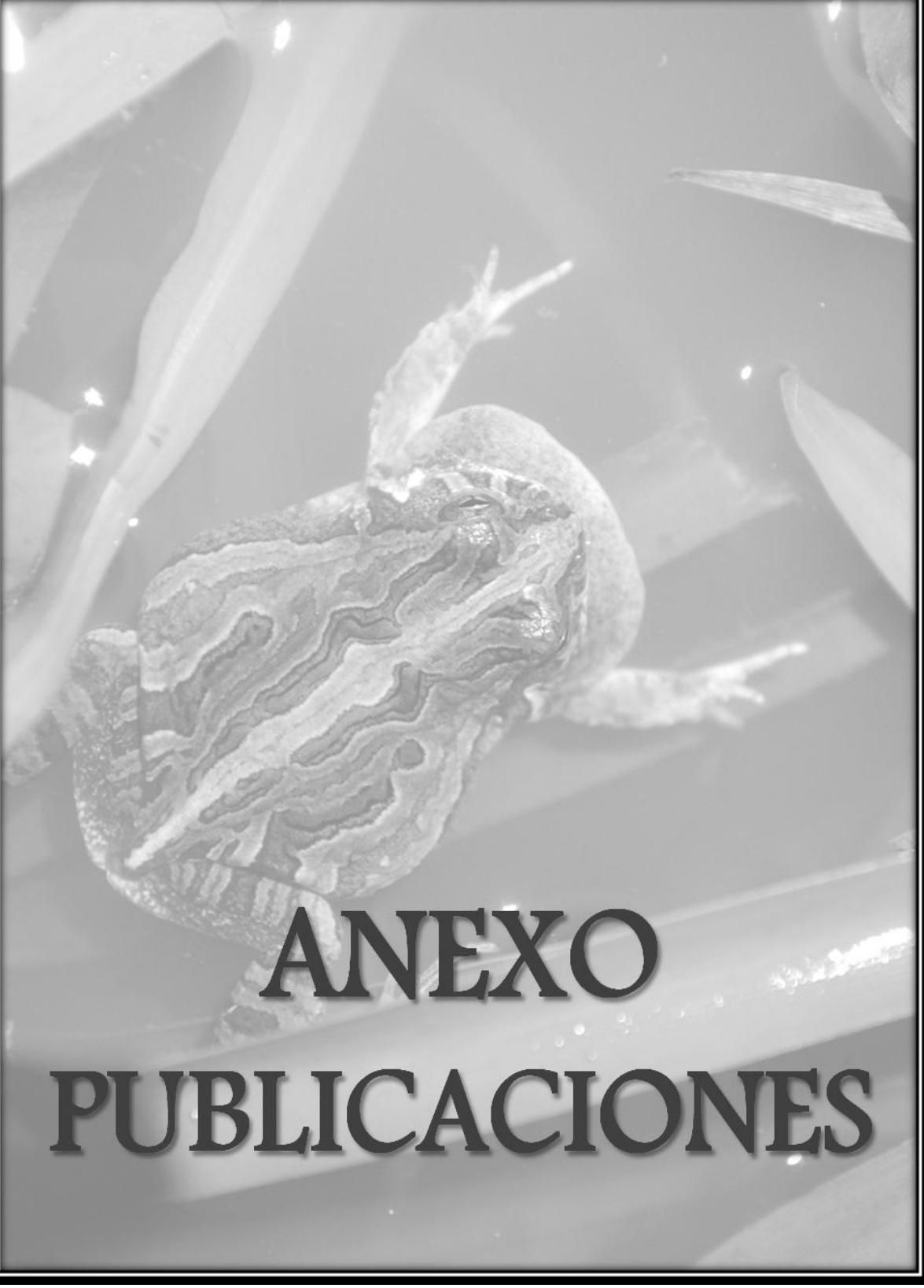
Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence Limits	
Intercept	-48.072102	8.233782	(-64.210312,	-31.933889)
Slope	23.939808	3.705314	(16.677393,	31.202223)

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000

CL50 168

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	131.742	118.121	140.105
LC/EC 5.00	140.666	129.470	147.676
LC/EC 10.00	145.668	135.863	151.986
LC/EC 15.00	149.144	140.289	155.040
LC/EC 50.00	164.777	159.118	170.257
LC/EC 85.00	182.050	175.642	192.113
LC/EC 90.00	186.394	179.265	198.267
LC/EC 95.00	193.022	184.592	207.951
LC/EC 99.00	206.096	194.664	227.816



ANEXO PUBLICACIONES

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

Publicación en Revistas Científicas

Sandoval, M.T. & **Gómez, M.L.** 2010. “Desarrollo y Morfología del Sistema Urogenital de *Physalaemus santafecinus* Barrio 1965 (Anura: Leiuperidae). *FACENA* 26: 29 – 41.

Presentaciones a Congresos y/o Reuniones Científicas

Gómez, M.L.; M.T. Sandoval & B.B. Álvarez: “**Análisis Anatómico e Histológico del Ovario en Cinco Especies de Anuros del Nordeste de Argentina**”. XIII Congreso Argentino de Herpetología, realizado del 6 al 9 de noviembre de 2012. Ciudad de Mar del Plata, Buenos Aires. XIX Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste, realizada en el Campus Universitario Resistencia entre los días 12 al 14 de Junio de 2013; Ciudad de Resistencia, Chaco.

Gómez, M.L.; M.T. Sandoval; F.J. Meijide; C. Perez Coll; B.B. Álvarez & D.M. Lombardo. “**Morfogénesis gonadal de *Physalaemus santafecinus* (Anura: Leptodactylidae)**”. I Congreso Paraguayo de Herpetología, realizado en Facultad de Ciencias Exactas y Naturales entre los días 19 al 21 de noviembre de 2014; Ciudad de San Lorenzo, República del Paraguay.

Gómez M.L.; M.T. Sandoval & B.B. Álvarez. “**Análisis e la estructura gonadal de *Physalaemus santafecinus* (Anura: Leptodactylidae) durante el periodo larval y metamorfico**”. XXI Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste, realizada en el Campus Universitario Resistencia entre los días 3 y 4 de Junio de 2015; Ciudad de Resistencia, Chaco.

Gómez, M.L.; M.T. Sandoval; F.J. Meijide; C.S. Perez Coll; B.B. Álvarez & D.M. Lombardo. “**Estructura testicular de *Physalaemus santafecinus* (Anura: Leptodactylidae) durante el periodo larval y metamórfico del ciclo de vida**”. XVI Congreso Argentino de Herpetología, realizado en

CIIDEP entre los días 29 de septiembre al 02 de octubre de 2015; Ciudad de San Miguel de Tucumán, Tucumán.

Gómez, M.L.; L.M. Curi; F.N. Abreliano; M.T. Sandoval; B.B. Álvarez & D.M. Lombardo. “**Anatomía e Histología testicular de siete especies de anuros del Nordeste de Argentina**”. XVI Congreso Argentino de Herpetología, realizado en CIIDEP entre los días 29 de septiembre al 02 de octubre de 2015; Ciudad de San Miguel de Tucumán, Tucumán.

Gómez, M.L.; M.T. Sandoval; B.B. Álvarez & D.M. Lombardo. “**Estructura testicular de *Physalaemus santafecinus* (Anura: Leptodactylidae) durante el periodo larval y metamórfico del ciclo de vida**”. XXII Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste, realizado en el Campus Universitario “Deodoro Roca”, entre los días 14 y 15 de junio de 2016; Ciudad de Corrientes.

Gómez, M.L.; F.J. Meijide; M.T. Sandoval; C.S. Perez Coll & B.B. Álvarez. “**Toxicidad aguda del nonilfenol en larvas de *Physalaemus santafecinus* (Anura: Leptodactylidae)**”. I Congreso Argentino-Paraguayo de Herpetología y XVII Congreso Argentino de Herpetología y II Congreso Paraguayo de Herpetología, realizado del 26 al 30 de septiembre de 2016; Ciudad de Posadas, Misiones, Argentina y Ciudad de Encarnación, Paraguay.

Gómez, M.L.; F.J. Meijide & C.S. Perez Coll. “**Morfohistología gonadal de renacuajos de *Physalaemus santafecinus* expuestos a Nonilfenol**”. XVIII Congreso Argentino de Herpetología, realizado del 2 al 6 de octubre de 2017; Salta, Argentina.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero darle gracias Dios y a la Virgencita de Itatí por cuidarme, protegerme, guiar me, iluminarme y acompañarme, sobre todos en los momentos de mayor adversidad, esos donde no sabes cuál es el camino correcto para seguir adelante. Pero ellos de una u otra manera supieron trazar el camino a seguir a través de todas las personas que fueron colocando en este largo camino que decidí recorrer llamado TESIS DOCTORAL.

Pero una tesis nunca es un trabajo individual, por el contrario, es un trabajo colectivo en la que recibimos colaboración, sin importar lo pequeña que sea, de muchas personas que nos rodean.

A mis directores Cristina y Fer por confiar en mí, por compartir sus conocimientos y por la enorme paciencia y dedicación para dirigir esta tesis. Así también quiero darle gracias a ambos por abrirme las puertas de sus respectivos laboratorios en la UNSAM y en la UBA, respectivamente.

A la Caro Aronzon, por orientarme en cómo realizar mis ensayos de toxicidad, después de haber metido la pata, y por mostrarme como se realizaban los cálculos de CL₅₀.

A todo el Laboratorio de Ecotoxicología Acuática, donde realice la mayor parte de los trabajos en relación a mi tesis, desde su responsable la Dra. Fabiana Lo Nstro, pasando por cada uno de los que forman parte de ese gran grupo humano: Luciana, Florencia, Ismael, Noelia y Rodrigo, quienes no han dudado en brindarme su ayuda cuando la he necesitado, por los almuerzo compartidos en el hall del cuarto piso y por las charlas en relación a nuestras tesis, conociendo un poquito lo que ellos y yo realizábamos.

A la Dra. Gladys Hermida, por facilitar la miscroscopía de su grupo de investigación para que pudiera tomar algunas de las fotografías que se han plasmado en mi tesis y por las charlas sobre histología para despejarme las dudas que se me fueron presentando.

A la Dra. Paola Babay, por todo lo que me ayudó y enseñó en cuestiones de química analítica, respondiendo siempre que necesité de su colaboración.

Acá debo hacer un punto y aparte, inspirar hondo y hacer mucha memoria porque se viene la parte más difícil de agradecer, a ellos, a mis compañeros del Laboratorio de Herpetología que fueron los que estuvieron siempre al pie del cañón para animarme y darme una palabra de aliento para que jamás baje los brazos.

A la Lic. Beatriz Álvarez, la profe Beatriz como tan cariñosamente la llamo, gracias por abrirme las puertas del laboratorio de Herpetología para que pudiera realizar todas mis investigaciones desde mis comienzos.

A Tete, ella con sus clases de Embriología Animal, allá por el 2008, hizo que me picara el bichito de la curiosidad por conocer más sobre la embriología y gracias a ella que me sugirió a los anuros como grupo a investigar. Gracias por estar para poder darme una mano y así poder conocer más sobre los anuros.

A Belu, Luli y Andre, mis compañeras de laboratorio, de congresos y de cursos (jajajajajajaja). Gracias por las charlas interminables entre risas y mates durante esas siestas en el laboratorio tratando de ver el lado positivo a lo que nos iba pasando en el transcurso de todo este camino. Así también gracias por la ayuda que me brindaron para poder concretar cada una de las cosas que me tocaba enfrentar, tanto con la estadística, en la redacción de mis datos, en la

confección de mis plantillas fotográficas, con sus sugerencias, en fin infinitas gracias chicuelas. Y principalmente gracias por su amistad.

A Migue, gracias por estar siempre a disposición para cualquier duda que fuera surgiendo sobre temas de informática.

A la Dra. María Victoria Avanza, del Laboratorio de Bromatología – Fa.C.E.N.A, y al Dr. Luciano Fusco, del Labinpro, por el préstamo de las balanzas digitales, de los laboratorios respectivos, para el pesaje del nonilfenol y las micropipetas.

Sin duda una de las partes más difíciles de esta sección es agradecer a las personas que estuvieron siempre al pie del cañón y siguiendo mis locuras, tanto familias como amigos. Lo más difícil de todo es saber por dónde empezar.

A mi madrina Any y a mi amiga Mer, gracias a ambas por abrirme las puertas de sus respectivas casas cada vez que necesite alojamiento durante mis estadías en Buenos Aires. Especialmente a vos madri, gracias por estar a mi disposición esperándome en el centro en cada regreso de la facu o en la parada del 37 en Lanús para llegar juntas a tu casa, por cada cena compartida.

Y a vos Mer, gracias por bancar a esta loquilla que venía a alterar todos tus horarios, por las charlas interminables que teníamos que darle un corte porque sino al otro día nadie nos levantaba para nuestras actividades. Gracias por ser mi psicóloga favorita, como te digo siempre, y estar con las palabras justas y claras cada vez que lo necesite.

A las chiquis del gym: Timo, Susy, Lidia, Patri, Sandra, Eli, Stefy y Rosita, por ser mí desenchufe en una hora de clase en el gimnasio para poder hacerme relajar cuando mi cabeza no

paraba de funcionar pensando las millones de cosas en relación a mi tesis. Y gracias también por preocuparse y preguntar cómo iban las **ranitas**.

A Clary, Ceci y Fer, gracias por esa amistad de años y por estar siempre con palabras de aliento y sugerencias en cada **merienda** compartida. Y obvio gracias por las risas interminables y por regalarme los sobris del corazón más hermosos que tengo.

A Sabri, Caro, Emy y Fabián, mis amigos de toda la vida, gracias por siempre preocuparse por saber cómo estaba y como venia esa tesis y las **ranitas**.

A mi amiga Analia, gracias por las ocurrencias cada vez que tenías que preguntar por mis **ranitas** y por sacarme una carcajada tratando de explicarte lo que le hacía a la pobrecitas.

A mis padres Rossana y Emilio, y a mi ahijada Eliana, por dejarme ser parte de su familia y estar para lo que necesitará.

A los chicos de mi grupo de oración, por siempre estar animándome para que no bajara los brazos, y apoyándome con la oración. Pero especialmente quiero darle las gracias a Marisol, mi carachenta, y Agus por estar ahí para escucharme para desahogarme y exteriorizar todo lo que tenía guardado, a pesar de que muchas veces no comprendieran de lo que les estaba hablando y principalmente gracias por su amistad.

Gracias amor, Damián, por estar en esta última parte de mi tesis que es la escritura y corrección, y creo que la mas difícil de todas porque es donde tengo ganas de abandonar todo faltando tan poquito. Gracias por estar con un abrazo, un beso, un rato de mates y series o pelis y de risas para despejar mi mente un ratito y hacerme bajar las revoluciones. Gracias por ser mi compañero de aventuras y por el regalo más bonito que me pudiste hacer. Te Amo.

Los deje para lo último porque se merecen todo y estuvieron siempre al lado mío:

A Guille, mi cuña, gracias por estar y cuidar de Fabri durante mis ausencias.

A Clara, mi hermana, gracias por estar siempre cada vez que te necesite durante cada ausencia en mis viajes a trabajar o a los congresos. Gracias por ser la **mamá postiza** de Fabri durante todo ese tiempo.

A mis viejos, Marta y Jorge, gracias por darme la libertad de poder estudiar lo que me gustaba allá por el 2004 y con un pequeño en camino. Gracias por apoyarme en cada decisión que tome con respecto a mi carrera y por empujarme siempre para adelante a pesar de las adversidades. Gracias por estar y comprender cada ausencia durante todos estos años de tesis, por cada vuelta rápido a Corrientes para seguir trabajando porque tenía que juntar y criar mis **ranitas**.

Y finalmente el agradecimiento más importante de todos a mi primer gran amor, a vos **Hijo**. Fabri gracias por ser mi compañero, por ser mi motivación para nunca bajar los brazos, para seguir adelante a pesar de todo. Gracias por bancarte cada viaje, cada ausencia de mamá durante semanas mientras me necesitabas en las cosas del colegio. Gracias por enseñarme día a día este oficio de ser mamá; gracias por cada llamada cuando estabas necesitando que supiera algo, sabiendo que a pesar del lugar donde estuviera mamá iba a ser lo posible para resolver todo. Gracias por ser mi cómplice y mi confidente siempre y aguantar las lágrimas de mamá, muchas veces sin entender mucho que estaba pasando. Todo este logro es por y para vos, para que estés orgulloso de la mamá que tenes y para que veas plasmado en esta tesis que cada ausencia de esta mamá que te toco valió la pena.

Por último y para cerrar, no me quiero olvidar de mis estrellas favoritas que iluminaron, guiraron, acompañaron e intercedieron por mí siempre, algunas desde hace muchos años y otras desde solo algunos meses, pero estoy convencida que siempre estuvieron velando por mí, a ustedes: Doro, Negra, Verónica, Hugo y Jorge, beso grande al cielo.