

Efectos letales y subletales causados por la exposición al herbicida 2,4D sobre larvas de *Physalaemus albonotatus* (Anura, Leptodactylidae)

Curi, Lucila – Peltzer, Paola- Sandoval, María Teresa –
Lajmanovich, Rafael- Céspedes Jorge Abel

Director de Beca: (Peltzer, Paola)

Correo Electrónico: (lucilacuri@gmail.com)

Palabras Claves: (Anuros, herbicida, larvas, anormalidades)

-INTRODUCCIÓN:

En las últimas décadas se ha registrado un gran declive mundial en las poblaciones de anfibios. El uso intensivo de pesticidas, se reconoce actualmente como una de las principales causas de la disminución de los anuros en los agroecosistemas (Davidson, 2004; Beebee y Griffiths, 2005). Los agroquímicos no sólo tienen efectos letales directos, sino que también alteran procesos biológicos y ecológicos de estos vertebrados, como el crecimiento, el desarrollo y la metamorfosis (Hayes y Wu, 1995, Boone, 2008), la reproducción (Hayes et al. 2002, 2006; Tavera-Mendoza et al. 2002; Sánchez et al. 2014), entre otros.

Diversos trabajos han demostrado que estos organismos son altamente sensibles a los contaminantes ambientales, por lo que son comúnmente utilizados en estudios ecotoxicológicos, considerándose indicadores de contaminación ambiental (Wake y Vredenburg, 2008). Además, tienen una fase de vida acuática crítica donde ocurren procesos de diferenciación y desarrollo de células, órganos y sistemas que son susceptibles de alteración por agentes químicos presentes en el agua (Storrs y Semlitsch, 2008).

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) es un herbicida selectivo que se utiliza como principio activo en diversos productos comerciales y es uno de los más utilizados en el mundo (Wauchope et al. 1992). La toxicidad del 2,4D ha sido reportada en diferentes especies animales no blanco. Causa estrés oxidativo, disrupción endócrina (Rodríguez et al. 1994), bajas tasas de crecimiento, problemas reproductivos, alteración en el comportamiento y/o muerte (Rodríguez y Amín, 1991; Charles et al. 2001). A pesar de que su uso ha sido restringido en algunas provincias de nuestro país, su aplicación en algunas prácticas agrícolas sigue siendo frecuente, estando las poblaciones de anuros expuestas a su efecto tóxico.

El objetivo del trabajo fue evaluar los efectos letales y subletales de la exposición al formulado comercial (Zamba®) a base de Ácido 2,4D sobre renacuajos de *Physalaemus albonotatus* (Anura: Leptodactylidae) a partir del estadio (E) 25 de Gosner.

-MATERIALES Y MÉTODOS:

Obtención del material de estudio

Se colectaron N=2 puestas de huevos de *P. albonotatus* en charcas temporarias del Campus Universitario de la UNNE (Corrientes). Los embriones fueron mantenidos en agua declorinada y alimentados con lechuga hervida hasta alcanzar el E.25.

Ensayo Agudo: Se expusieron 10 renacuajos en E.25 por triplicado a concentraciones de 350, 700 y 1400 mg^{L-1} del formulado comercial Zamba®, y un control con agua declorinada

durante 96 h, con renovación cada 24h. Los renacuajos se mantuvieron a $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ y 16/8h fotoperiodo y no se alimentaron durante el ensayo. Cada 24 h se registró la mortalidad. La concentración letal 50 (CL50), a las 48, 72 y 96 h de exposición, y sus respectivos intervalos de confianza del 95% se calcularon utilizando el método de Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al. 1977).

Ensayo crónico: se expusieron 20 renacuajos en E.25 por duplicado a concentraciones: bajas (C1: $15\text{mg}^{\text{L}^{-1}}$, C2: $20\text{mg}^{\text{L}^{-1}}$, C3: $25\text{mg}^{\text{L}^{-1}}$, C4: $30\text{mg}^{\text{L}^{-1}}$, C5: $35\text{mg}^{\text{L}^{-1}}$); medias (C6: $100\text{mg}^{\text{L}^{-1}}$, C7: $125\text{mg}^{\text{L}^{-1}}$, C8: $150\text{mg}^{\text{L}^{-1}}$, C9: $175\text{mg}^{\text{L}^{-1}}$, C10: $200\text{mg}^{\text{L}^{-1}}$); y altas (C11: $250\text{mg}^{\text{L}^{-1}}$, C12: $275\text{mg}^{\text{L}^{-1}}$, C13: $300\text{mg}^{\text{L}^{-1}}$, C14: $325\text{mg}^{\text{L}^{-1}}$, C15: $350\text{mg}^{\text{L}^{-1}}$ del formulado y un control con agua declorinada con renovación del medio cada 48h. Las condiciones de ensayo fueron de $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura y fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad. Diariamente se alimentaron los renacuajos con lechuga hervida y se evaluó la mortalidad. El experimento culminó cuando la mayoría de las larvas tratadas con el tóxico y larvas control alcanzaron la metamorfosis.

Cada 7 días, se seleccionaron aleatoriamente 2 renacuajos de cada tratamiento y se sacrificaron por inmersión en una solución de metanosulfonato de triclaína al 0,1% siguiendo el protocolo de la Guía de Eutanasia Animal propuesto por el IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) y fueron fijados en formol al 10% o solución de Bouin. A cada ejemplar se le midió la longitud hocico-cloaca (LHC) y la longitud total (LT) con calibre digital (0,1 mm precisión) y se registró la masa corporal (M) con balanza electrónica (0,01 g de precisión). Posteriormente las larvas fueron examinadas bajo lupa estereoscópica y se identificaron y caracterizaron anomalías del desarrollo. Siguiendo lo propuesto Lenkowski et al. (2008); Krishnamurthy y Smith (2011); Peltzer et al. (2013, 2017), dichas anomalías se clasificaron como malformaciones del disco oral (MO), edema abdominal (EA), anomalías intestinales (AI) (desviación del intestino, intestinos desespiralados), disminución de la pigmentación en piel (DP), cuerpo forma de diamante (CD).

Se comprobó la normalidad y homogeneidad de la varianza de las variables analizadas previo al análisis estadístico. Se realizó un ANOVA para analizar si existen diferencias significativas en la LHC, LT, M y mortalidad entre los tratamientos. La prevalencia de malformaciones se calculó dividiendo el número de larvas con determinada anomalía por el número total de individuos analizados. Para dichos análisis se utilizó el software InfoStat/P versión 1.1, y Sigmaplot v.11.0 para realizar los gráficos.

-RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Ensayo agudo

La CL50 a las 48, 72 y 96h fue de 1040, 754 y 350mg/l de formulado comercial Zamba® respectivamente. Estos datos indican que el efecto letal del compuesto aumenta con el tiempo de exposición.

Ensayo crónico

Mortalidad: La exposición crónica a 2,4D de los renacuajos *P. albonotatus* afectó la supervivencia hasta el final del experimento y las diferencias entre los tratamientos fueron estadísticamente significativas (ANOVA, P: 0.07, F: 2.96, gl: 15). Los porcentajes de mortalidad en las concentraciones bajas, medias y altas del herbicida se resumen en los gráficos 1 (A-C). En las concentraciones bajas, la mortalidad se mantuvo constante hasta el día 34 de exposición. En las medias y altas, luego del día 13 la mortalidad aumentó a medida

que aumentaba el tiempo de exposición. Siendo muy alta la mortalidad a las 96h en las dos concentraciones mayores (300, 350 mg^{L-1}).

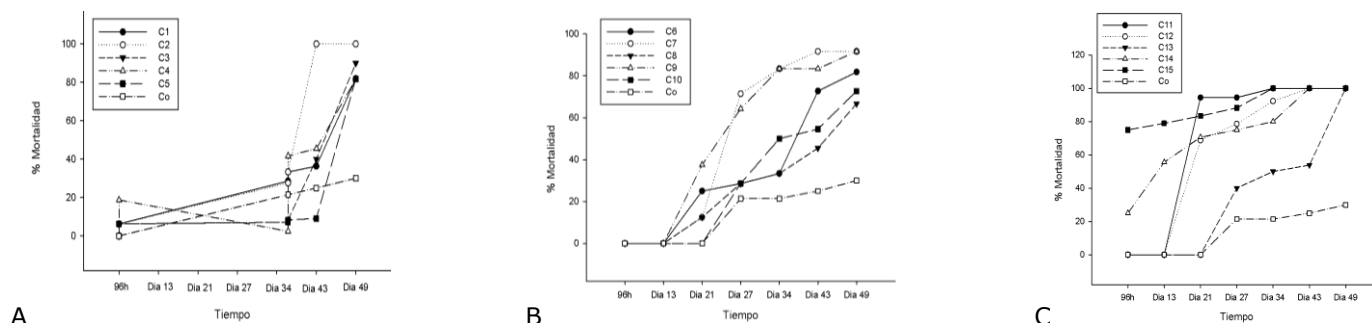


Gráfico. 1 Porcentajes de mortalidad en concentraciones bajas (A) medias (B) y altas (C).

Los valores medios de LHC, LT, M y estadios se resumen en la tabla 1. La LHC (ANOVA, P: 0.465, F: 0.99, gl: 15), LT (Kruskal Wallis, P: 0.829, H: 9.65) y M (ANOVA, P: 0.807, F: 0.67, gl: 15) no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos.

En el cuadro también se observa que solo los individuos expuestos a 20, 125, 150 y 250mg^{L-1} no se metamorfosearon hacia el final del ensayo. Las primeras larvas en alcanzar el estadio 42 fueron las larvas expuestas a 20, 25 mg^{L-1} de 2,4D alrededor del día 35 del experimento, es decir dos de las concentraciones más bajas. Y las primeras en alcanzar el estadio 45 fueron las expuestas a 25 mg^{L-1}. Los controles presentaron un proceso metamórfico más lento que los tratados con 24D. Las anomalías más prevalentes fueron: MO (0.23), AI (0.20); y las menos prevalentes: EA (0.08), DP (0.04) y CD (0.02).

Estos resultados nos permiten concluir que la exposición crónica a larvas de *P. albonotatus* a concentraciones subletales de este herbicida, afecta la supervivencia de las larvas sobre todo las expuestas a las mayores concentraciones (250, 275, 300, 352, 350 mg^{L-1}), genera anomalías morfológicas y altera el tiempo de desarrollo.

	LHC (Media±DE)	LT (Media±DE)	Peso (Media±de)	E.medio	MEA	Malformaciones
CB						
Co	5.46 ± 2.13	12.45±4.26	0.03±0.02	32±6	46	-
C1	6.99±1.64	16.12±4.27	0.04±0.02	35± 5	46	DP, MO
C2	6.15±1.65	15.03±4.46	0.04±0.02	32± 5	37	EA, MO
C3	6.88±1.64	15.59±3.7	0.04±0.02	34±5	46	EA,MO, AI
C4	6.92±2.22	14.95±5.38	0.05±0.03*	36±6	46	MB, AI
C5	6.64±1.49	15.31±3.75	0.04±0.02	35±6	46	AI
CM						
C6	6.31±1.63	14.7±3.93	0.04±0.02	34±6	46	DP, EA, MO, AI
C7	6.03±1.29	14±2.97	0.04±0.01	34±5	42	MO, AI
C8	6.4±1.48	15.63±4.5	0.03±0.01	35±6	42	MO, CD, AI
C9	5.98±7.8	13.75±3.92	0.03±0.02	33±6	46	MO, AI, CD
C10	5.79±1.84	14.36±4.48	0.03±0.01	34±6	46	MO, AI, DP, EA
CA						
C11	4.94±2.13	11.7±4.84	0.02±0.02	34±2	35	MO
C12	5.07±1.85	11.71±4.84	0.02±0.02	31±2	46	AI
C13	5.9±1.43	14.89±4.13	0.04±0.02	34±6	42	MO, AI, DP, EA
C14	5.35±1	12.89±4	0.03±0.02	31±6	46	MO, AI, EA
C15	5.95±2.47	12.26±4.16	0.03±0.02	31±6	46	MO, AI

Tabla 1. Resumen datos de longitud hocico cloaca (LHC), longitud total (LT), Peso, estadio medio, máximo estadio alcanzado (MEA) en las concentraciones bajas, medias y altas del herbicida (CB, CM, CA). Los asteriscos indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

-BIBLIOGRAFÍA:

- Beebee, T. y R. Griffiths. 2005. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology. *Biological Conservation*, 125: 271-285.
- Boone, M.D. 2008. Examining the single and interactive effects of three insecticides on amphibian metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27: 1561-1568.
- Charles, J.M., Hanley, T.R., Wilson, R.D., van Ravenzwaay, B. y Bus, J.S. 2001. Developmental Toxicity Studies in Rats and Rabbits on 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Its Forms. *Toxicological Science*, 60(1): 121-131
- Davidson, C. 2004. Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecol Appl*, 14 (6):1892-902.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C. y Thurston, R.V. (1977). Trimmed Spearman- Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ Sci Technol*, 11:714-9.
- Hayes, T.B. y Wu, T.H. 1995. Role of corticosterone in anuran metamorphosis and potential role in stress-induced metamorphosis. *Netherlands Journal of Zoology*, 45: 107-109.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A. y A. Vonk. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 5476-5480.
- Hayes, T.B., Stuart, A.A., Mendoza, M., Collins, A., Noriega, N., Vonk, A., Johnston, G., Liu, R. y D. Kpodzo. 2006. Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17 β -estradiol): support for the demasculinization/feminization hypothesis. *Environmental Health Perspectives*, 114, 134-141.
- Krishnamurthy, S.V. y Smith, G.R., 2011. Combined effects of malathion and nitrate on early growth, abnormalities, and mortality of Wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles. *Ecotoxicology*, 20, 1361-1367.
- Lenkowski, J.R., Reed, J.M., Deininger, L. y McLaughlin, K.A. 2008. Perturbation of organogenesis by the herbicide atrazine in the amphibian *Xenopus laevis*. *Environ. Health Persp.*, 116: 223-230.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Cabagna Z., M.C., Repetti, R., Sigrist, M. y Beldoménico, H. 2013. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined tree frog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotox. Environ. Safe.*, 98, 142-151.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, M.A., Junges, C.M., Teglia, C.M., Martinuzzi, C., Curi, L.M., Culzoni, M.J. y H.C. Goicochea. 2017. Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 51: 114-123.
- Rodriguez, E.M., Schuldt, M. y Romano, L. 1994. Chronic histopathological effects of parathion and 2,4-D on female gonads of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Food & Chemical Toxicology*, 32(9):811-818.
- Sanchez, L.C., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Manzano, A.S., Junges, C.M. y Attademo, M.A. 2014. First evidence of the effects of agricultural activities on gonadal form and function in *Rhinella fernandezae* and *Dendropsophus sanborni* (Amphibia: Anura) from Entre Rios Province, Argentina. *Acta herpetologica*, 9(1): 75-88.
- Storrs, S.I. & R.D. Semlitsch. 2008. Variation in somatic and ovarian development: Predicting susceptibility of amphibians to estrogenic contaminants. *General and Comparative Endocrinology* 156: 524-530.
- Tavera-Mendoza, L.E., Ruby, S.M., Brousseau, P., Cyr, D., Fournier, M. y D. Marcogliese. 2000. Sex-reversal in *Xenopus laevis* tadpoles following methanol and atrazine exposure during late metamorphosis. In: *Proceedings of the 27th Annual Aquatic Toxicology Workshop. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences No. 2331*, p. 108.
- Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby, A.G. y Augustijn-Beckers, P.W.M. 1992. Pesticide properties database for environmental decision making. *Rev Environ Contam Toxicol*, 123(SCS/ARS/CES):7-22.
- Wake, D.B. y Vredenburg, V.T. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proc Natl Acad Sci*, 105(Suppl 1):11466-11473.