



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

DOCTORADO EN BIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

Efectos letales y teratogénicos de Malatión,
Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, Cobre y Arsénico durante el
desarrollo de *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae)

Tesista

María Teresa Sandoval

Director

Jorge Herkovits

Codirectora

Cristina Silvia Pérez-Coll

Año 2022



A mis compañeros de ruta ...

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	6
CAPÍTULO I - CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y ECOTOXICOLOGÍA	8
INTRODUCCIÓN.....	9
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
CAPÍTULO II - PLAGUICIDAS.....	25
SECCIÓN I - INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS.....	35
SECCIÓN II - HERBICIDAS	73
CAPÍTULO III - METALES PESADOS	108
SECCIÓN I - COBRE.....	113
SECCIÓN II - ARSÉNICO	145
CAPÍTULO IV - CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES.....	171
BIBLIOGRAFÍA	183
Capítulo I –Introducción general.....	183
Capítulo II – Plaguicidas.....	190
Sección I – Insecticidas organofosforados	194
Sección II – Herbicidas.....	200
Capítulo III – Metales pesados	203
Sección I – Cobre	204
Sección II – Arsénico	207
Capítulo IV - Consideraciones finales y conclusiones	209
ABREVIATURAS	212
AGRADECIMIENTOS	214

RESUMEN

Históricamente el hombre ha modificado su entorno natural para su propio beneficio. La intervención humana en los ecosistemas, a través de distintas actividades y en pos de la utilización cada vez más intensiva de los recursos naturales para la obtención de beneficios económicos inmediatos, ha llevado a un deterioro ambiental, de difícil cuantificación. La contaminación ambiental constituye una problemática compleja debido a la multiplicidad de factores involucrados en la dinámica de los compuestos contaminantes y es considerada una de las causas de la disminución de las poblaciones de anfibios registradas a nivel mundial. Los anfibios, debido a su piel delgada y permeable, huevos sin cáscara y ciclo de vida bifásico, son vulnerables a los contaminantes ambientales. Entre estos contaminantes ambientales, los plaguicidas agrícolas revisten interés por presencia en agroecosistemas, donde residen muchas especies de anuros. Asimismo, los metales pesados constituyen un grupo altamente peligroso debido a su toxicidad, y su presencia en el ambiente puede verse incrementada por distintas actividades humanas. En este contexto, y con el fin de aportar información ecotoxicológica de base que permita predecir el impacto de estos contaminantes sobre organismos no blanco, en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos: 1) analizar la toxicidad del insecticida malatión, el herbicida 2,4-D, cobre y arsénico, utilizando bioensayos estandarizados de toxicidad con embriones y larvas de *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) en diferentes estadios del desarrollo, 2) evaluar los efectos letales y subletales sobre embriones y larvas provocados por dichos compuestos, 3) evaluar la susceptibilidad estadio-dependiente para cada uno de los químicos seleccionados e identificar los estadios del desarrollo más sensibles, 4) comparar la toxicidad del principio activo de los plaguicidas orgánicos, malatión y 2,4-D, con uno de sus formulados comerciales, Glacoxan 50M® y Esterón Ultra®, respetivamente. Para ello se emplearon protocolos estadarizados del test AMPHITOX: AMPHIEMB, AMPHIACUT, AMPHISHORT, AMPHICHRO y tests de EXPOSICIÓN POR PULSO. Los puntos finales evaluados fueron: letalidad, narcosis, alteraciones en el comportamiento, alteraciones morfológicas, retraso en el desarrollo y alteraciones en el crecimiento. A partir de los datos de mortalidad y malformaciones obtenidos se calcularon las CLs 10, 50 y 90 y el IT para cada compuesto analizado. Los resultados obtenidos permitieron caracterizar la toxicidad de cada compuesto. El insecticida

malación (i.a.) tiene efecto narcótico, letal y teratogénico y posee, además, la capacidad para alterar el comportamiento y afectar el crecimiento de embriones y larvas de *Rhinella arenarum*. El formulado comercial Glacoxan 50M® resultó varias veces más letal que el i.a. La susceptibilidad *Rhinella arenarum* a dichos compuestos muestra una relación estadio-dependiente, siendo el E. 25 el más sensible al efecto letal. El herbicida 2,4-D (i.a.) y su formulado comercial, Esterón Ultra® tienen efecto letal sobre larvas de *Rhinella arenarum*, siendo el formulado comercial más tóxico que el i.a. Esterón Ultra® tiene capacidad teratogénica y altera la morfogénesis y el crecimiento de los embriones de *Rhinella arenarum*. Para el caso de estos herbicidas, los estadios embrionarios tempranos fueron los más susceptibles al efecto tóxico, tanto del i.a. como del formulado comercial. La mayor toxicidad de las formulaciones comerciales en comparación con el i.a. se explicaría por la presencia de adyuvantes en su composición. El cloruro de cobre y el arsenito de sodio tienen efecto letal y capacidad teratogénica sobre embriones y larvas de *Rhinella arenarum*, afectando severamente la morfogénesis. Finalmente, se concluye que el mecanismo teratogénico de los compuestos estudiados no ejerce su acción sobre un órgano específico, sino que altera los procesos morfogenéticos. En consecuencia cualquier estructura u órgano que esté en desarrollo al momento o luego de la exposición, será susceptible de sufrir alguna alteración morfológica. Esto pone de manifiesto la alta susceptibilidad de los estadios embrionarios y larvales tempranos y la importancia de incluirlos en las evaluaciones ecotoxicológicas.

ABSTRACT

Historically, man has modified his natural environment for his benefit. Human activities and the intensive use of natural resources have led to gradual environmental deterioration. Environmental pollution constitutes a highly complex problem due to the multiplicity of factors involved in the dynamics of polluting compounds and is considered one of the causes of the decline of amphibian populations. Amphibians, due to their thin, permeable skin, shellless eggs, and biphasic life cycle, are especially vulnerable to environmental contaminants. Among these environmental contaminants, agricultural pesticides are of special interest due to their presence in agroecosystems, where many species of anurans inhabit. Likewise, heavy metals constitute a highly dangerous group because of their toxicity, also and their quantity in the environment may be increased by different human activities. To provide basic toxicological information useful to predict the impact of pollutants on non-target organisms, the following objectives were proposed: 1) to analyze the toxicity of the insecticide malathion, the herbicide 2,4-D, copper and arsenic, using standardized toxicity bioassays with embryos and larvae of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) at different stages of development, 2) to evaluate the lethal and sublethal effects on embryos and larvae caused by these compounds, 3) to evaluate the stage-dependent susceptibility for each selected chemical and to identify the most sensitive stages of development, 4) to compare the toxicity of the inner ingredient of organic pesticides, malathion, and 2,4-D, with its commercial formulations, Glacoxan 50M® and Esterón Ultra®, respectively. For this, standardized protocols of the AMPHITOX test were used: AMPHIEMB, AMPHIACUT, AMPHISHORT, AMPHICHRO, and PULSE EXPOSURE tests. The evaluated endpoints were: lethality, narcosis, behavioral and morphological alterations, and delay in developmental and growth alterations. Based on mortality and malformations data, the LCs 10, 50, and 90 and the TI for each toxicant analyzed were calculated. The insecticide malathion (inner ingredient) has a narcotic and lethal effect, a teratogenic potential, and the ability to alter the behavior and the growth of embryos and larvae of *Rhinella arenarum*. The commercial Glacoxan 50M® was several times more lethal than the i.a. The susceptibility of *Rhinella arenarum* shows a stage-dependent relationship, the E. 25 was the most susceptible to the lethal effect. The herbicide 2,4-D (inner ingredient) and its commercial formulation, Esterón Ultra®, have a significant lethal effect on *Rhinella arenarum* larvae, being the

commercial formulation more toxic than the inner ingredient. Esterón Ultra® has also teratogenic capacity and alters the morphogenesis and growth of the embryos. The early embryonic stages were the most susceptible to the herbicide's toxic effect. The greater toxicity of the commercial formulations compared to the inner ingredient may be due to the presence of adjuvants in their composition. Copper chloride and sodium arsenite have a significant lethal effect and teratogenic capacity on embryos and larvae of *Rhinella arenarum*. Finally, the teratogenic mechanism of the studied compounds does not exert its action on a specific organ but rather alters the morphogenetic processes. Consequently, any structure or organ developing at the time or after exposure to these compounds may develop a morphological abnormality. This highlights the high susceptibility of early embryonic and larval stages and the need to include them in ecotoxicological evaluations.

CAPÍTULO I - CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y ECOTOXICOLOGÍA



INTRODUCCIÓN

Contaminación ambiental

Históricamente el hombre ha modificado su entorno natural para su propio beneficio y supervivencia. La intervención humana en los ecosistemas, a través de distintas actividades y en pos de la utilización cada vez más intensiva de los recursos naturales para la obtención de beneficios económicos, ha llevado a un paulatino deterioro ambiental, de difícil cuantificación. La pérdida de ecosistemas naturales, la fragmentación del hábitat nativo, el empobrecimiento y desertificación de los suelos, la deforestación, la contaminación del suelo, agua y aire, la pérdida de biodiversidad, la alteración del clima, etc., son solo algunos de los indicadores del deterioro que ha sufrido el planeta en las últimas décadas (Ukaogo et al. 2020). El impacto de las actividades humanas sobre los ecosistemas no siempre se registra en lo inmediato y sus efectos pueden manifestarse tardíamente, lo que dificulta la identificación del origen y por lo tanto, imposibilitan la toma de medidas preventivas (Asif et al. 2018).

Holdgate (1979) definió la polución ambiental como la introducción por parte del hombre, en el medio ambiente, de sustancias o energía que dañan la salud humana, afectan los recursos naturales y sistemas ecológicos e interfieren con el uso del ambiente. Este concepto ha sido diferenciado del término “contaminación”, que refiere a la alteración del estado de equilibrio de un ecosistema por la adición de sustancias que, en condiciones normales no se encuentran presentes, o que, si lo están, han aumentado significativamente su nivel o concentración normal en el ambiente (Chapman 2007). Casi todas las actividades humanas provocan la degradación o alteración de la calidad de los ambientes naturales y son consideradas causas de contaminación ambiental. La polución, si bien no es un fenómeno nuevo, es uno de los principales problemas con los que se enfrentan las sociedades actuales siendo causa de morbilidad y mortalidad de la biota. La polución puede deberse a procesos naturales como erupciones volcánicas e incendios forestales o ser provocada por distintas actividades antropogénicas como los procesos industriales, la minería y las actividades agrícolas. La polución también es causada por el movimiento transfronterizo de contaminantes de los países desarrollados a los países en vías de desarrollo o viceversa. La contaminación transfronteriza, a través de diferentes rutas, principalmente aire y

agua, es una de las razones por las cuales la contaminación continúa siendo un problema global. La introducción y movimiento de materiales nocivos como contaminantes gaseosos, metales tóxicos, material particulado, aguas residuales, efluentes industriales, escorrentías agrícolas, desechos electrónicos, residuos de la minería, rellenos sanitarios y vertido ilegal de desechos, causan la contaminación del aire, agua y suelo afectando así todas las fases del ambiente y generando un gran impacto en la salud y conservación de los ecosistemas naturales (Ukaogo et al. 2020).

La contaminación ambiental constituye una problemática compleja debido a la multiplicidad de factores involucrados en la dinámica de los compuestos contaminantes como sus características químicas, mecanismo de acción, transporte y distribución en el ambiente, biometabolismo, biodegradabilidad, bioacumulación, persistencia, etc. (Alloway y Ayres 1997, Hursthouse y Kowalczyk 2009, Landis et al. 2017, Schweitzer y Noblet 2018, Anguiano et al. 2019). Esto determina un amplio abanico en cuanto a las perspectivas de análisis e interpretación de los efectos adversos de los compuestos tóxicos sobre los seres vivos. Las observaciones y la recopilación de datos con base científica, el procesamiento de datos con base estadística y las interpretaciones objetivas generan información válida y son necesarios para evaluar y abordar adecuadamente los desafíos ambientales desde escalas locales hasta globales (Artiola y Brusseau 2019). En este sentido surge la importancia de estudiar el impacto de los contaminantes sobre la biota y la necesidad de contar con información de base, válida y confiable, que contribuya a establecer y/o perfeccionar criterios de calidad ambiental para la preservación de la salud humana y de la vida silvestre.

Los efectos de la contaminación en el ambiente pueden ser lentos (crónicos) y requerir registros a lo largo del tiempo, o pueden manifestarse rápidamente (agudos) y evaluarse con observaciones simultáneas (Artiola y Brusseau 2019). Los contaminantes como los hidrocarburos, metales pesados y pesticidas pueden causar efectos tóxicos directos cuando se liberan al ambiente (Fleeger et al. 2003). Las poblaciones de las especies más sensibles pueden verse afectadas por efectos subletales o por un efecto letal. Esta alteración ecológica puede iniciar una cascada trófica o una liberación de la competencia que secundariamente conduce a respuestas de resistencia en especies tolerantes. Los contaminantes pueden ejercer efectos directos sobre especies clave y especies fundamentales, alterar la dinámica de nutrientes y oxígeno, y así perturbar las funciones de los ecosistemas (Fleeger et al. 2003).

Cuando se liberan contaminantes en ambientes acuáticos, se producen efectos tóxicos directos sobre la biota que varían con la intensidad y duración de la exposición a un contaminante. Conocer estas respuestas es fundamental para establecer criterios predictivos para estimar el riesgo y establecer niveles permisibles de contaminación. Estos criterios derivan de pruebas de toxicidad de laboratorio que generalmente emplean especies modelo en exposiciones a un solo tóxico (Connell et al. 1999). Los efectos directos de los tóxicos reducen la abundancia de organismos (por mortalidad o reducción de la fecundidad). Asimismo, la biota de un hábitat dado, generalmente exhibe una amplia gama de susceptibilidad a tóxicos específicos; una sustancia puede ejercer efectos letales o subletales en algunas especies, pero no causar efectos en otras. Sin embargo, los contaminantes pueden ejercer efectos indirectos (o secundarios) sobre las especies tolerantes mediante varios mecanismos ecológicos (Connell et al. 1999). Los efectos directos de los contaminantes sobre organismos de un determinado nivel trófico pueden provocar efectos indirectos, en cascada, sobre especies de otros niveles. En este sentido, la disponibilidad de recursos puede verse influenciada por contaminantes, que a su vez pueden modificar funciones importantes del ecosistema como por ejemplo: tasas de descomposición, dinámica del oxígeno y ciclos de los nutrientes (Fleeger et al. 2003)

Tipos de contaminantes

Una multiplicidad compuestos químicos son liberados diariamente al ambiente por diversas actividades humanas (Johnson et al. 2020). Se estima que existen alrededor de 23 millones de sustancias químicas registradas aunque solo una pequeña fracción tiene algún tipo de regulación (Brusseau y Artiola 2019). Básicamente hay tres categorías de contaminantes: orgánicos, inorgánicos y radiactivos, y distintas clases dentro de cada categoría que se enumeran en la Tabla 1, además de ejemplos de cada clase.

Tabla 1: Principales categorías y clases de contaminantes (Brusseau y Artiola 2019).

CONTAMINANTES ORGÁNICOS

Hidrocarburos de petróleo (combustibles): benceno, tolueno, xileno, aromáticos policíclicos.

Disolventes clorados: tricloroeteno, tetracloroeteno, tricloroetano, tetracloruro de carbono.

Plaguicidas: DDT (Dicloro-difenil-tricloro-etano), 2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), atrazina.

Bifenilos policlorados (PCB): fluidos aislantes, plastificantes, pigmentos

Alquitrán de hulla / creosota: aromáticos policíclicos.

Productos farmacéuticos / aditivos alimentarios / cosméticos: medicamentos, tensioactivos, tintes.

Compuestos gaseosos: clorofluorocarbonos (CFC), hidroclorofluorocarbonos (HCFC).

CONTAMINANTES INORGÁNICOS

Sales inorgánicas: sodio, calcio, nitrato, sulfato.

Metales pesados / traza: níquel, cobre, cromo, plomo, zinc, cadmio, mercurio, arsénico.

CONTAMINANTES RADIATIVOS

Elementos sólidos: uranio, estroncio, cobalto, plutonio.

Elementos gaseosos: radón.

Estas sustancias difieren en su peligrosidad tanto para la salud humana como para la biota silvestre. Ciertos productos químicos se clasifican como sustancias químicas persistentes, bioacumulables y tóxicas (PBT), presentan un alto riesgo para la salud humana ya que son tóxicos, permanecen en el ambiente durante largos períodos de tiempo, no son fácilmente biodegradables, y se acumulan en tejidos del cuerpo. Otros, han sido clasificados como compuestos orgánicos persistentes (COP) ya que son productos químicos que permanecen intactos durante largos períodos de tiempo, con distribución amplia geográficamente, y se acumulan en el tejido graso (por su naturaleza lipofílica) de organismos vivos. Todas éstas, son características que explican su toxicidad y ecotoxicidad por fenómenos de biomagnificación a través de las cadenas alimentarias (Brusseau y Artiola 2019).

Contaminación y disminución de las poblaciones de anfibios

La declinación de las poblaciones de anfibios es una problemática que viene reportándose hace décadas por la comunidad científica (Blaustein y Wake 1990, Houlihan et al. 2000, Blaustein y Kiesecker 2002, Beebee y Griffiths 2005, McCallum 2007, Nyström et al. 2007, Collins 2010, Whitfield et al. 2016, Green et al. 2020, Halstead et al. 2022). Las causas de esta declinación son complejas, pueden diferir entre especies, poblaciones y etapas de vida dentro de una población y dependen de la interacción numerosos factores. Estos incluyen la destrucción del hábitat, la contaminación, la introducción de especies exóticas, ciertas enfermedades, el cambio climático y los procesos atmosféricos asociados, y la sobreexplotación por su extracción para mascotismo y la industria alimentaria (Storfer 2003, Hopkins 2007, Blaustein et al. 2011).

Luego de la fragmentación del hábitat, la exposición a contaminantes químicos, particularmente plaguicidas agrícolas, es una de las causas más importantes asociada con la declinación de las poblaciones de anfibios (Carey y Bryant 1995, Anguiano et al. 1998, Corn 2000, Mann et al. 2009, Sparling et al. 2010). Muchos estudios demuestran no solo letalidad sino también alteraciones en el crecimiento, desarrollo y comportamiento de los anfibios y mayor incidencia de enfermedades por acción de productos agrícolas que, directa o indirectamente afectan a los organismos en su ambiente natural (Brühl et al. 2011). Agostini et al. (2010), mediante un estudio *in situ* demostraron disminución en la supervivencia en renacuajos de cuatro especies nativas de Argentina como consecuencia de la exposición a pesticidas utilizados comúnmente en cultivos de soja de América del Sur. Estos autores destacaron además la necesidad de estudiar los efectos de los plaguicidas en escenarios reales de exposición para comprender su impacto sobre las poblaciones nativas de anfibios.

La ecotoxicología

La ecotoxicología, según la definición del profesor R. Truhaut en 1969, es una ciencia que estudia y describe el efecto de los agentes tóxicos sobre los organismos, especialmente en las poblaciones y comunidades residentes en los ecosistemas. En esencia integra dos áreas fundamentales del conocimiento: el estudio del ambiente

(ecología) y el estudio de los efectos tóxicos de los agentes contaminantes sobre los organismos (toxicología) (Connell et al. 1999).

Actualmente, los estudios ecotoxicológicos incluyen dos perspectivas a tener en consideración. La primera hace referencia a un análisis retrospectivo que evalúa la presencia de sustancias tóxicas en el ambiente en relación a un impacto observado. La segunda perspectiva se refiere a los estudios de tipo predictivo o prospectivo que involucra el uso de test específicos para estimar el posible impacto de sustancias tóxicas en un ecosistema (Newman 2009).

La ecotoxicología moderna incluye un complejo de procedimientos que involucra medidas y ensayos a distintos niveles de organización, desde valoraciones bioquímicas en distintas fases ambientales, pasando por biomarcadores y test de toxicidad, hasta valoraciones en todos los niveles ecológicos: organismos, poblaciones, comunidades y ecosistemas, con el fin de proveer las herramientas e información necesarias para establecer planes de manejo y protección del ambiente. Las claves de la ecotoxicología están basadas en una serie de conceptos fundamentales para la comprensión de cómo el ambiente interacciona con las sustancias tóxicas (Connell et al. 2009). Dicha claves incluyen:

- Estudios a nivel químico que informan qué tipo de sustancias se encuentran en el ambiente y su distribución y transformación en las distintas fases ambientales como el aire, suelo, agua y la biota.
- Estudios toxicológicos que permiten dilucidar las relaciones Dosis-Respuesta entre las sustancias tóxicas y los organismos con los que interacciona
- Estudios ecológicos que evalúan y explican cómo las poblaciones, comunidades y ecosistemas responden a la presencia de contaminantes en el medio.

Evaluación del riesgo ecotoxicológico

La evaluación del riesgo ecotoxicológico supone la presencia de contaminantes en el ambiente y es de fundamental importancia para considerar la exposición y los efectos de los mismos sobre los seres vivos. Actualmente, las evaluaciones ecotoxicológicas integran diferentes niveles (individuos, poblaciones, comunidades y ecosistemas) y permiten identificar los elementos biológicos de riesgo (Figura 1).

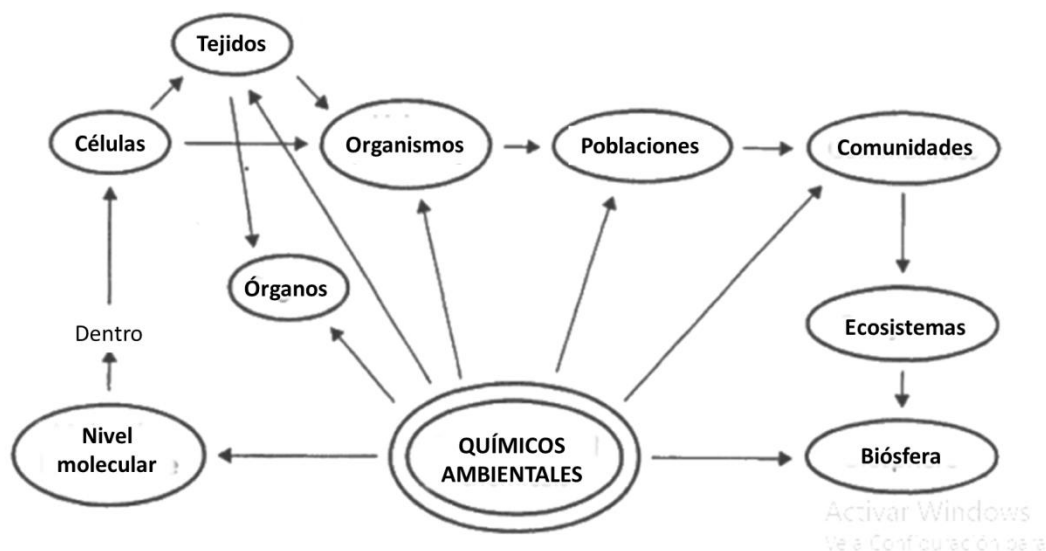


Figura 1: Niveles de organización biológica y sus interacciones con el ambiente. Modificado de: Connell et al. (2009).

Una aproximación para evaluar los efectos de los contaminantes es a través de los ensayos de toxicidad, que pueden ser realizados con agentes individuales o con mezclas complejas. Los bioensayos de toxicidad proporcionan información respecto de la multiplicidad de efectos adversos resultantes de las interacciones de sustancias químicas. El concepto de bioensayo o prueba de toxicidad se deriva de la toxicología clásica, y ha sido modificado, adaptado y extendido al diagnóstico y manejo ambiental. Estas técnicas bioanalíticas son consideradas complementarias de los análisis fisicoquímicos convencionales y son alternativas eficaces para la predicción de niveles seguros de concentración de tóxicos en los que no se generan efectos observables (Moreno Grau 2003).

Los bioensayos relacionan una cierta dosis o concentración de un tóxico con una respuesta dada, lo que brinda información necesaria para determinar los efectos tóxicos de un compuesto dado. Esta información se representa en una curva Dosis-Respuesta que permite identificar la dosis o concentración mínima que produce efectos adversos, denominada dosis o concentración umbral (Newman 2009). El fundamento biológico de los niveles umbral de toxicidad está ampliamente demostrado en respuestas de tipo agudo consecuentes de una exposición breve a elevadas concentraciones de una sustancia tóxica. Sin embargo, dichos valores son más difíciles de determinar en exposiciones crónicas a bajas concentraciones de un compuesto. En este sentido, la curva Dosis-Respuesta, aunque no permite identificar un nivel umbral, posibilita

determinar un nivel umbral por debajo del cual no se manifiestan efectos tóxicos. Este nivel se conoce como NOAEC (*no adverse effect concentration* o concentración que no produce efectos adversos). Otro valor importante es el denominado LOAEC (*lowest observed adverse effect concentration* o menor concentración a la cual se observen efectos adversos) (Moreno Grau 2003). La estimación más común de la toxicidad se realiza a partir de la medida de la letalidad a corto plazo, que implica la determinación de la concentración media que es letal para el 50 % de la población expuesta. Dicha medida se expresa como CL50 (Concentración Letal 50) o DL50 (Dosis Letal 50), de acuerdo a la ruta de exposición al tóxico. Es posible que una sustancia tóxica pueda ser letal solo a elevadas concentraciones, pero produzca otros efectos adversos a concentraciones bajas. La máxima información que aporta el valor de CL50 es una idea de la magnitud de la dosis letal en condiciones específicas. Su cálculo es bastante sencillo y rápido de realizar y aporta información de base para la evaluación inicial del peligro de una sustancia tóxica (Duffus 1983). Sin embargo, es necesario considerar el espectro de diferentes CLs (Concentraciones Letales) a fin de complementar la información acerca del impacto negativo que puede tener una sustancia. Para este propósito, los datos CLs se representan a intervalos regulares de tiempo y se obtiene un perfil de toxicidad (TOP), que proporciona umbrales de exposición y concentración para una determinada sustancia o muestra (Herkovits et al. 1993, Herkovits et al. 1996a).

Otras estimaciones de la toxicidad incluyen la evaluación de efectos adversos subletales. Los parámetros para determinar la toxicidad subletal varían desde bioquímicos hasta conductuales e incluyen alteraciones en la actividad enzimática, diversas patologías en órganos específicos, alteraciones genéticas, anomalías durante el desarrollo, alteraciones morfológicas, disrupción endocrina, carcinogénesis, alteraciones del comportamiento, etc. Estos parámetros se utilizan, además, como biomarcadores de toxicidad (Connell et al. 1999).

En síntesis, la ecotoxicología (Figura 2) combina el aporte de diversas ciencias y disciplinas como la química, bioquímica, toxicología, farmacología, ecología, genética, matemática, estadística, limnología, fisiología, entre otras, con el fin de establecer las fuentes de origen y el destino de las sustancias tóxicas en el ambiente y estimar el riesgo sobre la salud humana y de los ecosistemas (Connell et al. 1999). Según esto, Moriarty (1988) sugiere que la tarea de esta ciencia es evaluar, monitorear y predecir el origen y destino de contaminantes en los ecosistemas, considerando la caracterización

química, el monitoreo de los niveles presentes en el ambiente y la evaluación del impacto ambiental, a través de estudios que involucren los métodos modernos de la toxicología y la ecología.

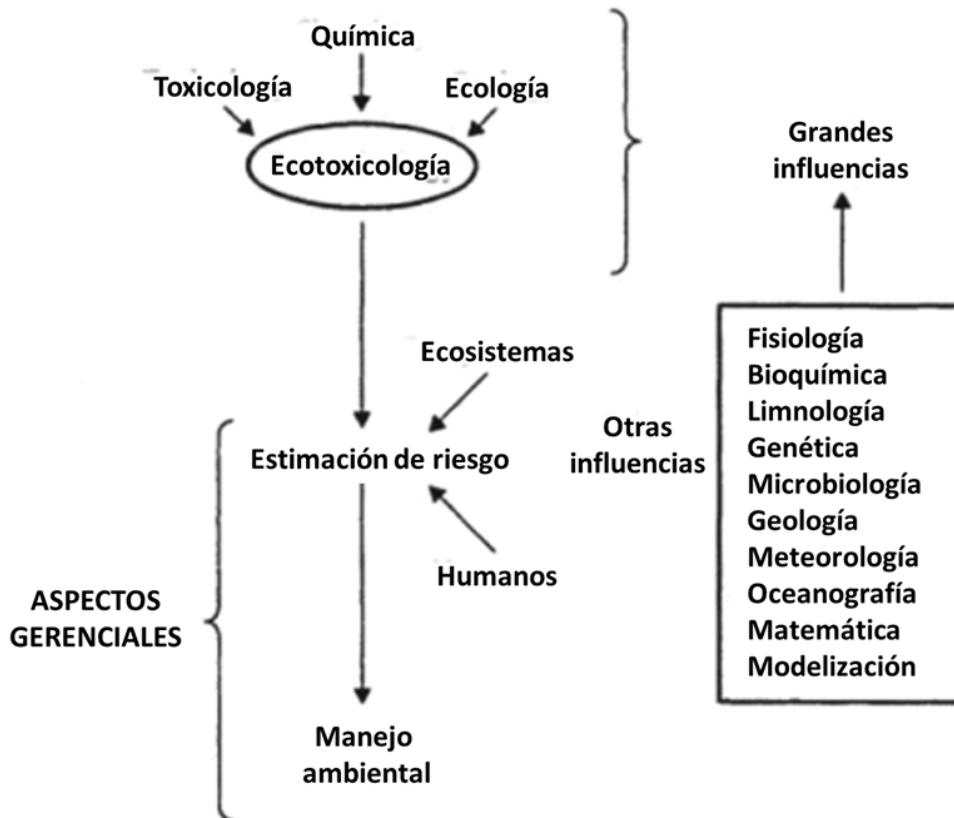


Figura 2. Componentes que contribuyen a la ecotoxicología. Modificado de: Connell et al. (2009).

Los anfibios como herramienta para evaluaciones ecotoxicológicas

Debido a su piel delgada y permeable, huevos sin cáscara y ciclo de vida bifásico, los anfibios se consideran especialmente vulnerables a los contaminantes, lo que se ha sugerido que contribuye a su fuerte declive actual observado en todo el mundo (Blaustein y Kiesecker 2002). Los cambios en morfología, fisiología, equilibrio endocrino, diferenciación celular y expresión génica que ocurren en los anfibios durante su desarrollo y metamorfosis hacen que sean sensibles a los efectos de los contaminantes (Langlois 2021), y por lo tanto, buenos modelos para realizar pruebas de laboratorio, evaluaciones de calidad ambiental y estudios ecotoxicológicos a campo (Sparling et al. 2010).

Los anfibios anuros constituyen un buen modelo para los ensayos toxicológicos y ecotoxicológicos (Dumont et al. 1983, Pérez-Coll et al. 1986, Herkovits y Pérez-Coll 1999 a y b, Herkovits et al. 2002, Herkovits y Pérez-Coll 2003, Johnson et al. 2017, Pérez-Coll et al. 2017). Su relativo pequeño tamaño y fácil mantenimiento en cautiverio le confieren las propiedades y beneficios necesarios para la realización de distintos estudios bajo condiciones de laboratorio. Asimismo, la aptitud que ciertas especies de anfibios presentan para la inducción de la ovulación y subsecuente producción de ovocitos, fertilización *in vitro* y obtención de embriones, bajo condiciones controladas, permiten la obtención de material experimental con baja variabilidad genética y ejemplares que no han estado expuestos a noxas. Esto garantiza la validez de los datos obtenidos y resulta en un beneficio a la hora de su interpretación (Herkovits y Pérez-Coll 2003, Pérez-Coll y Herkovits 2004).

La presencia de un tegumento altamente permeable, que facilita la incorporación y transporte de diversas sustancias, es una de las causas por la cual los anuros poseen una elevada susceptibilidad a diversos agentes xenobióticos, lo que resulta de fundamental interés en las evaluaciones toxicológicas (Pérez-Coll et al. 1999, Brühl et al. 2011, Aronzon et al. 2014, Svartz et al. 2015). Diversos estudios de toxicidad con embriones y larvas de diferentes especies de anfibios anuros (Vismara et al. 1993, Mahaney 1994, Burkhart et al. 1998, Ferrari et al. 1998, Mann y Bidwell 2000, 2001, Tavera-Mendoza et al. 2002) y, particularmente, de la anurofauna argentina (Agostini et al. 2010, Aronzon et al. 2011 a y b, 2014, 2020, Barreto et al. 2020, Boccioni et al. 2021, Brodeur et al. 2009, 2011, Costa et al. 2018, Curi et al. 2017, 2019, 2021, Herkovits et al. 1996 a y b, 1997; Herkovits et al. 2002, Lajmanovich et al. 1998, 2003, 2022, Natale et al. 2006, Peltzer et al. 2006, 2017, 2019, Pérez-Coll y Herkovits 1990, Pérez-Coll et al. 1985, Salibián 1992, Salibián y Marazzo 1995, Svartz et al. 2014, 2016, Pérez Iglesias 2016, 2021, Peluso et al. 2020, 2021) confirman que estos organismos son altamente susceptibles a un amplio espectro de noxas. Por ello, son considerados buenos bioindicadores, que brindan una alerta temprana disturbios ambientales (Roy 2002, Storfer 2003, Fitzgerald 2017).

Se han propuesto diversos protocolos y test para evaluar la toxicidad de sustancias y compuestos tóxicos sobre los anfibios anuros. El protocolo FETAX (ASTM 1993), ha sido diseñado para evaluar efectos letales y subletales de agentes contaminantes sobre

embriones y larvas de *Xenopus laevis* y es el comúnmente utilizado en las evaluaciones ecotoxicológicas, principalmente en el hemisferio norte.

Para la anurofauna autóctona de Argentina, Herkovits y Pérez-Coll (2003) y Pérez-Coll et al. (2017) estandarizaron el procedimiento AMPHITOX, una batería de ensayos que permite la evaluación de la toxicidad de sustancias simples, mezcla de compuestos, efluentes industriales, muestras ambientales, etc., con embriones y larvas de *Rhinella arenarum*. Dicho protocolo incluye cuatro tipos de ensayos con larvas: AMPHIACUT, para toxicidad aguda de 96 horas de duración, AMPHISHORT, para toxicidad crónica hasta 7 días de exposición; AMPHICHRO, para toxicidad crónica superior a los 10 días de exposición, AMPHIEMB, un ensayo con estadios tempranos del desarrollo a partir del estadio de 2-4 blastómeras y EXPOSICIÓN POR PULSO, ensayo de exposición al tóxico durante 24 h y posterior lavado exhaustivo en SA y permanencia en esta misma solución fisiológica hasta finalizar el ensayo.

Estos ensayos permiten evaluar la toxicidad de una amplia diversidad de muestras ambientales y obtener información acerca de la letalidad, malformaciones, retraso en el desarrollo, anomalías en el comportamiento, entre otros, provocadas por sustancias tóxicas así como también la susceptibilidad estadio-dependiente.

OBJETIVO GENERAL

En este marco el objetivo general del presente estudio fue evaluar y determinar, mediante el procedimiento AMPHITOX, la toxicidad de un insecticida, un herbicida, un metal y un metaloide, durante el desarrollo embrionario y larval de *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la toxicidad del insecticida malatión, el herbicida 2,4-D, cobre y arsénico, utilizando bioensayos estandarizados de toxicidad con embriones y larvas de *Rhinella arenarum* en diferentes estadios del desarrollo.
- 2) Describir los efectos letales y subletales como narcosis, alteraciones del comportamiento, alteraciones morfológicas (teratogénesis), retraso en el desarrollo y alteraciones del crecimiento, por exposición a dichas sustancias.

- 3) Determinar la susceptibilidad estadio-dependiente para cada una de las sustancias seleccionados e identificar los estadios del desarrollo más sensibles.
- 4) Comparar la toxicidad del principio activo de los plaguicidas orgánicos, malatión y 2,4-D, con un formulado comercial, Glacoxán 50M® y Esterón Ultra®, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de material biológico

La obtención de embriones de *Rhinella arenarum* se realizó por medio de la fertilización *in vitro* de ovocitos de acuerdo a lo propuesto por Pisanó (1956). Para ello, se utilizaron ejemplares adultos, machos y hembras, de aspecto saludable, sin presentación macroscópica de parásitos. Estos, fueron provistos por un proveedor local que los extraía de un sitio de Lobos en la Provincia de Buenos Aires (35° 11' S; 59° 05' O), y fueron aclimatados en laboratorio previo al proceso de ovulación. Para cada camada de embriones, se utilizó un (1) ejemplar macho para la obtención del macerado de testículo y un (1) ejemplar hembra para la obtención de ovocitos. La obtención y mantenimiento de los embriones se realizó de acuerdo con el protocolo AMPHITOX (Herkovits y Pérez-Coll 2003, Pérez-Coll et al. 2017). Se indujo la ovulación de las hembras por medio de la inyección intraperitoneal de un macerado de hipófisis homóloga (Pisanó 1956), en agua destilada. Luego de 16 a 24 h post-inducción, las hembras comenzaron a expulsar los ovocitos dentro de ristras de gelatina. Los ovocitos remanentes fueron extraídos de los ovisacos por disección, abriendo a los individuos cuidadosamente, y evitando romper vasos sanguíneos. Las ristras fueron colocadas en bandejas plásticas levemente humedecidas con Solución AMPHITOX (SA) (NaCl 36 mg L⁻¹, KCl 0,5 mg L⁻¹, CaCl 1 mg L⁻¹, NaHCO₃ 2 mg L⁻¹ preparada en agua desionizada) (Herkovits et al. 2002), asegurando la disponibilidad de oxígeno. Una vez iniciado el proceso de ovulación, se preparó un macerado testicular al 10 % en SA por testículo, a fin de obtener una suspensión de espermatozoides. La viabilidad de los espermatozoides fue confirmada observándose su movimiento y morfología normales bajo microscopio óptico. La fecundación se realizó pincelando las ristras de ovocitos con el macerado testicular. Luego de 10 minutos, los ovocitos fecundados se cubrieron

con abundante SA y aproximadamente 2 h más tarde se pudo observar la segmentación de los embriones.

Los embriones obtenidos fueron criados en bateas plásticas con SA hasta alcanzar el estadio embrionario/larval deseado para la realización de los ensayos, bajo condiciones de laboratorio (Temperatura: $21^{\circ}\text{C} \pm 1$, Fotoperiodo: natural). Periódicamente se realizó la renovación del medio de cría, retirando los organismos muertos, a fin de conservar el medio sin contaminación, y además las larvas fueron alimentadas *ad libitum* día por medio con lechuga hervida enfriada. La manipulación de los embriones y larvas se realizó con pipetas Pasteur plásticas de 3 ml. Para la identificación de los estadios (E.) del desarrollo se utilizó la tabla propuesta por Del Conte y Sirlin (1951) y la clasificación de Echeverría y Fiorito de López (1981).

Selección de ejemplares para los bioensayos

Para los ensayos con estadios tempranos del desarrollo (previo a la eclosión), las ristas fueron desgelatinizadas con una solución de ácido tioglicólico al 2 % preparada en SA y neutralizada a pH 7,2 con NaOH (Pérez-Coll et al. 1985). Luego, los embriones fueron lavados exhaustivamente con abundante SA, a fin de evitar la persistencia de los efectos residuales del ácido. Los embriones desgelatinizados fueron luego mantenidos en SA hasta alcanzar el estadio del desarrollo deseado para los bioensayos. Para bioensayos con embriones en estadios tempranos, los ejemplares se seleccionaron bajo lupa estereoscópica. El criterio de selección se basó en las características morfológicas de los embriones, considerándose óptimos aquellos que presentaron forma bien redondeada, surco de segmentación visible, coloración uniforme del polo animal y aspecto normal del espacio perivitelino. Para los ensayos realizados con estadios larvales, los ejemplares se mantuvieron en bandejas plásticas con abundante SA hasta alcanzar el estadio deseado para cada ensayo. El criterio de selección de las larvas se basó en sus características morfológicas, tamaño uniforme, buen aspecto general, uniformidad de coloración y signos de natación (movilidad) normal.

Metodología de los bioensayos

Los bioensayos de toxicidad, estáticos o semiestáticos (con renovación de medio cada 48 h), se realizaron siguiendo los protocolos estandarizados del test AMPHITOX (Herkovits et al. 2002, Herkovits y Pérez-Coll 2003): tests AMPHIEMB (ensayo con embriones tempranos), test AMPHIACUT (ensayo agudo de 96 h de exposición), test AMPHISHORT (ensayo crónico corto de 7 días de exposición), test AMPHICHRO (ensayo crónico de 14 días de exposición). Para caracterizar la sensibilidad estadio-dependiente se realizaron tests de EXPOSICIÓN POR PULSO (24 h de exposición al tóxico y posterior cambio a SA).

Para cada uno de los protocolos, se expusieron, por triplicado, grupos de 10 embriones o larvas de *Rhinella arenarum* en diferentes estadios del desarrollo, a distintas concentraciones del compuesto a estudiar, más el respectivo control en SA y el solvente orgánico utilizado para preparar las soluciones (en el caso de los plaguicidas). Todos los bioensayos se realizaron bajo las mismas condiciones de temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 1$) y fotoperiodo natural, variando el tiempo de exposición al tóxico según los objetivos particulares de cada ensayo.

Puntos finales evaluados

Letalidad. Cada 24 h se contabilizó el número de individuos muertos expuestos al tóxico y controles. En ausencia de movimiento espontáneo, se consideraron muertos aquellos individuos que no tuvieron reacción motora ante el estímulo táctil y que además presentaron algún signo de alteración tisular. Los ejemplares muertos fueron removidos de las placas a fin de evitar contaminación.

A partir de los datos de letalidad obtenidos se calcularon las CL10 (concentración que produce el 10 % de letalidad), CL50 (concentración que produce el 50 % de letalidad) y CL90 (concentración que produce el 90 % de letalidad), utilizando el programa Probit (US EPA 1988). El valor NOEC (máxima concentración que no tiene efecto letal) fue obtenido empíricamente y el LOEC (mínima concentración que tiene efecto letal) fue estimado como la CL10 obtenida por Probit y se construyeron las curvas de sobrevivencia para cada compuesto evaluado. Se realizó el tratamiento estadístico de los datos a través de un análisis de la varianza (ANOVA) para analizar diferencias significativas entre

tratamientos y controles. Para ello se utilizó el software INFOSTAT (versión 2017 estudiantil gratuita).

Narcosis. La narcosis ha sido definida como una disrupción no específica, inducida por exposición a un tóxico, que provoca una disminución reversible de la actividad motora y capacidad de reacción ante un estímulo y que puede eventualmente conducir a la muerte (Wezel & Opperhuizen 1995). La narcosis de las larvas tratadas se evaluó dentro de los primeros 30 minutos de ensayo a partir de la estimulación táctil del extremo de la cola con una pipeta o varilla de vidrio y la observación de la respuesta motora. Se consideraron narcotizados aquellos individuos que no mostraron reacción al estímulo, pero que en las horas sucesivas recuperaron movilidad, y normales aquellos que respondían con natación activa.

Alteraciones del comportamiento. Se consideraron las alteraciones en la natación y actividad motora de las larvas. Se realizó una valoración cualitativa de las respuestas motoras a un estímulo táctil aplicado con una pipeta o varilla de vidrio, en el extremo de la cola. Se consideró normal el desplazamiento lejano e inmediato al estímulo y anormal los desplazamientos breves, lentos o rápidos, las contracciones espasmódicas con o sin desplazamiento, la hiperquinesis, la natación en círculo o zigzagueante y la permanencia de lado.

Alteraciones morfológicas. Las alteraciones de la morfología de embriones y larvas fueron analizadas y registradas diariamente durante los bioensayos, observando los embriones bajo lupa estereoscópica. Asimismo, al final de los bioensayos, los individuos sobrevivientes fueron anestesiados con benzocaína 5 % (Muelita®), de acuerdo al protocolo establecido por la American Veterinary Medical Association (Leary et al. 2013), y posteriormente fijados en formol 10 %. Estos individuos fueron luego examinados con lupa estereoscópica y Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).

Los ejemplares fueron analizados y fotografiados con lupa estereoscópica LEICA EZ 4E equipada con cámara digital. Las imágenes fueron editadas con el software Leica Application Suite (LAS) EZ y el software ImageJ 1.48v (Schneider et al. 2012). Para las observaciones con MEB, los ejemplares fueron procesados siguiendo la técnica propuesta por Sorrivias de Lozano y Morales (1986) consistente en: deshidratación en soluciones crecientes de acetona (12,5; 25; 50; 75 y 100 %) en agua destilada, secado a

punto crítico y metalización con oro-paladio. Las observaciones se realizaron en un Microscopio JEOL 5800 LV perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Secretaría General de Ciencia y Técnica-UNNE.

Con los datos obtenidos se calculó la CE50 (Concentración Efectiva 50) equivalente a la concentración que produce malformaciones en el 50 % de los individuos tratados y el IT (Índice Teratogénico) a partir de la fórmula: $IT = CL_{50_{96\ h}} / CE_{50_{96\ h}}$ para cada compuesto analizado (Dumont et al. 1983). $IT > 1.5$ implica un alto riesgo de sufrir malformaciones en ausencia de significativa letalidad (ASTM 1993).

Retraso en el desarrollo. El retraso en el desarrollo se evaluó registrando el estadio del desarrollo alcanzado por los embriones o larvas tratados y controles, tanto en las observaciones diarias como al finalizar los bioensayos.

Alteraciones en el crecimiento. A fin de estimar alteraciones en el crecimiento, se realizó la medición de la Longitud Hocico-Cloaca (LHC) y Longitud Total (LT) de las larvas tratadas y larvas control, fijadas al finalizar los bioensayos. Las mediciones se realizaron con el software software ImageJ 1.48v (Schneider et al. 2012). Se realizó el tratamiento estadístico de los datos a través de un test ANOVA para analizar diferencias significativas entre la talla de los ejemplares expuestos al tóxico y los controles.

CAPÍTULO II - PLAGUICIDAS



Generalidades de los plaguicidas

El Código Internacional de Conducta Sobre la Distribución y Uso de Plaguicidas de la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (2003) establece que un plaguicida es «cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte». Estos productos también se utilizan para otros fines, como la mejora y el mantenimiento de áreas no agrícolas como áreas verdes urbanas públicas y campos deportivos. Además, existen otras aplicaciones menos conocidas de estas sustancias químicas, como en champús para mascotas, materiales de construcción y fondos de embarcaciones, para eliminar o prevenir la presencia de especies no deseadas, etc. (Nicolopoulou-Stamati et al. 2016). Los plaguicidas son compuestos bioactivos y como tales, ejercen efectos biológicos sobre los organismos vivos, por lo tanto, cuando la vida silvestre no blanco se expone a plaguicidas, a menudo se producen efectos biológicos no deseados. Asimismo, un aspecto importante del uso de plaguicidas, y que habitualmente es pasado por alto, es el peligro que suponen los aditivos y presentes en las formulaciones comerciales (Cox y Sorgan 2006, Alavanja 2009, Ciarlo et al. 2012, Zhu et al. 2014). Dichas sustancias aumentan la biodisponibilidad de los principios activos, generalmente de menor toxicidad, por lo que deben considerarse en evaluaciones ecotoxicológicas.

Los ecosistemas han sido expuestos por décadas a distintos tipos de plaguicidas como insecticidas, herbicidas, funguicidas, alguicidas, rodenticidas y otros, sin que se conozca certeramente el impacto que tiene su uso sobre la salud de los ecosistemas. En las últimas décadas los modelos de desarrollo agrícola promovieron la mejora de los

rindes productivos y la obtención de beneficios económicos por medio de la expansión de la frontera agropecuaria y el aumento de la producción a través de la mecanización, el mejoramiento genético y el uso intensivo de insumos agroquímicos como plaguicidas y fertilizantes. La contaminación por el uso de plaguicidas en zonas rurales representa, actualmente, una problemática de extensión mundial de difícil cuantificación (Anguiano y Ferrari. 2019). La aplicación de plaguicidas es un beneficio para el control de plagas en los sistemas agrícolas aunque constituye un riesgo para la salud humana, la sanidad ambiental y la conservación de la biodiversidad (Mahmood et al. 2016). En este sentido, si bien dichas sustancias constituyen una valiosa herramienta para la agricultura moderna, su uso no está libre de costos ambientales (Damalas y Eleftherohorinos 2011).

Los plaguicidas se clasifican sobre la base de diversos criterios tales como toxicidad, organismo blanco, composición química, modo de entrada, mecanismo de acción, cómo o cuándo ejercen su acción, tipo de formulación, fuente de origen, entre otros (Piña 2012, Nicolopoulou-Stamati, et al. 2016, Akashe et al. 2018, Kaur et al. 2019, Organización Mundial de la Salud & Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas 2020, Abubakar et al. 2020).

Siguiendo a los autores antes mencionados se pueden enumerar los siguientes criterios de clasificación:

Toxicidad: **Clase Ia** (sumamente peligroso), **Clase Ib** (muy peligroso), **Clase II** (moderadamente peligroso), **Clase III** (poco peligroso), **Clase IV** (no peligroso).

Composición química: organoclorados, organofosforados, triazinas, carbamatos, compuestos de cobre, piretroides, clorofenoxi, bupiridílicos, etc.

Organismos que controlan: insecticidas, acaricidas, rodenticidas, fungicidas, nematocidas, bactericidas, molusquicidas, avicidas, herbicidas, ovicidas, etc.

Tipo de formulación: ingrediente activo, formulaciones líquidas (concentrados emulsionables, suspensiones concentradas, soluciones, emulsiones invertidas, microencapsulados), formulaciones secas (polvos, cebos, gránulos, pellets, polvos mojables, polvos solubles).

Tipo de ingrediente activo: orgánicos (derivados del carbono) o inorgánicos (sulfato de cobre, sulfato ferroso, cobre, cal, azufre, etc).

Modo de entrada: contacto, ingestión e inhalación.

Mecanismo de acción: una vez ingresado al organismo el producto se traslada hasta el órgano, grupo de células o glándula blanco donde cumple con su función biocida.

Especificidad sobre la plaga: selectivos, no selectivos.

Persistencia: no persistentes, moderadamente persistentes, altamente persistentes y permanentes.

Uso: agrícola, urbano, pecuario, industrial, forestal, doméstico y para jardinería.

Las tablas 1, 2, 3 y 4 presentan algunos ejemplos de plaguicidas y su clasificación según distintos criterios.

Tabla 1: Ejemplos de plaguicidas clasificados según su toxicidad.

CLASE	TOXICIDAD	EJEMPLOS
Clase Ia	Sumamente peligroso	Paratión, dieldrín
Clase Ib	Muy peligroso	Eldrín, diclorvos
Clase II	Moderadamente peligroso	DDT, clordano
Clase III	Levemente peligroso	Malatión
Clase IV	No peligroso	S/D

Tabla 2: Ejemplos de plaguicidas clasificados según su persistencia en el ambiente.

PERSISTENCIA	VIDA MEDIA	EJEMPLOS
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín.
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, lannate.
Altamente persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín.
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico.

Tabla 3: Clasificación de plaguicidas según los organismos que controlan y su mecanismo de acción.

ORGANISMOS QUE CONTROLAN		MECANISMO DE ACCIÓN	
Tipo	Objetivo	Tipo	Acción
Bactericidas	Bacterias	De contacto	Mata al contacto con la plaga.
Defoliantes	Follaje	Erradicante	Eficaz después de infección por patógenos.
Desecantes	Follaje	Fumigante	Entra en las plagas como un gas.
Fungicidas	Hongos	No selectivos	Tóxico para ambos, cultivos y malezas.
Herbicidas	Malezas	De postemergencia	Eficaz cuando es aplicado después de la cosecha o malezas.
Insecticidas	Insectos	De preemergencia	Eficaz cuando es aplicado después de la siembra y antes de la cosecha.
Acaricida (miticida)	Ácaros y garrapatas	De presiembra	Eficaz cuando es aplicado antes de la siembra.
Molusquicida	Babosas y caracoles	Protectores	Eficaz cuando es aplicado antes de que el patógeno infecte a la planta.
Nematicida	Nematodos	Selectivos	Tóxico solo para la maleza.
Regulador del crecimiento vegetal	Crecimiento de las plantas	Esterilizantes del suelo	Tóxico para toda la vegetación.
Rodenticida	Roedores	Veneno estomacal	Mata plagas después de su ingestión.
Conservantes de la madera	Destruyores de la madera	Sistémicos	Transportado a través de cultivos o plagas después de su adsorción.

Tabla 4. Ejemplos de plaguicidas clasificados según el los organismos que controlna y la composición química.

TIPO	FAMILIA QUÍMICA	EJEMPLOS
INSECTICIDAS	Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín
	Organofosforados	bromofos, diclorvos, malatión
	Carbamatos	carbaril, metomil, propoxur
	Piretroides	cypermctrina, fenvalerato, permetrina
	Nitroguanidinas	acetamiprid, imidacloprid.
	Benzoilurea	novalurón, clorfluazurón, teflubenzurón.
	Compuestos de origen vegetal	rotenona, nicotina, aceite de canola
	Compuestos orgánicos del estaño	cyhexatin, dowco, plictrán
HERBICIDAS	Sulfitos	glifosato
	Imidazolinonas	imazaquim, imazetapir, imazapir
	Triazinas	prometrina
	Acetanilidas	acetoclor, alaclor
	Derivados benzoicos	dicamba
	Benzonitrilos	bromoxinil
	Diazinas	bentazón
	Derivados del ácido fenoxiacético	dicloroprop, piclram, silvex, ácido 2,4-diclorofenoxiacético
	Derivados de triazinas	atrazine, ametryn, desmetryn, simazine
	Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
	Derivados biperidilos	clormequat, diquat, paraquat
FUNGICIDAS	Metoxiacrilatos	azoxistrobina
	Triazoles	epoxiconazole, ciproconazole, difenoconazole, propiconazole, fenbuconazole, flutriafol, tebuconazole. flusilazole
	Bencimidazoles	carbendazim, tiabendazol, metil tiofanato.
	Derivado del benceno	clorotalonil
	Tiocarbamatos	ditiocarbamato, mancozeb, maneb
	Compuestos inorgánicos	Arsénico pentóxido, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio y fósforo blanco

Otras clasificaciones se basan en el criterio del tipo de biomolécula con la cual el compuesto reacciona o el daño producido (Stenersen 2004). Según esto, los plaguicidas pueden:

- **Inhibir enzimas:** una sustancia inhibe o interfiere con la función enzimática, ya sea por inhibición directa de la enzima o su transporte

- **Alterar señales químicas:** ciertas sustancias interfieren con los sistemas de señalización química intra- o extracelular, generando que ésta sea más potente, o más débil o bien se produzca en “tiempos erróneos” no adecuados. De modo general, se denominan agonistas a aquellas sustancias que imitan una señal y antagonistas a aquellas que bloquean un receptor de señal.
- **Generar moléculas reactivas:** oxidan o reducen moléculas generando radicales libres que destruyen biomoléculas y componentes celulares.
- **Modificar el gradiente de pH de membranas:** degradan la membrana mitocondrial, o de los cloroplastos, y alteran el gradiente de iones H^+ al interior y exterior de la membrana, lo que provoca disturbios en la producción de energía.
- **Degradar membranas celulares:** las sustancias lipofílicas degradan la estructura fosfolipídica de las membranas celulares cambiando sus características físicas y por ende su función.
- **Alterar el balance electrolítico, osmótico o de pH:** alteran dichas condiciones provocando trastornos fisiológicos en el organismo.
- **Destruir tejidos, proteínas o ADN:** sustancias ácidas o alcalinas fuertes pueden degradar y dañar tejidos.

Dicha clasificación constituye el marco de referencia para la mayoría de los estudios toxicológicos y se basa en información toxicológica referente al ingrediente activo de un determinado compuesto. Sin embargo, no hace referencia a los productos comerciales que son en definitiva los que se aplican en la práctica y cuya formulación incluye otros compuestos como aditivos que facilitan y favorecen su absorción y/o transporte a través de los sistemas biológicos (Mesnage y Antoniou 2018). Otros tipos de clasificación de los plaguicidas incluyen información referente a su persistencia o grado biodegradabilidad en el ambiente, su capacidad de bioacumulación en los sistemas biológicos. Estas particularidades tienen relación con las características químicas del compuesto y son de importancia ya que permiten tener un panorama integral de la dinámica de los plaguicidas (Akashe et al. 2018).

La aplicación de plaguicidas es necesaria para lograr altos rendimientos productivos, sin embargo, su aplicación ha resultado en la contaminación de alimentos y agua (El-Nahhal 2004) y daños continuos a los ecosistemas. Numerosos estudios en todo el mundo han documentado la contaminación y el impacto por acción y efecto de plaguicidas y/o sus residuos en los suelos y los ecosistemas terrestres y acuáticos, incluidos los sistemas marinos costeros, y sus efectos tóxicos en los seres humanos y la biota no humana (Llorent Martínez et al. 2011, Li y Jennings 2017, Mohammed et al. 2019, Olisah et al. 2020, El-Nahhal 2020, El-Nahhal y El-Nahhal 2021). Aunque los productos químicos orgánicos persistentes han sido reemplazados por productos químicos biodegradables, la contaminación por residuos heredados y residuos recientes todavía tiene un impacto en la calidad de los alimentos, el agua y el ambiente (Carvalho 2017). Estas experiencias han despertado el interés y necesidad de la comunidad científica de destinar un importante esfuerzo a conocer y evaluar los efectos tóxicos de los plaguicidas y sus manifestaciones en los ecosistemas naturales con el fin de implementar leyes y controles tendientes a evitar o bien minimizar los daños ambientales (Hanson et al. 2017).

El uso extensivo de plaguicidas es la causa de frecuentes problemas de salud, que afectan a los agricultores y a los habitantes de las zonas rurales (El-Nahhal y El-Nahhal 2021) y de la contaminación de los ambientes naturales asociados a los agroecosistemas (Alonso et al. 2018, Bernasconi et al. 2021). La agricultura es actualmente una de las actividades de uso del suelo con más extensión del planeta, y se espera que para el año 2050 las tierras agrícolas se incrementen aproximadamente en un 70% (Velásquez Trujillo y Grisales 2021). En los sistemas agrícolas habitan numerosas especies animales como aves (Tscharrntke et al. 2008, Codesido et al. 2011, Velásquez Trujillo y Grisales 2021), mamíferos (Castellarini et al. 2003, Gheler-Costa et al. 2012), reptiles (Jayakumar y Nameer 2018) y anfibios (Bonin et al. 1997, Peltzer et al. 2005, 2006). Asimismo, debe considerarse la importancia de invertebrados como los nematodos (Yeates y Bongers 1999), anélidos y oligoquetos (Kasprzak 1982, Parmelee et al. 1990), y artrópodos (Herrera et al. 2005), así como también la microbiota compuesta por microalgas, hongos, bacterias y protozoos (Paoletti et al. 1992). Todos estos organismos y microorganismos cumplen importantes funciones ecológicas, siendo benéficos para la agricultura (Kazemi et al. 2018). En los sistemas agrícolas, la biota presta servicios ecosistémicos que incluyen el reciclaje de nutrientes, mantenimiento de

la estructura y fertilidad del suelo, el control del microclima local, la regulación de los procesos hidrológicos locales, la regulación de la abundancia de organismos indeseables, la detoxificación de sustancias químicas nocivas, purificación del agua, y polinización (Garbach et al. 2014). Por ello, el uso de agroquímicos significa un grave riesgo para numerosas comunidades silvestres asociadas a estos ecosistemas (Chávez-Suárez et al. 2021, Suárez et al., 2021). Los efectos adversos sobre los ecosistemas, así como los efectos perjudiciales sobre la biota, dependen de la toxicidad del plaguicida, las medidas tomadas durante su aplicación, la dosis aplicada, la adsorción a los coloides del suelo, las condiciones climáticas que prevalecen después de la aplicación, el tiempo de persistencia del plaguicida en el ambiente, entre otros (Connell 2022). Por lo tanto, la evaluación de los riesgos de su impacto en la salud humana o en el ambiente no es un proceso fácil ni preciso debido a la multiplicidad de factores intervinientes como el tipo de plaguicida utilizado, su toxicidad y persistencia, el nivel de exposición y las características ambientales locales (Damalas y Eleftherohorinos, 2011). Se ha reconocido una serie de impactos ambientales indeseables asociados con el uso de fertilizantes y plaguicidas, que impactan en la biodiversidad incluyiendo microorganismos, plantas, invertebrados y vertebrados (Valderrama et al. 2012, Castrejón Godínez et al. 2014). Identificar el impacto de estas prácticas sobre organismos no blanco es de importancia para evitar efectos adversos no deseados como la pérdida de biodiversidad (Mikó et al. 2017).

El uso de plaguicidas pone en riesgo la calidad de las aguas en las zonas cercanas a los campos de cultivo ya que estos compuestos se transportan a través del agua y la atmósfera contaminando tanto las aguas superficiales como las subterráneas (Figura 1). Los cuerpos de agua asociados a los sistemas agrícolas constituyen, en la mayoría de los casos, el destino final de una gran cantidad y variedad de plaguicidas (Rajmohan et al. 2020). La presencia de metales pesados, insecticidas, herbicidas, funguicidas, etc., resulta de la infiltración, deriva y escurrimiento durante o luego de su aplicación y pueden contaminar tanto aguas superficiales como subterráneas. En cuanto a las aguas superficiales, la concentración y el tipo de plaguicidas detectados dependen de la estación del año, las propiedades físicas y químicas del compuesto (solubilidad en agua, la persistencia o vida media o la capacidad de retención en el suelo) y de otros factores, como por ejemplo, la topografía del terreno y la frecuencia de lluvias. Estas variables

ambientales pueden, directa o indirectamente, por separado o en conjunto, influir en el posible efecto tóxico de una determinada sustancia. (Rajmohan et al. 2020).

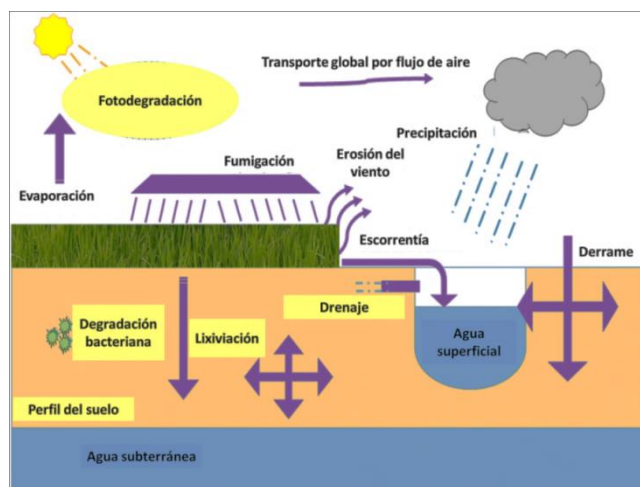


Figura 1: Etapas del ciclo de plaguicidas que llegan al ambiente. Modificado de: Rajmohan et al. (2020).

Los ambientes acuáticos albergan vertebrados e invertebrados susceptibles de ser afectados por la presencia de contaminantes. Estos organismos cumplen roles fundamentales dentro de las redes alimenticias y por lo tanto son componentes indudablemente necesarios para el funcionamiento y mantenimiento de la homeostasis de estos ecosistemas. Los anfibios, en particular las fases de vida acuáticas, representan un grupo clave en las redes tróficas de los ecosistemas acuáticos, siendo eslabones esenciales entre los productores y consumidores. Son organismos altamente sensibles a distintos agentes fisicoquímicos y la presencia de plaguicidas en el ambiente puede generar condiciones que afecten su supervivencia (Brühl et al. 2011, Cothran et al. 2013). La reproducción de los anfibios está asociada a cuerpos de agua lénticos y someros, donde los plaguicidas tienden a acumularse. Los riesgos asociados con la exposición a plaguicidas aumentan particularmente durante la primavera, momento en el cual tienen lugar las principales aplicaciones de agroquímicos coincidiendo con numerosos eventos reproductivos críticos como el desove, la puesta de huevos y el desarrollo embrionario de muchos organismos acuáticos (Pašková et al., 2011). En este contexto, se destaca la importancia de evaluar la toxicidad de los plaguicidas en distintos momentos del ciclo de vida de los anuros, incluyendo los estadios embrionarios y larvales tempranos que son vulnerables a la acción tóxica de distintos compuestos.

SECCIÓN I - INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Los insecticidas son agentes de origen químico o biológico que controlan insectos. Se utilizan en agricultura, horticultura, silvicultura, jardines y hogares. También se utilizan para controlar vectores, como mosquitos y garrapatas, que están involucrados en la propagación de enfermedades humanas y animales. Los insecticidas pertenecen a un gran número de clases químicas y ejercen su toxicidad a través de diferentes mecanismos de acción en insectos y otros organismos no blanco, incluidos los humanos (Ware y Whitacre 2004, Gupta et al. 2019).

Los compuestos organofosforados representan una de las clases más importantes de insecticidas. Tienen efecto inhibitorio sobre la acción de la enzima acetilcolinesterasa encargada de la degradación del neurotransmisor acetilcolina en la placa sináptica (Chambers et al. 2010). La acetilcolina es un neurotransmisor fisiológico del potencial de acción desde a) neuronas postganglionares a las neuronas preganglionares en sistema nervioso simpático y parasimpático, b) fibras postganglionares del sistema parasimpático a los órganos efectores, c) fibras postganglionares simpáticas a las glándulas secretoras, d) neuronas motoras al músculo esquelético, e) terminaciones nerviosas del sistema nervioso central (O'Brien 2014). La inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) conduce a la acumulación endógena de acetilcolina (ACh) lo que altera el normal funcionamiento del sistema nervioso. Dado que la acetilcolinesterasa es la enzima que degrada a acetilcolina tras la estimulación de un nervio, la inhibición de dicha enzima por los insecticidas organofosforados conduce a la acumulación de acetilcolina alterando la neurotransmisión. Esto produce, por ejemplo, la sobreestimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos para acetilcolina en órganos como corazón, ojos, glándulas, tracto gastrointestinal y sistema respiratorio y receptores nicotínicos en el sistema muscular y esquelético y sistema nervioso central (corteza cerebral y de distintos tractos encefálicos y medulares). Cuando la inhibición de esta enzima es excesiva, el neurotransmisor acetilcolina se acumula dando como resultado hiperactividad, espasmos musculares y eventualmente parálisis (Colovic et al. 2013). Asimismo, se ha demostrado que la actividad de la acetilcolinesterasa está estrechamente relacionada con la formación de órganos y que existe una relación funcional entre la actividad de esta enzima y los movimientos morfogenéticos y la diferenciación del sistema nervioso (Drews 1975).

La interacción de los insecticidas organofosforados con la acetilcolinesterasa se produce en un sustituyente hidroxilo del aminoácido serina, con la formación de una versión fosforilada de la enzima, muy estable y prácticamente inactiva. Los sustituyentes del grupo fosfato original del insecticida desempeñan un papel importante en la especificidad de la reacción química de la enzima y la estabilidad del producto formado. Asimismo, la enzima fosforilada tiende a experimentar un fenómeno conocido como “envejecimiento”, provocado por la desalquilación de la enzima desactivada. Este fenómeno produce el fortalecimiento del enlace del grupo fosfato y el sitio activo de la enzima, dificultando aún más su reactivación. La formación de enlaces irreversibles con la enzima es característica de los organofosforados, por lo que sólo se recupera el funcionamiento normal del sistema nervioso cuando se ha sintetizado enzima nueva suficiente para reemplazar la enzima inactivada y degradar el exceso de acetilcolina en la placa sináptica (Pundir y Chauhan 2012).

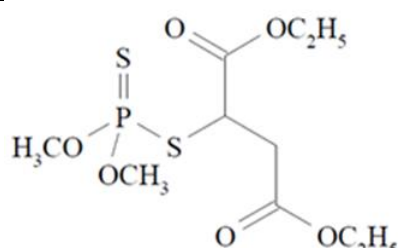
El comportamiento medioambiental de los insecticidas organofosforados varía en función de la estructura molecular de cada compuesto. En general, se trata de compuestos poco volátiles, fotolíticos, hidrolizables y biodegradables. La biodegradación de este tipo de insecticidas en el ambiente se produce por mecanismos reductores y oxidantes. Su vida media es variable también dependiendo del compuesto. No menos de 40 compuestos organofosforados se encuentran en el mercado mundial y algunos de ellos están considerados dentro de los tóxicos más potentes de uso agrícola. Pertenecen a este tipo de insecticidas el diazinón, fention, clorpirifos, coumafos, malatión, paratión y metilparatión, entre los más representativos (Chambers et al. 2010).

TOXIDAD DEL MALATIÓN Y GLACOXÁN 50M®

INTRODUCCIÓN

El malatión (Tabla 1), también denominado, mercaptotión, carbofos, marcaptotión o maldison, es un insecticida no sistémico de amplio espectro, ampliamente utilizado en la agricultura y en programas de salud pública para el control y erradicación de insectos domésticos (EPA, 2006). Se utiliza habitualmente para el control de mosquitos y de diversos insectos que infestan frutas, hortalizas, arbustos y plantas ornamentales. Asimismo, su uso se extiende al control de garrapatas e insectos parásitos de humanos y de animales de compañía. En agricultura, el malatión se usa para el control de una amplia variedad de insectos (homópteros, ortópteros dípteros) y arácnidos plaga (Tchounwou et al. 2015). Ingresa a los organismos blanco de acción principalmente por ingesta y por el aire, a través de los espiráculos del sistema respiratorio.

Tabla 1: Características físico-químicas del malatión (Newhart 2006).

Nombre químico (IUPAC)	2-[(dimetoxifosforotioil)sulfanil]butanodioato de dietilo
Estructura molecular	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂
Estructura química	
Número CAS	121-75-5
Propiedades	Líquido de transparente a ámbar con olor a mercaptano.
Constante de la ley de Henry	4.89X10-9 atm / m3 mol
Gravedad específica	1,23 a 25 °C
Punto de fusión	2,85 °C
Peso molecular	330,36
Solubilidad en agua	130 mg/l
Coefficiente de partición	2,7482
Coefficiente de adsorción	1.800
Presión de vapor	3.38X10-6 mm Hg a 30 ° C
Solubilidad	Miscible en la mayoría de disolventes orgánicos.
Toxicidad	Clase III: levemente tóxico

El malatión, es un compuesto ligeramente tóxico (clase III) según la EPA, y las etiquetas de los productos con malatión deben llevar la palabra de advertencia "PRECAUCIÓN". No es un insecticida puro sino un "complejo" que incluye, además del malatión propiamente dicho, impurezas como los trimetil fosfatos, el malaoxón e incluso ingredientes "inertes" de alto riesgo. El malaoxón es un análogo de oxígeno del malatión y se puede encontrar como impureza, o puede generarse durante la oxidación de malatión en el aire o en el suelo. El malaoxón es el metabolito activo inhibidor de la colinesterasa y tanto el malatión como el malaoxón son degradados por carboxiesterasas a compuestos polares solubles en agua que se excretan (Newhart 2006, Sparling, Fellers 2007)

La hidrólisis es la principal vía de degradación del malatión en el medio acuático, en condiciones aeróbicas. La degradación del malatión en agua depende del pH, siendo rápida a $\text{pH} > 7,0$ y más lenta a $\text{pH} < 7,0$. El tiempo medio para la descomposición química en el agua ($\text{pH} = 7,4$ a 20°C) es de aproximadamente 11 días. Los metabolitos resultantes de hidrólisis incluyen malaoxón, malatión alfa y beta monoácido, dietilfumarato, dietiltiomalato, ácido O, O-dimetilfosforoditioico, dietiltiomalato y ácido O, O-dimetilfosforotiónico. La biodegradación también juega un papel importante, cuando el $\text{pH} < 7,0$ y la velocidad de hidrólisis es lenta. Los componentes de degradación por biodegradación incluyen: ácido beta monocarboxílico, ácido dicarboxílico y tiomalato de dietilo. En ciertas condiciones, por ejemplo, pH bajo y contenido orgánico bajo, el malatión puede persistir en el agua y tener un periodo de semidegradación de meses o incluso años. No obstante, en la mayoría de las condiciones este periodo es de unos 7-14 días (Newhart 2006).

Si bien no hay muchos estudios de monitoreo de plaguicidas organofosforados en general y del malatión en particular, su monitoreo en los ambientes naturales y es muy importante para establecer límites de tolerancia y realizar recomendaciones de ciertas prácticas agrícolas (Karyab et al. 2013). Segawa et al. (1991) detectaron un promedio de 49,4 $\mu\text{g/l}$ de malatión en cuerpos de agua dulce inmediatamente después de la aplicación aérea de malatión para erradicar la mosca de la fruta, en California. Asimismo, Ando et al. (1996) monitorearon la presencia de malatión en agua de escorrentía, durante el periodo de aplicación y detectaron concentraciones de hasta 7,871 mg/l en aguas de escorrentía, luego de 3 días de su aplicación, y 1,602 mg/l , luego de 12 días de aplicación. En cuerpos de agua se registraron concentraciones promedio

de 0,442 mg/l con un rango entre 0,391 a 0,503 mg/l. Estudios en el río Ganges en la región de Kanpur en India reportaron la presencia de residuos de malatión en cuerpos de agua de zonas agrícolas, registrándose concentraciones máximas de malatión de 0,298 mg/l en agua de superficie (Sankararamakrishnan et al. 2005) y entre 0,000855 y 0,01624 mg/l, en agua subterráneas (Agarwal et al. 2015). Chowdhury et al. (2012) reportaron valores de 0,1052 mg/l de malatión en zonas agrícolas de Bangladesh. En muestras de agua del río Shahrood en Irán, Karyab et al. (2013) registraron concentraciones de hasta de 0,0181 mg/l de malatión. En Argentina, Williman et al. (2017) reportaron concentraciones de hasta 0,000953 mg/l de malatión en el río Uruguay, en una zona agrícola de la cuenca de Salto Grande, monitoreada estacionalmente durante 2 años. Recientemente, Vasseghian et al. (2021), realizaron una revisión acerca de las concentraciones de malatión registradas en aguas superficiales, aguas subterráneas y agua de consumo de 15 países y reportaron un rango de entre a 0,0018 a 25,8 mg/l para aguas superficiales, con valores máximos de 113,7 mg/l.

En los últimos veinte años se recopiló abundante evidencia bibliográfica acerca de los efectos negativos del malatión sobre la salud humana (Tchounwou et al. 2015) y la fauna silvestre. Estudios realizados en aves (Mahmoud et al. 2012, Hussain et al. 2015), evidenciaron su efecto mutagénico y gonadotóxico. Para los peces, este compuesto muestra un rango amplio de toxicidad, desde muy tóxico hasta levemente tóxico. En estudios de toxicidad aguda, los valores de CL50 para peces variaron entre 0,7 µg/l y 11,7 mg/l (Nguyen y Janssen 2001, Deka y Mahanta 2016). El valor LOEC para embriones de *Danio rerio* fue de 10 mg/l para letalidad, sin embargo se observó inhibición de la eclosión de embriones expuestos a 3,0 mg/l así como también anomalías en el desarrollo y crecimiento. Nguyen y Janssen (2002) compararon los valores LOEC de malatión para embriones de *Clarias gariepinus* y *Danio rerio* considerando sobrevida, eclosión, anormalidades y crecimiento. El valor LOEC para sobrevida fue de 10 mg/l y > 5 mg/l, el valor LOEC para eclosión fue de 3 mg/l y > 5 mg/l, el valor LOEC para anormalidades fue de 3 mg/l y 1,25 mg/l y el valor LOEC para crecimiento fue > 1 mg/l y 1,25 mg/l para *Danio rerio* y *Clarias gariepinus* respectivamente. Asimismo, Beauvais et al. (2000) reportaron que concentraciones de hasta 40 µg/l provocaron cambios en el comportamiento de natación de *Oncorhynchus mykiss* debido a la inhibición de la acetilcolinesterasa. La exposición a malatión también alteró, en *Lepomis macrochirus*, el funcionamiento de las branquias y produjo

dificultades respiratorias debido a la pérdida de adhesión entre las células epiteliales que resulta en el colapso de la integridad estructural de las laminillas branquiales (Richmonds y Dutta 1989). Asimismo, Patil y David (2008) registraron, en ejemplares de *Labeo rohita* expuestos a concentraciones letales y subletales de malatión, aumento en el consumo de oxígeno como consecuencia del deterioro del metabolismo oxidativo provocado por el tóxico.

La tabla 2 muestra los valores de CL50 para larvas de distintas especies de anuros expuestas a malatión, ingrediente activo o formulado comercial.

Tabla 2: Valores de CL50 de malatión (ingrediente activo y formulados comerciales) para larvas de distintas especies de anuros. Datos obtenidos de: ECOTOX (Ecotoxicology Knowledgebase).

ESPECIE	TIPO DE COMPUESTO	ESTADIO	CL 50 (mg/l)	REFERENCIA
<i>Bufo americanus</i>	Formulado comercial	Larvas	5,9	Relyea (2004)
<i>Duttaphrynus melanostictus</i>	Formulado comercial	Larvas	7,5	David y Kartheek (2015)
<i>Euphlyctis cyanophlyctis</i>	Formulado comercial	Larvas	3,523	Giri et al. (2012)
<i>Euphlyctis cyanophlyctis</i>	Formulado comercial	Larvas	3,588	Giri et al. (2012)
<i>Euphlyctis hexadactylus</i>	Ingrediente activo	Larvas	0,00354	Khangarot et al. (1985)
<i>Euphlyctis hexadactylus</i>	Ingrediente activo	Larvas	0,000613	Khangarot et al. (1985)
<i>Euphlyctis hexadactylus</i>	Ingrediente activo	Larvas	0,000613	Khangarot et al. (1985)
<i>Euphlyctis hexadactylus</i>	Ingrediente activo	Larvas	0,000846	Khangarot et al. (1985)
<i>Euphlyctis hexadactylus</i>	Ingrediente activo	Larvas	0,00059	Khangarot et al. (1985)
<i>Hyla versicolor</i>	Formulado comercial	Larvas	4,13	Relyea (2004)
<i>Limnonectes limnocharis</i>	Ingrediente activo	Larvas	5,37	Gurushankara et al. (2007)
<i>Lithobates clamitans</i>	Formulado comercial	Larvas	3,65	Relyea (2004)
<i>Lithobates pipiens</i>	Formulado comercial	Larvas	2,4	Relyea (2004)
<i>Lithobates sylvaticus</i>	Formulado comercial	Larvas	1,25	Relyea (2004)
<i>Rana boylii</i>	Ingrediente activo	Larvas	2,13	Sparling y Fellers (2007)
<i>Rana catesbeiana</i>	Formulado comercial	Larvas	1,5	Relyea (2004)
<i>Rana ridibunda</i>	Ingrediente activo	Larvas	38	Sayim (2008)
<i>Rana ridibunda</i>	Formulado comercial	Larvas	29	Sayim (2008)
<i>Rhinella arenarum</i>	Formulado comercial	Larvas	19,2	Venturino et al. (1992)
<i>Xenopus laevis</i>	Ingrediente activo	Larvas	6,7	Yu et al. (2013)

Fordham et al. (2001) reportaron reducción en la sobrevivencia, retraso en el desarrollo y crecimiento y pérdida de equilibrio de *Rana catesbeiana*, por exposición a concentraciones de 2,5 mg/l, y superiores, de malatión. Taylor et al. (1999) reportaron

que machos adultos de *Anaxyrus woodhousi* tratados con dosis alta o baja, 0,011 o 0,0011 mg de malatión/gramo, respectivamente, fueron más susceptibles a sufrir infecciones con *Aeromonas hydrophila*, hepatomegalia y muerte. En larvas de *Xenopus laevis*, la exposición a malatión y maloxón produjo reducción de la talla, pigmentación anómala, intestino anormal, agrandamiento de las aurículas y aorta, curvaturas de la notocorda, incurvaciones del eje, retraso en el crecimiento y desarrollo, y anomalías vasculares (Snawder & Chambers 1990, 1993). En *Rhinella arenarum*, la exposición continua a malatión durante el periodo embrionario provoca depresión de la actividad de acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa y carboxilesterasa y detenimiento del desarrollo (de Llamas et al. 1985, Caballero de Castro et al. 1991). Gurushankara et al. (2007a) observaron que la exposición a malatión provocó alteraciones en el crecimiento; redujo la longitud y peso del cuerpo y disminuyó el consumo de alimentos en larvas de *Fejervarya limnocharis*. Asimismo, Gurushankara et al. (2007b) reportaron para esta misma especie, alteraciones en el metabolismo de lípidos, como incremento en la cantidad de lípidos totales y de ácidos grasos y glicerol y aumento de la actividad de lipasas, luego de la exposición a concentraciones letales y subletales de malatión. En larvas de *Pelophylax ridibundus*, expuestas a malatión, se registraron ciertos signos de toxicidad como síntomas hiperactivos, pérdida del equilibrio, inmovilidad y muerte así como también retraso del crecimiento y malfomaciones (Sayim 2008). Este autor confirmó, además, que el formulado a base de malatión resultó más tóxico que el ingrediente activo solo. En larvas *Euflyctis cyanophlyctis* la exposición a concentraciones subletales de malatión indujo la aparición de micronúcleos en eritrocitos a partir de las 24 h de exposición y en forma dosis dependiente, lo que demostró su acción genotóxica (Giri et al. 2012). Sparling y Fellers (2007) compararon el efecto letal de pesticidas organofosforados, incluido el malatión, sobre larvas de *Rana boylei* y reportaron una CL50 de 2.14 mg/l de malatión registrando además que el maloxón resulta 100 veces más tóxico que el malatión puro. Yu et al. (2013) demostraron que el malatión causa letalidad, malformaciones e inhibición del crecimiento de larvas de *Xenopus laevis*. Asimismo, Webb y Crain (2006) reportaron alteraciones en la cola, natación anómala y letalidad en larvas de *Xenopus laevis*, por exposición crónica a 1 mg/l de malatión. Otros autores relacionaron la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa con alteraciones del desarrollo en *Xenopus laevis*, destacando el efecto teratogénico de los organofosforados en anfibios (Richards y Kendall 2002,

Bonfanti et al. 2004). Para el caso de *Rhinella arenarum* existe escasa información acerca de los efectos adversos de este pesticida. Rosenbaum et al. (1988) reportaron datos acerca de la letalidad, inhibición de colinesterasas, cambios en el contenido de proteínas y aumento de fosfolípidos en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a malatión. En este estudio se analiza la toxicidad del malatión durante el desarrollo embrionario y larval de *Rhinella arenarum*, comparando los efectos del ingrediente activo (i.a.) y un formulado comercial.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Determinar la toxicidad aguda y crónica del insecticida malatión (i.a.) sobre embriones y larvas de *Rhinella arenarum*.
- 2) Analizar comparativamente la toxicidad del insecticida malatión (i.a.) y un formulado comercial (Glacoxán 50M®) durante el desarrollo embrionario y larval temprano de *Rhinella arenarum*.
- 3) Evaluar los efectos letales y subletales (narcosis, alteraciones del comportamiento, alteraciones morfológicas (teratogénesis), retraso en el desarrollo y alteraciones del crecimiento) por exposición a malatión (i.a.) y Glacoxán 50M®.
- 4) Evaluar la susceptibilidad estadio-dependiente para cada compuesto e identificar los estadios embrionarios y/o larvales más sensibles.

METODOLOGÍA

Metodología empleada para los estudios con malatión (i.a.)

Los ensayos se realizaron siguiendo las condiciones estandarizadas del test AMPHITOX (Herkovits et al. 2002, Herkovits y Pérez-Coll 2003, Pérez-Coll et al. 2017).

Se preparó una Solución Madre (SM) de 4.935 mg/l malatión (98,7 % pureza certificada por Dr. Ehrenstorfer GMBH) en 50 ml de acetona, la cual fue conservada a 4°C. A partir de esta SM se prepararon las diferentes diluciones en SA empleadas en los bioensayos. Las concentraciones de ensayo estuvieron comprendidas dentro del rango de 2 a 40 mg/l de malatión (i.a), más un control con SA (CSA) y un control con acetona (CA), a la concentración presente en la concentración más alta del tóxico.

Se realizaron los siguientes bioensayos:

- 1) Test AMPHIACUT. Ensayo agudo estático de 96 h de exposición con larvas en E. 25 (opérculo completo). Concentraciones de ensayo: 22,2; 24,6; 27,4; 33,8 y 37,6 mg/l malatión (i.a.), más CSA y CA.
- 2) Test AMPHICHRO. Ensayo semiestático crónico de 15 días de duración con renovación del medio cada 96 h, con larvas en E. 25 (opérculo completo). Concentraciones de ensayo: 2, 4, 8, 16 y 32 mg/l malatión (i.a.), más CSA y CA.
- 3) Test AMPHIEMB. Ensayo de 120 h de duración con embriones a partir del E. 3 (2 blastómeros). Concentraciones de ensayo: 2, 4, 8, 12, 20 y 30 mg/l malatión (i.a.), más CSA y CA.
- 4) Test de EXPOSICIÓN POR PULSO. Ensayo de exposición al tóxico durante 24 h y posterior cambio a SA con larvas en E. 25 (opérculo completo). Concentraciones de ensayo: 25, 30, 35 y 40 mg/l malatión (i.a.), más CSA y CA.

Puntos finales

Los parámetros de toxicidad evaluados fueron: letalidad y efectos subletales (narcosis, alteraciones del comportamiento, alteraciones morfológicas (teratogénesis), retraso en el desarrollo y alteraciones del crecimiento)

Metodología empleada para los estudios comparativos entre con malatión (i.a.) y Glacoxán 50M®

Una vez conocidos los rangos de toxicidad de malatión (i.a.) mediante ensayos preliminares, se realizaron los ensayos definitivos comparando la toxicidad del i.a. y Glacoxán 50M®, un formulado comercial compuesto a base de 50 % malatión más adyuvantes (emulsionantes y solventes). Dicho producto se encuentra inscripto en la S.A.G.P. y A. (SENASA) con el N° 00090 y clasificado como Poco Peligroso (Clase III) (<https://Glacoxán.com/#>).

Se preparó una SM de Glacoxán 50M®, disuelta en xileno, con una concentración equivalente a 1 g/l de malatión (i.a.), a partir de la cual se prepararon las soluciones empleadas en los diferentes ensayos.

Las concentraciones de ensayo estuvieron comprendidas dentro del rango de 10 a 59,5 mg/l de malatión (i.a) equivalente, más un CSA, CA y control en xileno (CX), los dos últimos a la máxima concentración presente en la concentración más alta del tóxico

Se realizaron los siguientes bioensayos:

- 1) Test AMPHISHORT. Ensayo crónico corto de 144 h de exposición a malatión (i.a.) y Glacoxán 50M® con larvas en E. 25 (opérculo completo). Concentraciones de ensayo: 10; 14,3; 20,4; 29,5; 41,6 y 59,5 mg/l de malatión (i.a.) equivalente, más CSA, CA y CX.
- 2) Test de EXPOSICIÓN POR PULSO. Ensayo de exposición a malatión (i.a.) y Glacoxán 50M® durante 24 h y posterior cambio a SA con embriones y larvas expuestos en diferentes estadios del desarrollo. Estadios del desarrollo: E. 10 (labio dorsal del blastoporo), E. 14 (pliegue neural), E. 18 (respuesta muscular) y E. 25 (opérculo completo). Concentraciones de ensayo: 14,3; 20,4; 29,5; 41,6 y 59,5 mg/l de malatión (i.a.) equivalente, más CSA, CA y CX.

Puntos finales

Los parámetros de toxicidad evaluados fueron: letalidad, alteraciones en el comportamiento y la morfología y crecimiento.

RESULTADOS OBTENIDOS

MALATIÓN (i.a.)

1) Test AMPHIACUT. Exposición aguda de larvas en E. 25 (opérculo completo) a malatión (i.a)

Efectos de letalidad y narcosis

El ensayo agudo mostró que concentraciones de 22,2 mg/l de malatión (i.a.) y superiores, produjeron un efecto narcótico durante las dos primeras horas de ensayo. En las horas subsiguientes, se evidenció una recuperación de la actividad motora, aunque en porcentaje variable, dependiendo de la concentración. A las 24 h de ensayo, el 100 % de las larvas expuestas a 22,2 mg/l malatión (i.a.), el 70 % de las larvas expuestas a 24,6

mg/l malatión (i.a.), y aproximadamente el 50 % de las larvas expuestas a 27,4; 33,8 y 37,6 mg/l malatión (i.a.) recuperaron la movilidad. Sin embargo, a lo largo del ensayo la sobrevida fue disminuyendo en todas las concentraciones siendo ésta a las 72 h del 97 %, 40 %, 33 %, 20 % y 0 % para 22,2; 24,6; 27,4; 33,8 y 37,6 mg/l malatión (i.a.) respectivamente. Al finalizar el ensayo, la sobrevida de los individuos fue del 57% para los expuestos a 22,2 mg/l malatión (i.a), mientras que las restantes concentraciones produjeron el 100 % de letalidad (Figura 1). En las larvas controles de SA y acetona la sobrevida fue del 100 y 97 %, respectivamente, a las 96 h de ensayo.

Las CLs 10, 50 y 90 y sus correspondientes límites de confianza (95 %) calculados para las 72 h de exposición a partir de tres bioensayos, fueron: 20,7 (18,3-23,2); 27,8 (25,5-31,8) y 37,6 (31,3-43,8) mg/l malatión (i.a.), respectivamente.

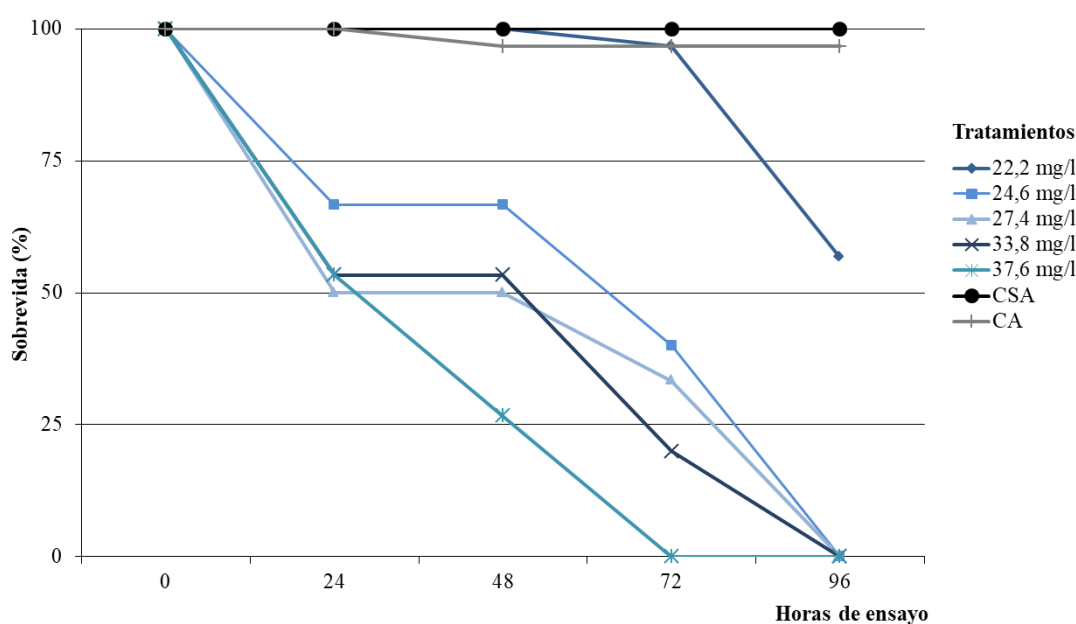


Figura 1: Curvas de sobrevida de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a malatión (i.a.) a partir del E. 25 (opérculo completo), durante 96 h. Los tratamientos se expresan en mg/l malatión (i.a.).

Alteraciones del comportamiento y de la morfología

Todas las larvas tratadas con malatión (i.a.) mostraron escasa respuesta al estímulo táctil, reaccionando con desplazamientos cortos y contracciones espasmódicas. A partir de las 48 h de ensayo, el 53 % de las larvas tratadas con 22,2 mg/l de malatión

(i.a.) presentó hidropesía abdominal y/o caudal, lo mismo que el 100 % de los individuos expuestos a concentraciones superiores. Asimismo, el 30 % de las larvas tratadas con el tóxico presentó incurvaciones del eje, al finalizar el ensayo. En los controles no se registraron alteraciones de la morfología ni del comportamiento de las larvas.

2) Test AMPHICHRO. Exposición crónica de larvas E. 25 (opérculo completo) a malatión (i.a.)

Efectos de letalidad y narcosis

La figura 2 muestra las curvas de sobrevivencia de las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas de forma crónica a malatión (i.a.). Los individuos del tratamiento control SA y control acetona, así como los tratados con 2 y 4 mg/l malatión (i.a.) alcanzaron una sobrevivencia de 90 a 100 %, al finalizar los 15 días de ensayo (360 h). Concentraciones de 8 y 16 mg/l no tuvieron efecto letal durante los primeros 7 días, aunque luego de la segunda y tercera renovación del medio la sobrevivencia disminuyó progresivamente hasta alcanzar el 57 y 0 %, respectivamente, al finalizar el ensayo. Las larvas expuestas a 32 mg/l malatión (i.a.) sufrieron un efecto narcótico dentro de las primeras horas de ensayo, evidenciándose una recuperación progresiva hasta las 96 h de ensayo. Sin embargo, luego de la primera renovación del medio, la sobrevivencia disminuyó a 0 %.

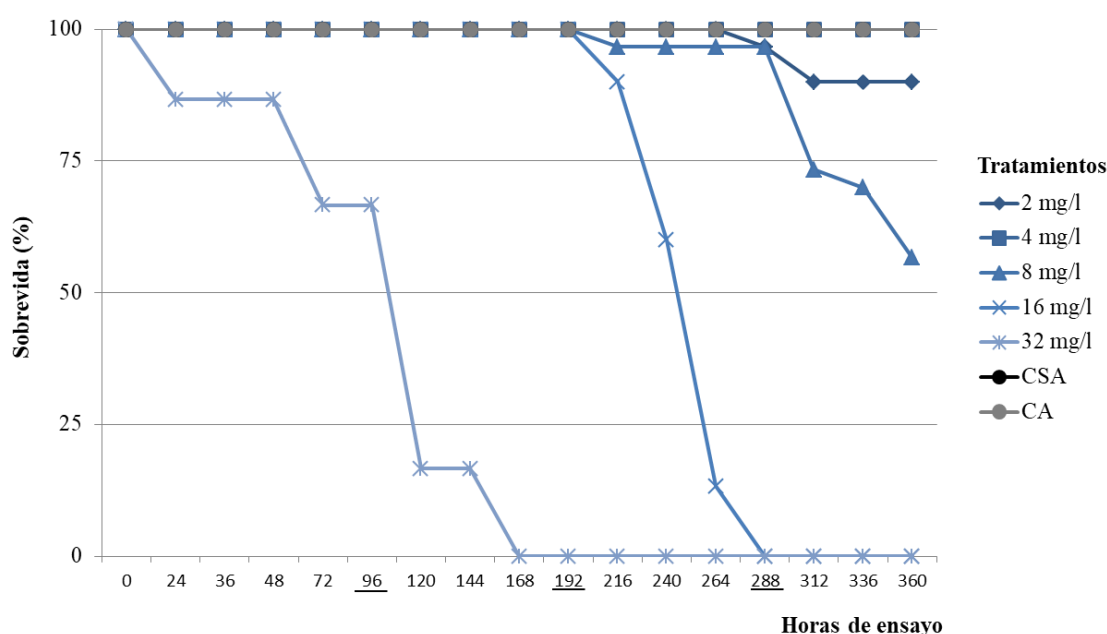


Figura 2: Curvas de sobrevida de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a malatión (i.a.) a partir del E. 25 (opérculo completo), durante 360 h (15 días). Las horas subrayadas indican el momento de la renovación del medio. Los tratamientos se expresan en mg/l malatión (i.a.).

Las CLs 10, 50 y 90 y sus correspondientes límites de confianza (95 %) calculados para las 96 h de exposición fueron: 23,2 (17,8-30,1), 31,8 (24,5-41,1) y 43,8 (34,1-56,9) mg/l malatión (i.a.). Las CLs 10, 50 y 90 y sus correspondientes límites de confianza (95%) calculados para las 144 h de exposición fueron: 16,7 (15,7-17,7), 18,5 (17,3-19,6) y 20,4 (19,2-21,7) mg/l malatión (i.a.). Las CLs 10, 50 y 90 y sus correspondientes límites de confianza (95%) calculados para los 10 días (240 h) de exposición fueron: 9,5 (7,5-11,9), 14,8 (11,8-18,6) y 23,1 (18,4-29,1) mg/l de malatión (i.a.). Las CLs 10, 50 y 90 y sus correspondientes límites de confianza (95%) calculados para los 15 días (360 h) de exposición fueron: 2,8 (1,7-4,6), 7,9 (4,9-12,9), 22,3 (13,7-36,2) mg/l de malatión (i.a.) (Figura 3). El NOEC para letalidad fue de 4 mg/l malatión (i.a.).

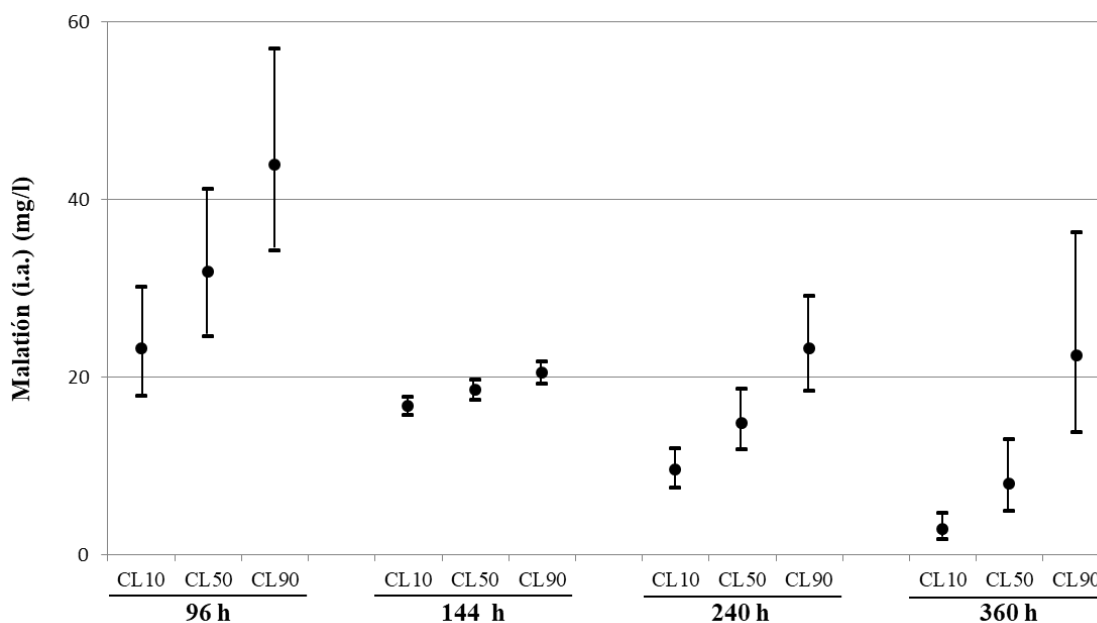


Figura 3: Comparación de la Concentración Letal (CL) 10, 50 y 90 y sus correspondientes límites de confianza (95 %), a distintos tiempos de ensayo, calculadas para larvas de *Rhinella arenarum* expuestas de forma crónica a malatión (i.a.) durante 15 días (360 h), a partir del E. 25 (opérculo completo).

Alteraciones del comportamiento y de la morfología

Las larvas tratadas con concentraciones de 4 mg/l malatión (i.a.) y superiores mostraron, durante todo el ensayo, escasa reacción al estímulo táctil, natación descoordinada con trayectorias en círculo y/o contracciones espasmódicas. Todas las larvas tratadas con 32 mg/l de malatión (i.a.) presentaron coloración pálida e hidropesía a partir de las 24 h de exposición al tóxico. Las larvas expuestas a 2 mg/l malatión (i.a.), así como también las del control SA y control de acetona, no mostraron anomalías en el comportamiento ni morfología. El NOEC (comportamiento y malformaciones) fue de 2 mg/l malatión (i.a.).

3) Test AMPHIEMB. Exposición de embriones en E. 3 (2 blastómeros) a malatión (i.a.)

Efectos de letalidad y narcosis

El ensayo con E. 3 no mostró diferencias significativas en la sobrevivencia de los individuos tratados con malatión (i.a.) con respecto a los controles y, en ninguno de los casos, la letalidad alcanzó el 20 %, a las 144 h de ensayo (Figura 4).

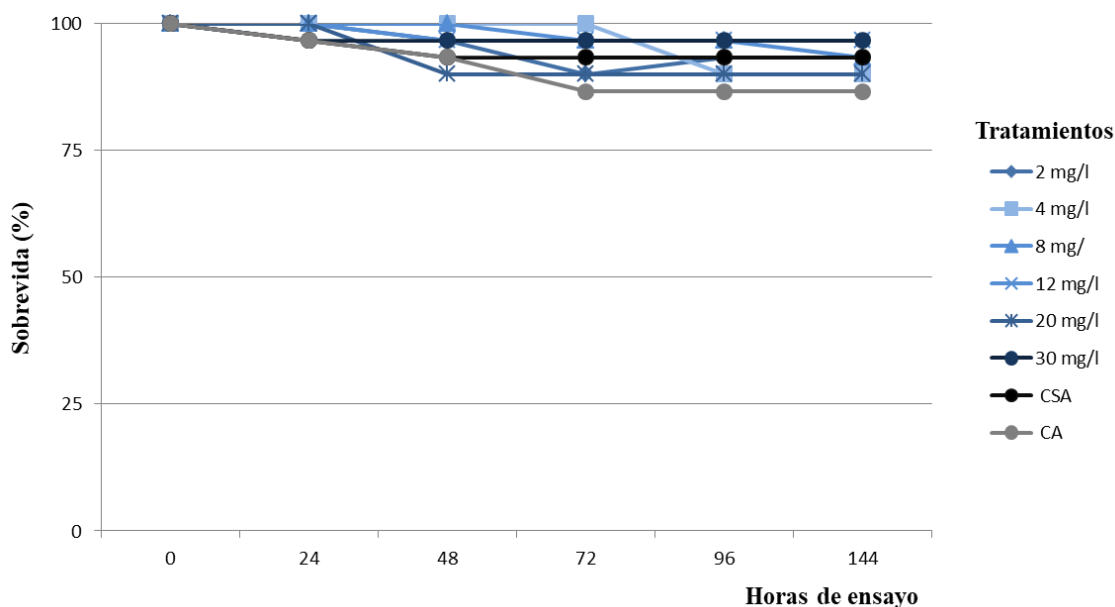


Figura 4: Curvas de sobrevivencia de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a malatión (i.a.) a partir del E. 3 (2 blastómeros) y hasta alcanzar el E. 25 (opérculo completo). Los tratamientos se expresan en mg/l malatión (i.a.).

Alteraciones del comportamiento y de la morfología

El análisis de los individuos al finalizar el ensayo reveló que los individuos del tratamiento control y tratados con malatión (i.a.) presentaron retraso en el desarrollo, reducción de la talla y/o alteraciones morfológicas en proporción variable dependiendo de la concentración.

La figura 5 muestra el porcentaje de sobrevida en comparación con el porcentaje de malformados y de individuos con retraso en el desarrollo por exposición a malatión (i.a.) durante el periodo embrionario y larval temprano.

A los 7 días de ensayo, alrededor del 90 % de los individuos del CSA y CA y los tratados con 2, 4 y 8 mg/l malatión (i.a.) alcanzaron el E. 25 (opérculo completo) mientras que con 12 mg/l malatión (i.a.) el 38 % de los individuos presentó retraso en el desarrollo y con concentraciones superiores, alrededor del 80 % de los individuos no había superado el E. 23 (pliegue opercular).

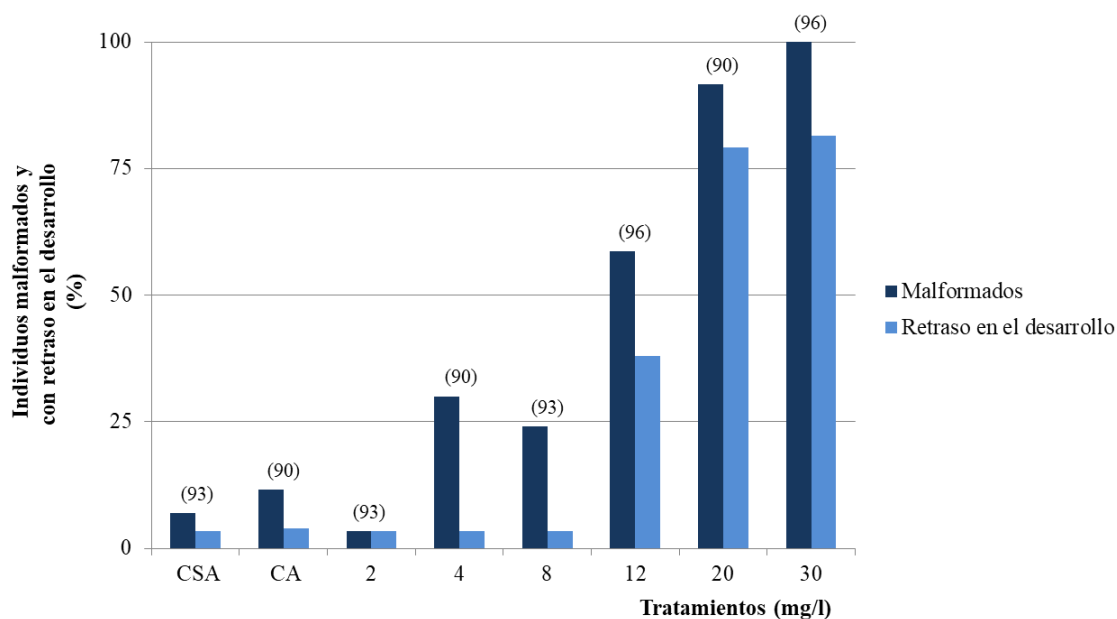


Figura 5: Porcentaje de individuos de *Rhinella arenarum* que presentaron malformaciones y retraso en el desarrollo por exposición a malatión (i.a.) a partir del E. 3 (2 blastómeros). Los tratamientos se expresan en mg/l malatión (i.a.). Los números en la parte superior de las barras indican el porcentaje de individuos sobrevivientes.

Los individuos tratados con malatión (i.a.) presentaron menor talla en comparación con los controles. El análisis de la varianza demostró diferencias significativas ($p \leq 0.05\%$) entre la LT alcanzada por los individuos control, comprendida

entre 10,1 y 10,4 mm, y los tratados con 20 y 30 mg/l malatión (i.a.) cuyo promedio fue de 8,9 y 8,1 mm, respectivamente (Figura 6).

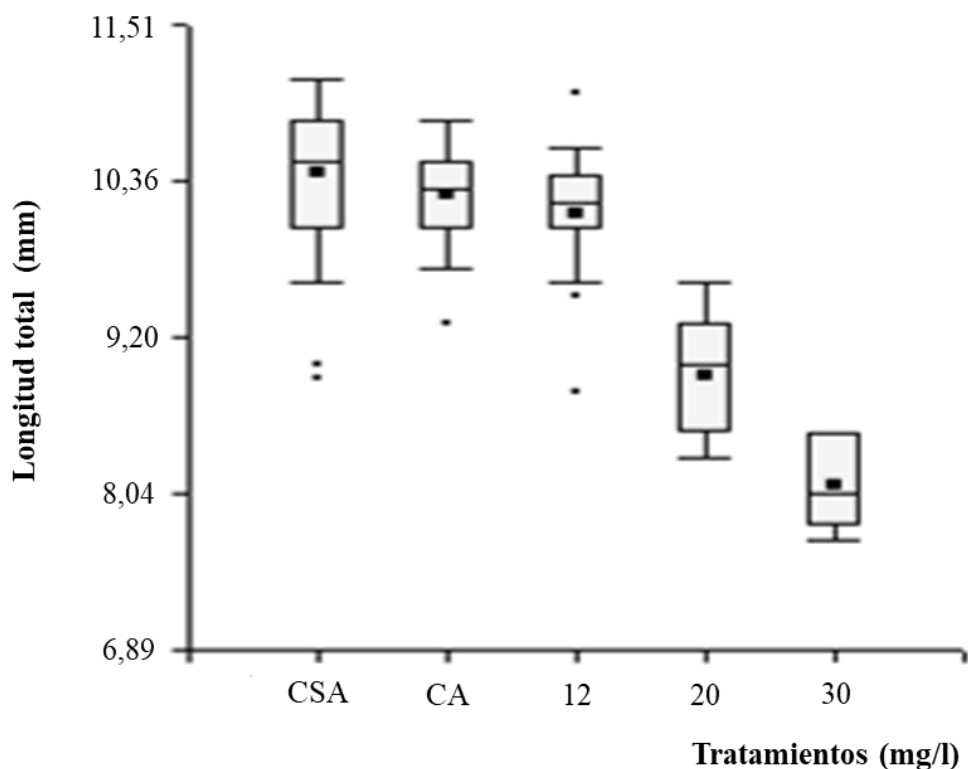


Figura 6: Comparación de la longitud total alcanzada por las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a malatión (i.a.) y CSA y CA, a partir del E. 3 (2 blastómeros). Los tratamientos se expresan en mg/l malatión (i.a.).

Al finalizar el ensayo, los individuos sobrevivientes a la exposición malatión (i.a.) mostraron natación errática, en círculo y contracciones espasmódicas. Asimismo, presentaron alteraciones morfológicas como subdesarrollo general, incurvaciones de la cola, hidropesía, microcefalia, agenesia de ojos, subdesarrollo del pliegue opercular sin formación del espiráculo, malformación de estructuras del disco oral, escaso desarrollo de la cola y/o subdesarrollo de branquias externas (Figuras 7 y 8).

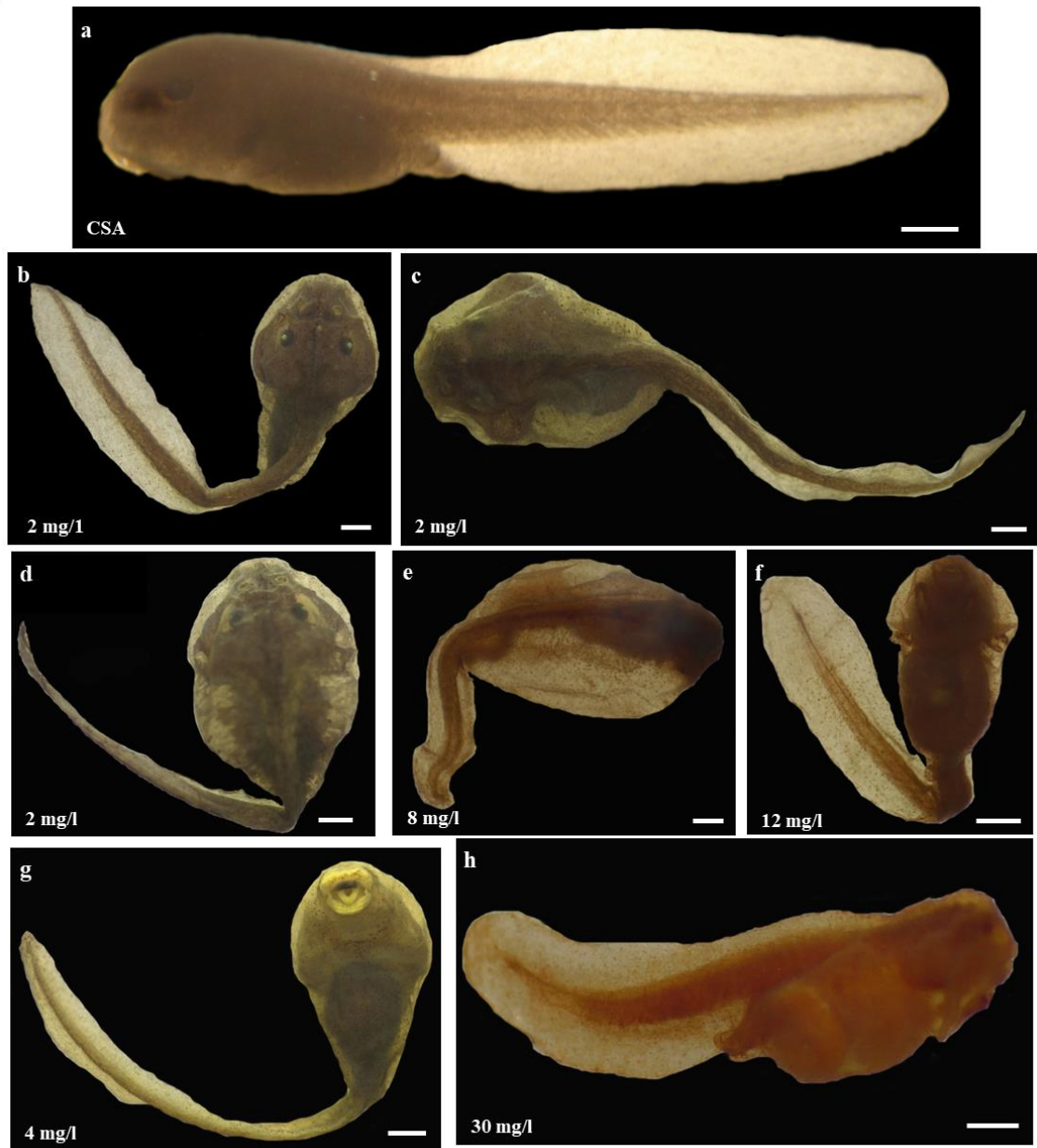


Figura 7: Alteraciones morfológicas de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a malatión (i.a.) desde el E. 3 (2 blastómeros), en comparación con el tratamiento control (CSA). a) vista lateral izquierda; b-e) vista dorsal; f, g) vista ventral; h) vista lateral derecha. Nótese: en b-h) incurvaciones de la cola; en d, e y h) subdesarrollo de la cola; en c, d y e) hidropesía; en h) retraso en el desarrollo. Escala: 0,5 mm.

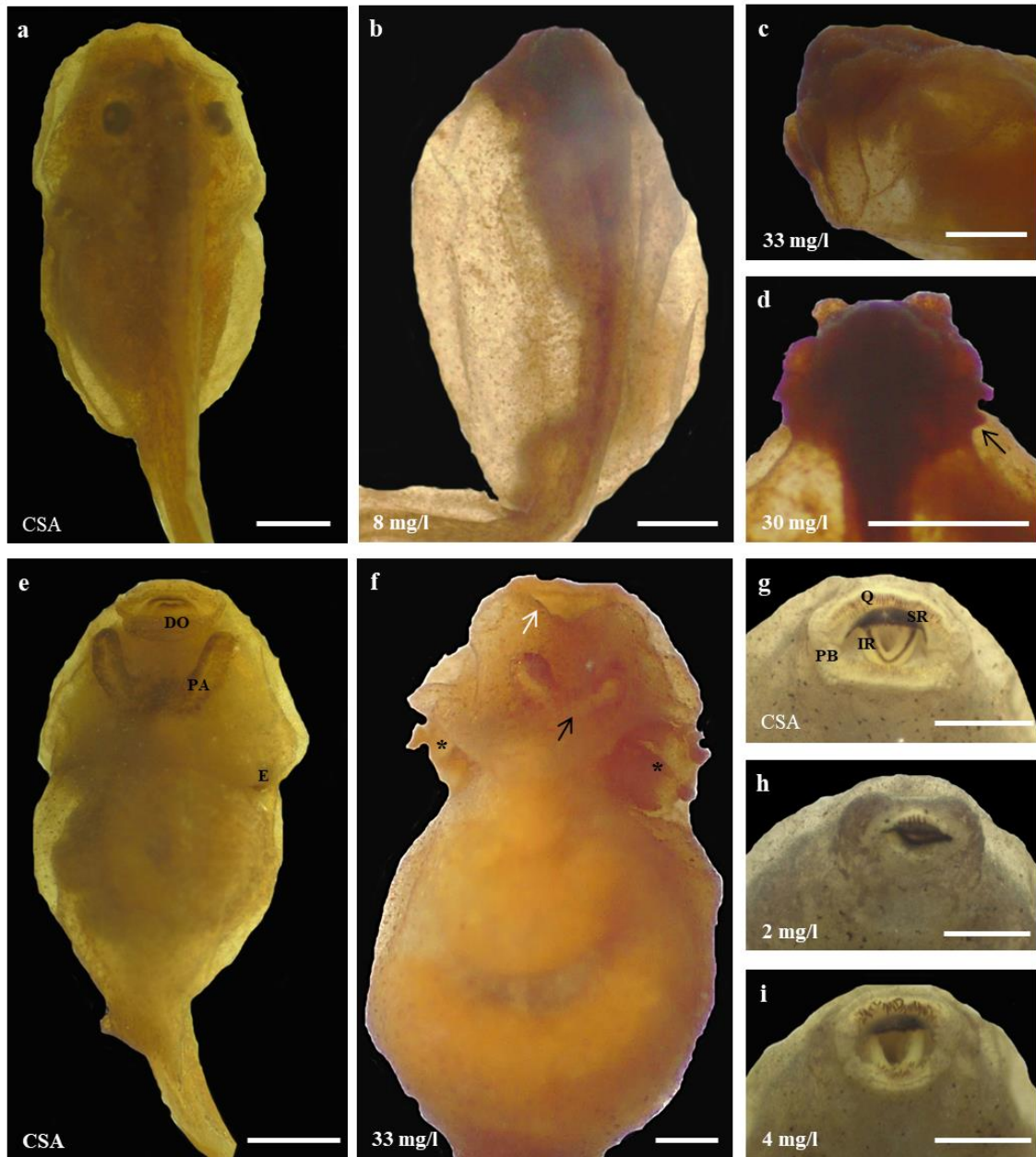


Figura 8: Alteraciones morfológicas de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a malatión (i.a.) desde el E. 3 (2 blastómeros), en comparación con el tratamiento control (CSA). a, b, d) vista dorsal; c) vista lateral izquierda; e, f) vista ventral, g-i) detalle del disco oral. Nótese: en b) la severa hidropesía y microcefalia con agenesia de ojos, en c) hidropesía branquial y microcefalia con agenesia de ojos y estructuras bucales y agenesia de branquias, en d) microcefalia con agenesia de ojos y de branquias externas (flecha), en f) la ausencia rostródontes y queratódontes del disco oral (flecha blanca), malformación de papilas adhesivas (flecha negra), pliegue opercular y branquias externas (*) poco desarrollados, en h) subdesarrollo de surparostrodonte e infrastrodonte, ausencia de papilas bucales y de hileras de queratódontes, en i) subdesarrollo de papilas bucales, desorganización de hileras de queratódontes falta de queratinización del infrastrodonte. Referencias: **E:** espiráculo, **DO:** disco oral, **IR:** infrastrodonte, **PA:** papilas adhesivas, **PB:** papilas bucales, **Q:** queratódontes, **SR:** surparostrodonte. Escala: 0,5 mm.

La figura 9 muestra los porcentajes de las anomalías morfológicas registradas, destacándose que alrededor del 73 % de los individuos expuestos a malatión (i.a.), desde etapas tempranas de desarrollo, presentaron incurvaciones del eje, hidropesía, agenesia de órganos internos y/o de branquias externas. Asimismo, en todos los individuos que presentaron severa hidropesía se registró alteraciones en la morfología y desarrollo de órganos internos como corazón, hígado, intestino, mesonefros y/o branquias internas (Figura 10). La CE 50 fue de 10,2 mg/l malatión (i.a) siendo el IT de: 23,7.

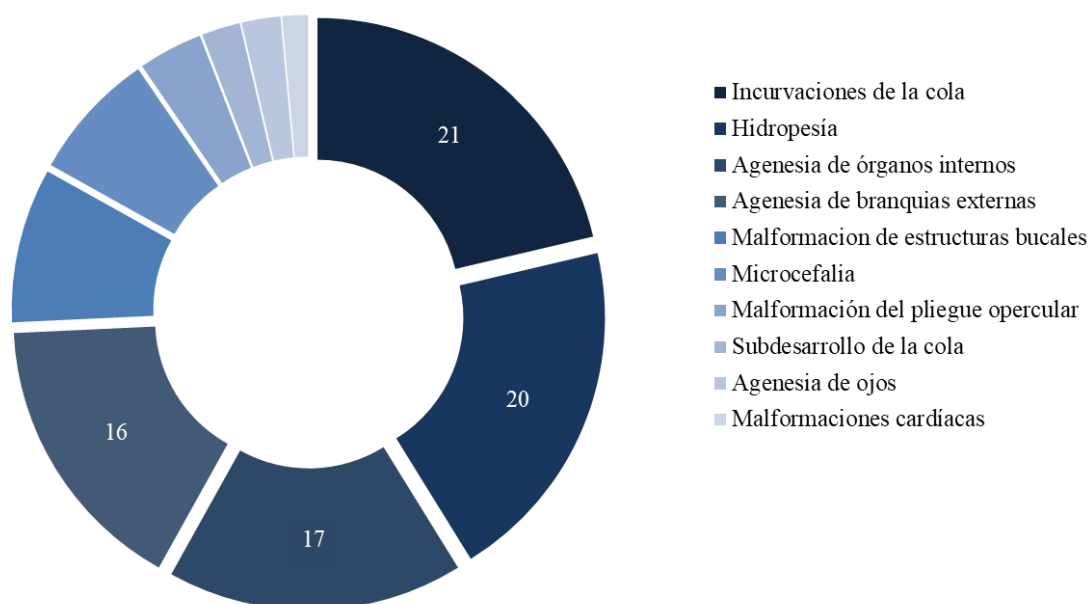


Figura 9. Porcentaje de malformaciones registradas en los individuos de *Rhinella arenarum* tratados con malatión (i.a.) desde etapas tempranas del desarrollo embrionario. N = 223.



Figura 10: Alteraciones morfológicas de los órganos internos de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a malatión (i.a.) desde el E. 3 (2 blastómeros), en comparación con el tratamiento control (CSA). Nótese: en b) el subdesarrollo de las asas intestinales; en c) la falta de crecimiento y de enrollamiento del intestino; en d) agenesia de hígado y persistencia del tubo digestivo lineal y agenesia de mesonefros; en f) subdesarrollo de branquias internas (flechas); en g) persistencia del corazón en etapa de torsión en S. Referencias: **BI**: branquias internas, **H**: hígado, **AI**: asas intestinales, **V**: ventrículo, **CA**: cono arterial, **M**: mesonefros. **P**: páncreas. Escala: 0,5 mm.

4) Test de EXPOSICIÓN POR PULSO. Exposición de larvas en E. 25 (opérculo completo) a malatión (i.a.) por 24 h

Letalidad y alteraciones del comportamiento y de la morfología

La figura 11 muestra la curva de sobrevivencia de las larvas tratadas con malatión (i.a.) durante 24 h y posterior cambio a SA, en el E. 25. Las CLs₁₀, 50 y 90 y sus correspondientes límites de confianza (95 %) calculados para las 96 h de ensayo fueron: 30,3 (26,8-34,2), 42,3 (37,5-47,8) y 59,2 (52,5-66,8) mg/l malatión (i.a.), respectivamente.

Los individuos expuestos a malatión (i.a.) sufrieron un efecto narcótico durante la primera hora de ensayo evidenciándose recuperación a las 2 h de exposición, en porcentaje proporcional a la concentración de ensayo. Con 25 mg/l malatión (i.a.) se recuperó el 93 % de las larvas descendiendo este porcentaje a 45 % y 33 % con concentraciones de 30 y 35 mg/l malatión. El 13 % de las larvas expuestas a 40 mg/l malatión (i.a.) recuperó la movilidad a las 24 h de ensayo. Luego del cambio a SA el porcentaje de las larvas recuperadas se incrementó, alcanzando el 100, 97, 93 y 53 % para concentraciones de 25, 30, 35 y 40 mg/l malatión (i.a.), respectivamente. Esta recuperación se manifestó como natación enérgica de las larvas tratadas al de ser estimuladas de forma táctil. Sin embargo, a partir de las 48 h de ensayo, en dichas concentraciones, la sobrevivencia fue disminuyendo paulatinamente hasta alcanzar el 97, 94, 87 y 43 %, respectivamente, a las 96 h de ensayo, observándose en algunos individuos tratados con 35 y 40 mg/l malatión (i.a.), natación errática y pérdida del equilibrio. Asimismo, al finalizar el ensayo, alrededor del 10 % de los individuos tratados en cada concentración, presentó hidropesía abdominal. En los controles, la sobrevivencia fue del 100 % y el comportamiento fue normal durante todo el ensayo, no observándose alteraciones en la morfología de las larvas.

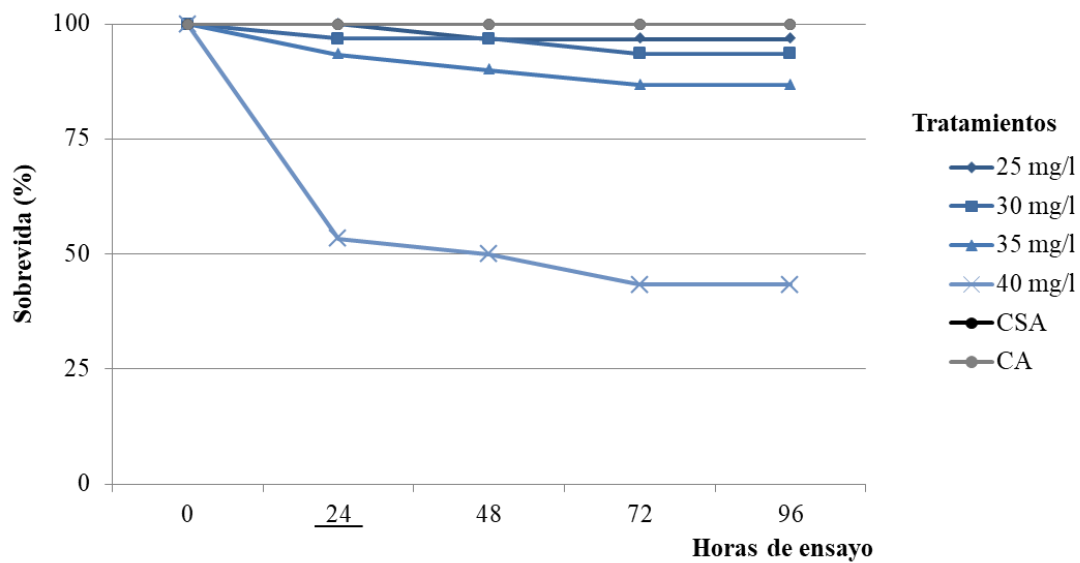


Figura 11. Curvas de sobrevida de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a malatión (i.a.) durante 24 h y posterior cambio a SA, a partir del E. 25 (opérculo completo) y durante 96 h. La hora subrayada indica el momento del cambio a SA. Los tratamientos se expresan en mg/l malatión (i.a.).

COMPARACIÓN DE LA TOXICIDAD DE MALATIÓN (i.a.) Y GLACOXÁN 50M®

1) Test AMPHISHORT. Exposición crónica corta de larvas en E. 25 (opérculo completo) a malatión (i.a.) y Glacoxán 50M®

Letalidad

La exposición a concentraciones de 10; 14,3 y 20,4 mg/l malatión (i.a.) no afectó significativamente la sobrevida, en comparación con los controles, hasta las 96 h de ensayo (Figura 12). En esta última concentración, el efecto letal se manifestó luego de las 96 h de ensayo, mientras que la exposición a 29,5 mg/l malatión (i.a.) provocó una gradual reducción de la sobrevida, a partir de las 24 h. En dichas concentraciones la letalidad fue del 100 % al finalizar el ensayo (Figura 13).

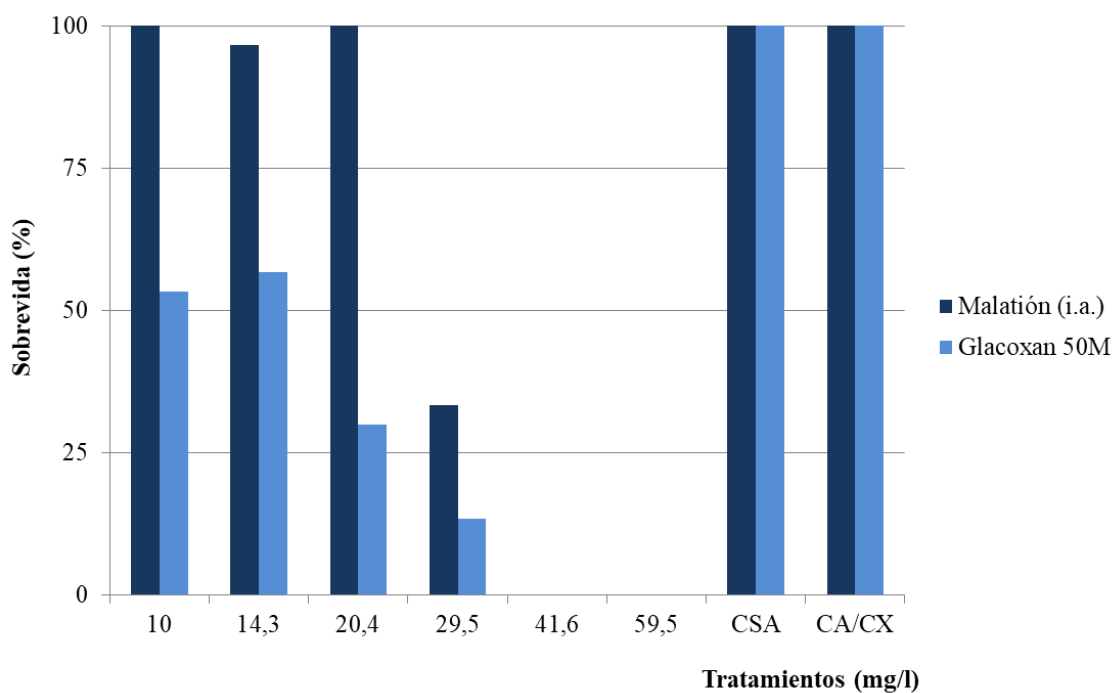


Figura 12: Comparación de la sobrevida, a las 96 h de ensayo, de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en el E. 25 (opérculo completo) a malatión (i.a.) y Glacoxán 50M®, a concentraciones equivalentes de i.a. Los tratamientos se expresan en mg/l malatión (i.a.).

A diferencia de lo registrado para el i.a., la exposición al formulado comercial produjo letalidad, a partir de las 48 h de ensayo en concentraciones de 10; 14,3; 20,4 y 29,5 mg/l malatión (i.a.), siendo la sobrevida del 53, 56, 30 y 13 % respectivamente, a las 96 h de ensayo (Figura 14). Al finalizar el ensayo, la letalidad fue del 100 % en dichas concentraciones. Concentraciones de 41,6 y 59,4 mg/l malatión, tanto para el i.a como para el formulado comercial, produjeron el 100 % de letalidad a las 24 h de ensayo. La sobrevida en CSA, CA y CX fue del 100 % durante todo el ensayo.

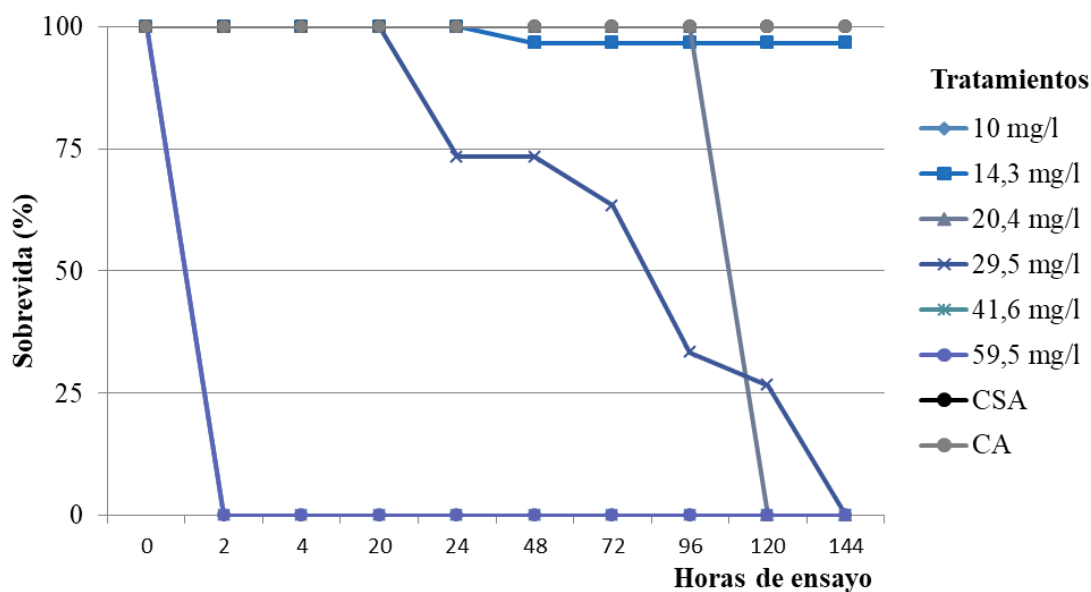


Figura 13: Curvas de sobrevida de larvas de *Rhinella arenarum* en E. 25 (opérculo completo) expuestas a malatión (i.a.) durante 144 h. Los tratamientos se expresan en mg/l malatión (i.a.).

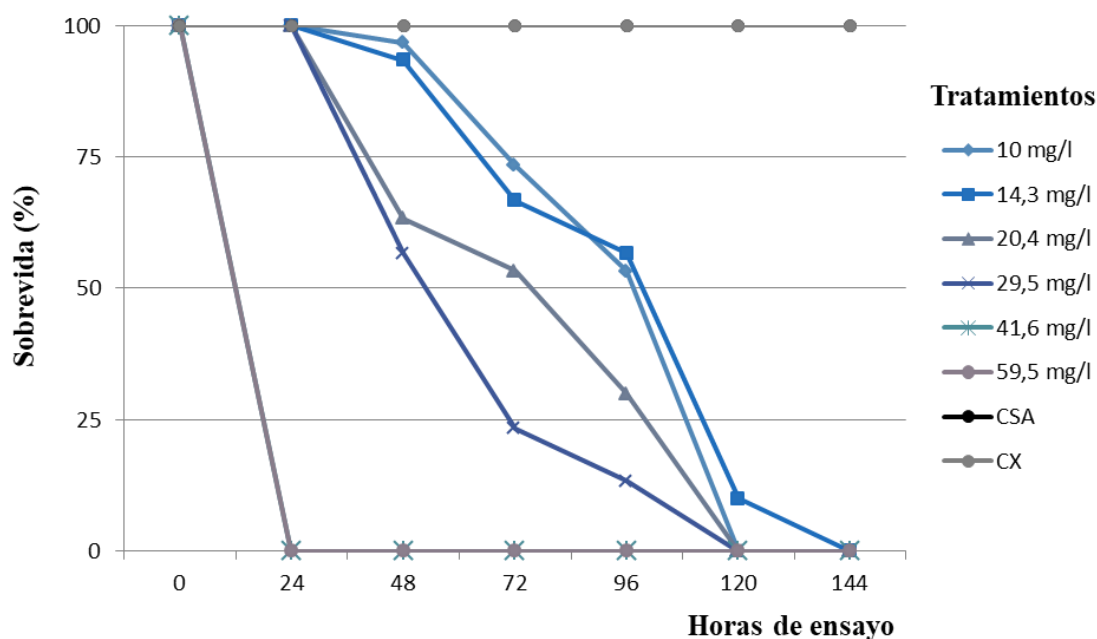


Figura 14: Curvas de sobrevida de larvas de *Rhinella arenarum* en E. 25 (opérculo completo) expuestas a Glacoxán 50M® durante 144 h. Los tratamientos se expresan en mg/l malatión (i.a.).

Las CLs 10, 50 y 90 calculadas para las 96 h fueron de 18 (15,4-21,1), 25,8 (22,1-30,1), y 36,9 (31,6-43,1) mg/l para malatión (i.a.) y de 5,5 (4,1-7,6), 13,1 (9,5-

17,9) y 30,8 (22,5-42,2) mg/l i.a. para Glacoxán 50M®, respectivamente (Figura 15). El NOEC (letalidad) para las 144 h de ensayo fue de 10 mg/l de malatión (i.a). No se pudo calcular este parámetro para el formulado comercial ya que las concentraciones ensayadas superaron el NOEC.

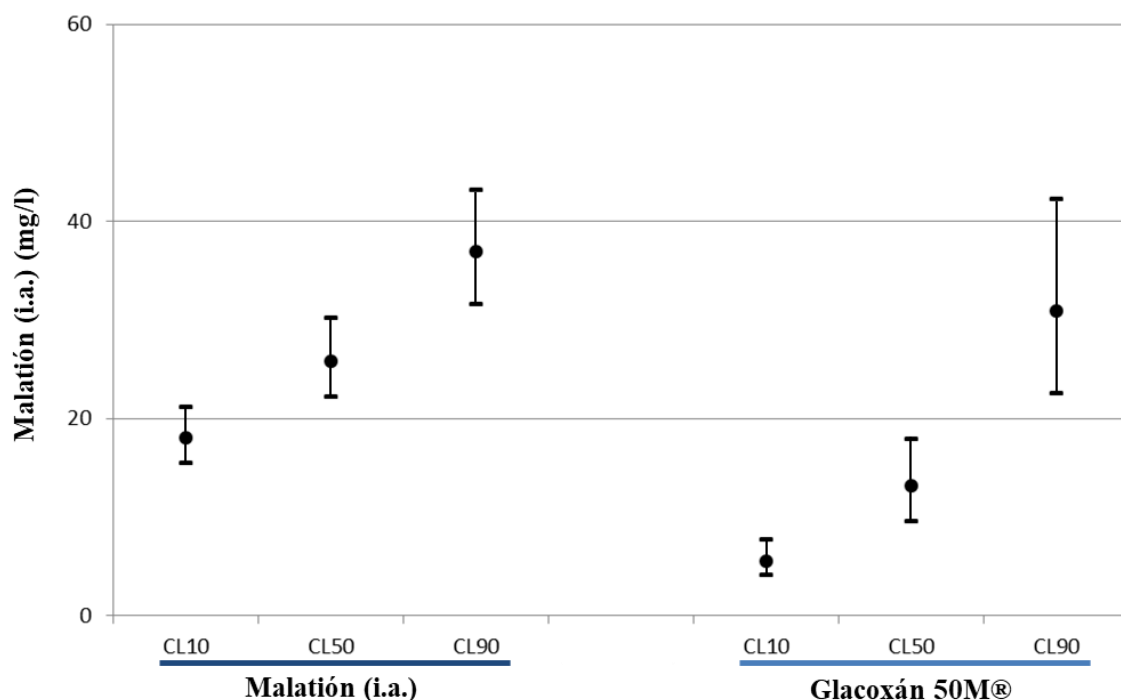


Figura 15: Comparación de las Concentraciones Letales (CLs) 10, 50 y 90 para malatión (i.a.) y Glacoxán 50M®, y sus correspondientes límites de confianza (95 %), calculadas para larvas de *Rhinella arenarum* expuestas de forma crónica corta durante 144 h, a partir del E. 25 (opérculo completo).

Alteraciones del comportamiento y de la morfología

Las larvas tratadas con concentraciones de 29,5 mg/l de malatión (i.a.) manifestaron un efecto narcótico en las primeras horas de ensayo. Luego de la recuperación exhibieron escasa reacción al estímulo durante el resto del ensayo, mostrando desplazamientos breves, contracciones espasmódicas y flexiones laterales de la cola. Para el caso del formulado comercial, dichas alteraciones en el comportamiento se manifestaron en todas concentraciones de ensayo, con la particularidad de que para 41,6 y 59,4 mg/l de malatión (i.a.), el efecto narcótico se registró a los 10 minutos de iniciado el ensayo y no se registró recuperación de los individuos. Asimismo, se

observó hidropesía abdominal en individuos tratados con 29,5 mg/l de malatión tanto para el i.a., como para el formulado comercial.

2) Test de EXPOSICIÓN POR PULSO. Exposición de embriones y larvas en distintos estadios del desarrollo a malatión (i.a.) y Glacoxán 50M® por 24 h

Estadio 10 (labio dorsal del blastoporo)

Letalidad

La letalidad en concentraciones de 10; 14,3; 20,4 y 29,5 mg/l de malatión (i.a.) no se diferenció de la registrada en el CSA y CA, la cual fue de aproximadamente el 7 %. Cabe destacar que este valor se encuentra dentro del límite aceptable para los bioensayos de toxicidad con estadios tempranos de desarrollo. La exposición a concentraciones a 41,6 y 59,5 mg/l de malatión (i.a.) produjo un 20 % de letalidad, al finalizar el ensayo. Para el caso del formulado comercial, la exposición a concentraciones de hasta 29,5 mg/l de malatión (i.a.) produjo aproximadamente un 15 % de letalidad, mientras que en concentraciones superiores la letalidad fue mayor al 90 %. La figura 16, muestra comparativamente la sobrevida en ambas condiciones de ensayo. Las CLs 10, 50 y 90 fueron de 42,9; 177,5 y 734,1 para malatión (i.a.) y de 31,8; 36,4 y 40,9 para Glacoxán 50M®, respectivamente.

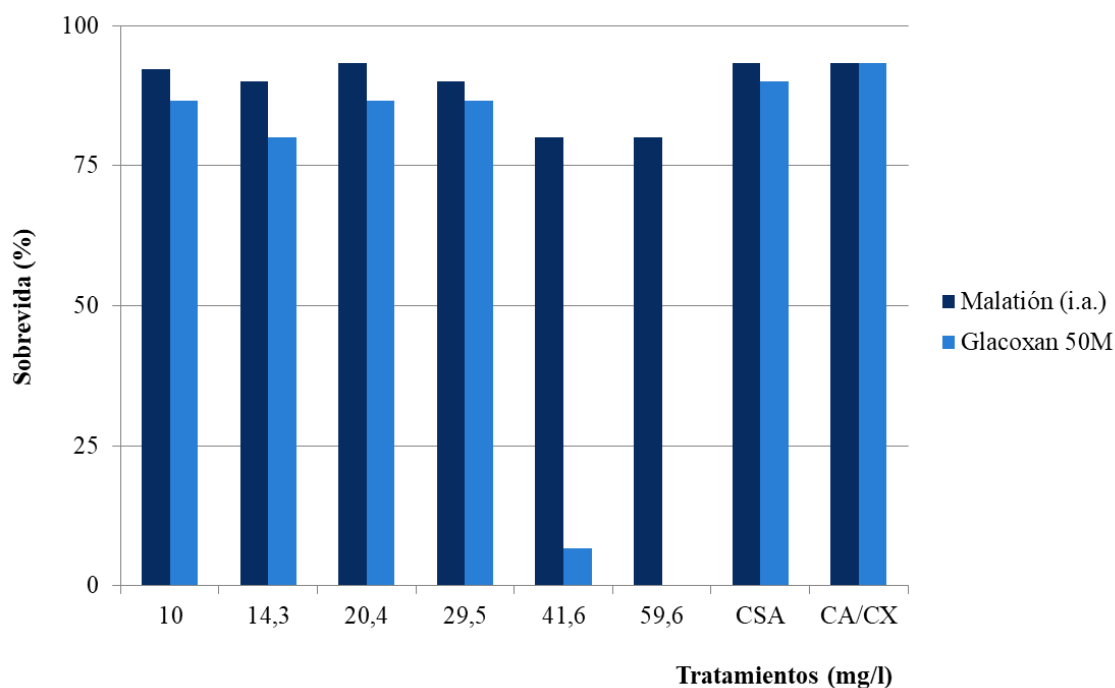


Figura 16: Comparación de la sobrevida, a las 96 h de ensayo, de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a malatión (i.a.) y Glacoxán 50M® durante el E. 10 (labio dorsal del blastoporo), a concentraciones equivalentes de i.a., por 24 h y posterior cambio a SA. Los tratamientos se expresan en mg/l malatión (i.a.).

Alteraciones en el comportamiento, del desarrollo y de la morfología

Al finalizar el ensayo, todos los individuos, tanto tratados con el i.a. como controles, alcanzaron el E. 25 y no se registró alteración en la natación. Sin embargo el 86,6 % de los individuos expuestos a 14,2 mg/l malatión (i.a.) y el 100 % de los expuestos a concentraciones superiores, presentó incurvaciones de la cola.

Estadio 14 (pliegue neural)

Letalidad

La figura 17 muestra la sobrevida de los embriones expuestos a malatión (i.a.) y Glacoxán 50m® durante 24 h, en el E. 14 (pliegue neural). La letalidad registrada en todas las concentraciones de malatión (i.a.) fue semejante a la registrada en el CSA y CA y estuvo comprendida entre el 10 y 20 %. Para el caso del formulado comercial, sin embargo, concentraciones de 29,5, 41,6 y 59,6 mg/l malatión (i.a.) produjeron letalidad en el 20, 30 y 90 % de los individuos, respectivamente.

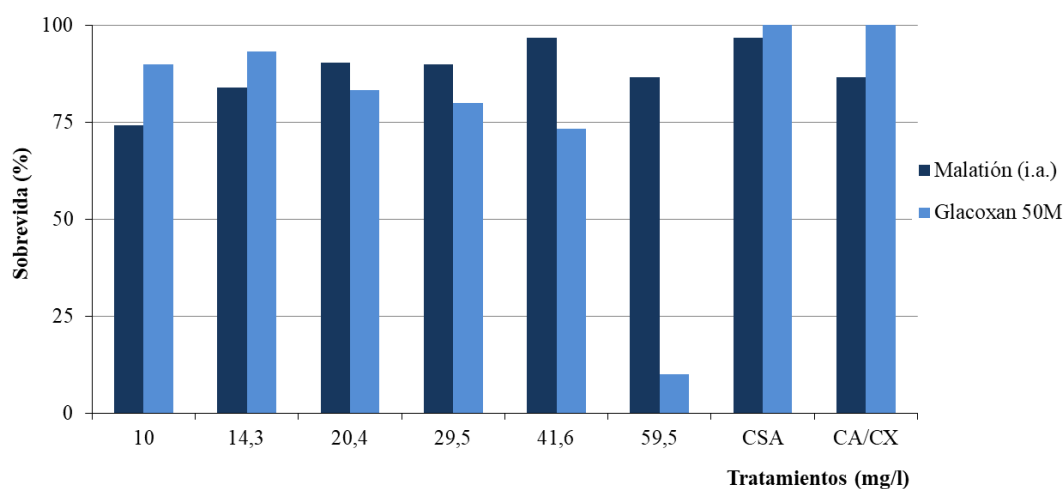


Figura 17: Comparación de la sobrevivida, a las 96 h de ensayo, de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a malatión (i.a.) y Glacoxán 50M®, durante el E. 14 (pliegue neural) a concentraciones equivalentes de i.a., por 24 h y posterior cambio a SA. Los tratamientos se expresan en mg/l malatión (i.a.).

Alteraciones en el comportamiento, del desarrollo y de la morfología

Al finalizar el ensayo, todos los individuos, tanto tratados con el i.a. como con el formulado comercial y los controles, alcanzaron el E. 25. Se registró, en los individuos expuestos a 41,6 y 59,5 mg/l malatión i.a. y del formulado comercial, natación no coordinada y contracciones espasmódicas, como respuesta al estímulo táctil. Los individuos del tratamiento control tuvieron natación normal frente al estímulo.

En cuanto a las alteraciones morfológicas, el 31 y el 100 % de las larvas sobrevivientes expuestas al formulado comercial a concentraciones de 41,6 y 59,6 mg/l malatión (i.a.), respectivamente, presentaron malformaciones cefálicas.

Estadio 18 (respuesta muscular)

Letalidad

La exposición a malatión (i.a.) durante 24 h en el estadio de respuesta muscular no causó letalidad en ninguna de las concentraciones, mientras que el formulado comercial causó el 13,3 % de mortalidad en la concentración de 59,5 mg/l malatión (Figura 18).

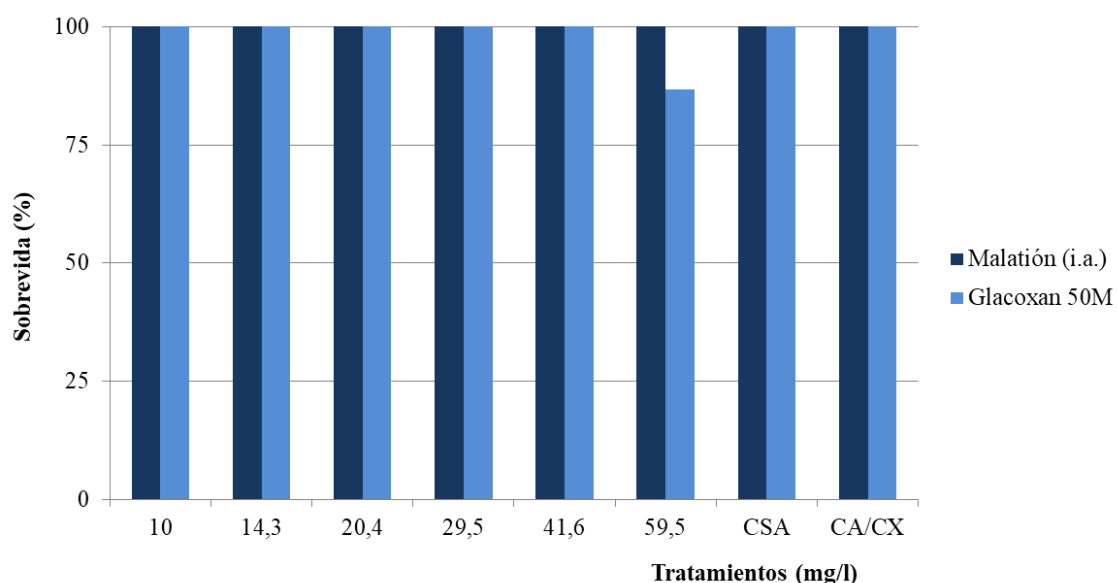


Figura 18: Comparación de la sobrevivida, a las 96 h de ensayo, de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a malatión (i.a.) y Glacoxán 50M®, en el E. 18 (respuesta muscular) a concentraciones equivalentes de i.a., por 24 h y posterior cambio a SA. Los tratamientos se expresan en mg/l de malatión (i.a.).

Alteraciones en el comportamiento, del desarrollo y de la morfología

Entre las 24 y 48 h de ensayo, los individuos expuestos a 10 y 14,2 mg/l de malatión tanto del i.a. como del formulado comercial, mostraron escasa reacción al estímulo, natación descoordinada y contracciones espasmódicas, al ser estimulados. Los expuestos a concentraciones superiores respondieron al estímulo con contracciones laterales de la cola, con desplazamientos breves o sin desplazamiento. Todos los individuos de los tratamientos controles y los tratados con el i.a. solo alcanzaron el E. 25, al finalizar el ensayo y no se registraron alteraciones en la morfología. Para el caso del formulado comercial, el 57 % de los sobrevivientes alcanzaron el E. 23 y el resto no superó el E. 24. Asimismo, alrededor del 80 % de los individuos tratados con el formulado comercial presentaron leve hidropesía abdominal.

Estadio 25 (opérculo completo)

Letalidad

La exposición a malatión (i.a.), produjo un marcado efecto letal a partir de la concentración de 20 mg/l de malatión (i.a.), alcanzando el 100 % al finalizar el ensayo. El formulado comercial tuvo marcado efecto letal en todas las concentraciones siendo del 100 % en la concentración más alta (Figura 19).

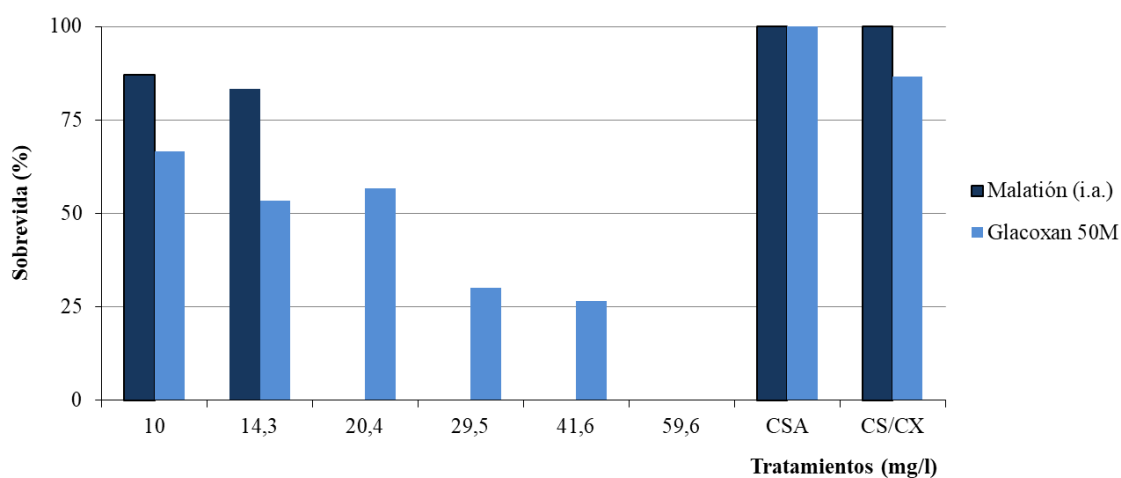


Figura 19: Comparación de la sobrevivida, a las 96 h de ensayo, de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a malatión (i.a.) y Glacoxán 50M®, en el E. 25 (opérculo completo) a concentraciones equivalentes de i.a., por 24 h y posterior cambio a SA. Los tratamientos se expresan en mg/l de malatión (i.a.).

Alteraciones en el comportamiento, del desarrollo y de la morfología

Concentraciones de hasta 14,3 mg/l malatión, tanto para el i.a. como para el formulado comercial, tuvieron un efecto narcótico dentro de las primeras horas de ensayo, seguido de una recuperación luego del cambio a SA, excepto para la concentración de 59,4 mg/l malatión (i.a.) donde no se registró recuperación de ningún individuo. No se observaron alteraciones de la morfología al finalizar el ensayo para ninguno de los dos compuestos.

La figura 20 muestra comparativamente la CL 50 a las 96 h de ensayo calculadas para el E. 10, E. 14 y E. 25, para la exposición de 24 h de malatión (i.a.) y Glacoxán 50M®, y posterior cambio a SA. Como se observa el E. 25 resultó el más susceptible al

efecto letal, tanto para malatión (i.a.) como para el formulado comercial. Asimismo, se desataca que, para todos los estadios analizados, el formulado comercial fue más tóxico que el i.a., siendo para la gastrulación (E. 10-13) seis veces más tóxico y para la neurulación (E. 14-16), cuarenta y tres veces más tóxico.

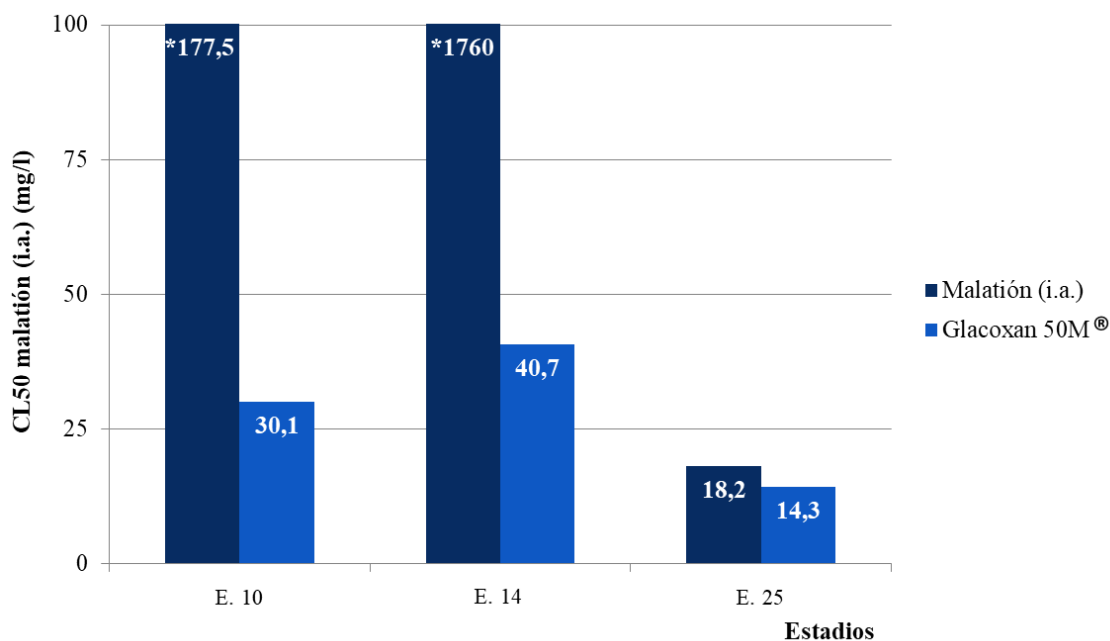


Figura 20. Comparación de la Concentración Letal (CL) 50 a las 96 h de ensayo, calculadas para individuos de *Rhinella arenarum* en diferentes estadios del desarrollo expuestos a malatión (i.a.) y Glacoxán 50M® por pulso de 24 h y posterior cambio a SA. * indica el valor de la CL50 que supera el límite del gráfico.

Considerando el principio activo, la exposición durante 24 h y posterior cambio a SA en estadios embrionarios (E. 10, E. 14 y E. 18) no afectó la sobrevivencia al final del ensayo. Sin embargo, la exposición a concentraciones de 41,6 y 59,5 mg/l del formulado comercial produjo el 98 y 100 % de letalidad, respectivamente, demostrando la alta susceptibilidad de los estadios tempranos del desarrollo al formulado comercial. Es decir, a los adyuvantes presentes en el formulado comercial, o a los efectos sinérgicos entre los adyuvantes y el malatión (i.a.). La comparación de la toxicidad por estadio (exposición por pulso) mostró que, tanto para malatión (i.a.) como para el formulado comercial, el E. 25 (opérculo completo) fue el más susceptible para efecto letal.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Letalidad

Los resultados obtenidos a partir de los diferentes ensayos de toxicidad realizados, permitieron caracterizar la toxicidad del insecticida malatión, en su forma pura (i.a.) y en una formulación comercial, destacándose su efecto letal, su capacidad teratogénica y su capacidad para alterar el comportamiento de natación y afectar el crecimiento de las larvas de *Rhinella arenarum*.

En cuanto al efecto letal, las larvas de *Rhinella arenarum*, al igual las que *Rana ridibunda* (Sayim 2008), resultan menos sensibles que la mayoría de las especies estudiadas (Tabla 2) a la exposición aguda a malatión (i.a.). Anguiano et al. (2001) registraron un aumento en la producción de GST en embriones de *Rhinella arenarum* expuestas a malatión (i.a.), y sugirieron que sería un mecanismo de regulación de la tolerancia al estrés químico lo que explicaría la baja letalidad durante estadios tempranos del desarrollo. Sin embargo, como se registró en este estudio, la exposición crónica aumenta la sensibilidad de las larvas con una importante disminución en la sobrevivencia y de los valores de las CL, conforme aumenta el tiempo de exposición. Asimismo, se registró una susceptibilidad estadio-dependiente a la acción letal del malatión, tanto en su forma pura (i.a.) como en su forma comercial la cual fue hasta cuarenta y tres veces tóxica que el i.a. Los ensayos por pulso de 24 h de exposición mostraron que, en general, los estadios embrionarios son más resistentes al efecto letal el cual se manifiesta más severamente en el E. 25.

Los insecticidas organofosforados ejercen su toxicidad principalmente mediante la inhibición de las enzimas acetilcolinesterasas y butirilcolinesterasas, resultando en una excitación incontrolada de neuronas que conduce a la muerte del individuo, por pérdida del control respiratorio (Sparling y Fellers 2007). Sin embargo, la tasa de inhibición de estas enzimas es dependiente de la concentración del tóxico y de la tasa de asimilación del mismo, la tasa de conversión a la forma oxon, la afinidad de la molécula con la acetilcolinesterasa y la tasa de regeneración de la acetilcolinesterasa (Sparling y Fellers 2007). Por otra parte, es común que los pesticidas organofosforados varíen en su potencia para reducir la acetilcolinesterasa en diferentes estadios del desarrollo de una especie determinada (Richardson et al. 2001, Kousba et al. 2004, Acquaroni et al. 2022)

e incluso entre especies. Esto explica la variabilidad en los valores calculados de CL 50 para distintas especies de anuros.

La acetilcolinesterasa se encuentra en muy bajas concentraciones en ovocitos de *Xenopus laevis* y su actividad se inicia alrededor del estadio de respuesta muscular cuando el embrión comienza a moverse espontáneamente (Gindi y Knowland 1979). Además, la actividad enzimática se duplica cuando los embriones eclosionan de la membrana vitelina (E.17-E.18) y continúa aumentando progresivamente durante el desarrollo larval (Gindi y Knowland 1979). La actividad de la acetilcolinesterasa, por lo tanto, se correlaciona con el desarrollo del sistema nervioso y muscular (Gindi y Knowland 1979). Rosenbaum et al. (1988) plantearon que conocer el patrón temporal de inhibición de esterasas por exposición a malatión es necesario para identificar el período de mayor riesgo, en particular, cuando las enzimas inhibidas están involucradas en la capacidad del organismo para degradar el tóxico. Estos autores detectaron una baja actividad de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en embriones tempranos de *Rhinella arenarum* en comparación con estadios más avanzados (5 días de desarrollo). Asimismo, observaron que, a pesar de la importante disminución en la actividad de estas enzimas durante los primeros cinco días del desarrollo, los embriones completan su desarrollo sin alteración de sus funciones vitales. Estas observaciones podrían explicar la baja letalidad registrada en este estudio cuando la exposición se produce durante el periodo embrionario del desarrollo y el aumento del efecto letal cuando la exposición a malatión ocurre durante el periodo larval del desarrollo.

Los plaguicidas organofosforados ejercen un efecto específico y la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) en el tejido nervioso y otros órganos “diana” es considerada como responsable crítica de la toxicidad aguda (De Silva et al. 2006). La mayoría de estos plaguicidas pertenecen a la clase de fosforotiónatos, que en sí mismos son inhibidores pobres de la AChE y necesitan ser activados metabólicamente por el sistema citocromo P450 para producir sus correspondientes análogos de oxon, antes de la inhibición de AChE. En general, la intensidad del efecto tóxico depende del grado de interacción con su molécula “diana”, la cual puede ser reversible o irreversible, dependiendo de la reactivación de la enzima (Ibarra & Linares 2012).

Kralj et al. (2007 a y b) comprobaron que, en determinadas condiciones fotolíticas y fotocatalíticas, los productos de degradación del malatión (malaoxón e isomalatión) y las formulaciones comerciales tienen mayor estabilidad que el malatión

puro. Según estos autores, la mayoría de las formulaciones comerciales que contienen organofosforados se oxidan fácilmente a oxones, por oxidantes presentes en el ambiente, los que resultan inhibidores más potentes de la AChE. Asimismo, estos autores destacan la importancia de considerar en las evaluaciones ecotoxicológicas, los aditivos presentes en las formulaciones que inhiben y/o promueven la degradación de los ingredientes activos de los pesticidas. Las impurezas en las formulaciones comerciales son potentes inhibidores de la carboxilesterasa y aumentan de la formación de malaoxón (Buratti et al. 2005). En este estudio, en todos los casos analizados, el formulado comercial resultó entre 1,2 y 43 veces más tóxico que el i.a., dependiendo del estadio del desarrollo. Esto podría estar asociado a la presencia de aditivos presentes en el formulado comercial que potencian la toxicidad del malatión en su estado puro.

Se ha establecido que la mayoría de los pesticidas orgánicos lipofílicos inducen narcosis en anfibios anuros y en consecuencia reducen el metabolismo y alteran los comportamientos necesarios para la sobrevivencia (Mann et al. 2009). La narcosis se define como una alteración no específica reversible del funcionamiento de la membrana celular, causada por acumulación de contaminantes lipofílicos en sus fases hidrofóbicas (Lipnick 2013). Esto provoca la disminución de la actividad e incapacidad para reaccionar a los estímulos, que puede conducir a la muerte del individuo (Wezel & Opperhuizen 1995). Los efectos narcóticos pueden manifestarse a los pocos minutos de exposición a un compuesto, y su intensidad depende de la cantidad de compuesto narcótico incorporado (Lipnick 2013). Könemann (1981) identificó un patrón general de respuestas en el mecanismo de narcosis en peces. Este patrón incluye una fase de excitación inicial, seguido por una fase de pérdida del equilibrio y natación en círculo y finalmente una fase de inmovilidad con disminución de la frecuencia cardio-respiratoria que culmina en la muerte del individuo. Sin embargo, registró también recuperación de la actividad motora cuando los individuos se transfirieron a un medio libre de tóxico, demostrando el carácter reversible del proceso narcótico. Este patrón también fue observado en anfibios anuros (Hutler Wolkowicz et al. 2014, 2016, Pérez-Coll et al. 2018, Rimoldi et al. 2023).

Numerosos estudios toxicológicos con anfibios reportan narcosis por exposición a diferentes clases de pesticidas. Mann y Bidwell (2001) reportaron un efecto narcótico no específico en larvas de *Crinia insignifera*, *Heleioporus eyrei*, *Limnodynastes dorsalis* y *Litoria moorei* por exposición a nonilfenol etoxilado y alcohol etoxilado, dos

surfactantes no iónicos utilizados en formulaciones comerciales, mientras que Aronzon et al. (2014) observaron narcosis en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a nonilfenol. Asimismo, el efecto narcótico ha sido reportado para larvas de *Boana pulchella* (Agostini et al. 2010) y *Rhinella arenarum* (Svartz et al. 2014, Aronzon y Svartz 2017) por exposición a endosulfán, para larvas de *Xenopus laevis* (Yu et al. 2013) y larvas de *Rhinella arenarum* (Svartz et al. 2016) expuestas a cipermetrina, para larvas *Rana dalmatina* expuestas a clorpirifos (Bernabò et al. 2011), para larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a un insecticida comercial formulado a partir de pirimicarb (Vera Candiotti et al. 2010), para larvas de *Discoglossus scovazzi* expuestas a un herbicida comercial formulado a partir de cicloxidim (Wagner et al. 2015), y para larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a una mezcla de nonylphenol y diazinón (Aronzon et al. 2016). En este trabajo se informa la narcosis como un efecto subletal agudo de la exposición a malatión, i.a. y formulado comercial, que resultó reversible en función de la concentración y el tiempo de exposición. Se evidenció, además, que el cese de la exposición a concentraciones subletales permite la recuperación de la actividad motora de las larvas y el restablecimiento de su desplazamiento normal. Sin embargo, este efecto a pesar de ser un efecto subletal, y en muchos casos reversible, supone un grave riesgo para las poblaciones de larvas de anfibios ya que disminuye su capacidad para obtener y procesar el alimento o escapar de depredadores volviéndolos más vulnerables en el ambiente natural.

Alteraciones del comportamiento y de la morfología

Anguiano et al. (2001), Bonfanti et al. (2004), Sayim (2008) y Yu et al. (2013) coinciden en que la exposición a malatión provoca hiperactividad y alteraciones en el equilibrio y la habilidad de las larvas para nadar, lo que también ha sido corroborado en este estudio. Generalmente se considera que puede haber una cierta tolerancia a la inhibición de la AChE sin que exista una alteración sustancial de la transmisión colinérgica. Sin embargo, cuando la inhibición supera el 50 % aparecen signos de toxicidad como movimientos involuntarios del tipo de temblores, convulsiones y contracciones musculares, y depresión respiratoria que conducen a la muerte (Nostrandt et al. 1997, Pope 1999).

Las alteraciones en la natación registradas pueden tener dos causas: una directa sería el efecto neurotóxico del malatión sobre la placa neuromuscular, que altera el mecanismo de contracción muscular, y una indirecta por las alteraciones morfológicas,

como las incurvaciones del eje, que no permitirían que las larvas puedan dirigir adecuadamente los movimientos natatorios y/o un cuerpo hidrópico que dificultaría los desplazamientos. Esto, en conjunto, supone una importante reducción de la aptitud natatoria de las larvas, comprometiendo habilidades en la búsqueda de alimento o escape de depredadores.

Con respecto a las alteraciones morfológicas, Bonfanti et al. (2004) describieron flexiones de la cola asociadas a un enrollamiento anormal del intestino, orientación anómala de miocitos de la cola y menor tamaño de miótomos en larvas de *Xenopus laevis* expuestas a concentraciones subletales de malatión (i.a.). Para esta misma especie, Yu et al. (2013) observaron malformaciones axiales y de la cola, edemas y anomalías intestinales por exposición a malatión (i.a.) y calcularon un IT de 6,35 y Chemotti et al. (2006) reportaron flexiones del eje y reducción de la talla. Sayim (2008) informaron retraso en el crecimiento, menor talla y anormalidades cefálicas, del tronco y de la cola, edemas generalizados y enrollamiento anormal del intestino en larvas de *Rana ridibunda* expuestas a malatión i.a. y a un formulado comercial. Budischak et al. (2008), reportaron que la exposición de embriones de *Rana palustris* a malatión (i.a.) causa retraso en la eclosión, malformaciones como flexiones de la cola, edemas, y anomalías cráneo-faciales y reducción de la viabilidad. En el caso de *Rhinella arenarum*, Anguiano et al. (2001), observaron curvaturas del eje antero-posterior, pliegues de la cola, hidropesía y edemas por exposición a malatión (i.a.). Por otra parte, Lascano et al. (2011), demostraron que los insecticidas organofosforados aumentan la degradación oxidativa de las poliaminas, aminoras implicadas en los procesos de crecimiento, proliferación y apoptosis celular durante el desarrollo (Ruiz-Cano et al. 2012). La alteración metabólica de estas aminoras podría explicar las malformaciones observadas en larvas de *Rhinella arenarum* como consecuencia de la exposición a dichos compuestos (Lascano et al. 2011).

En este trabajo se determinó que la severidad de alteraciones morfológicas registradas dependió del estadio del desarrollo, del tiempo de la exposición y de la concentración de exposición al i.a. o al formulado comercial. Las alteraciones morfológicas más frecuentes fueron incurvaciones de la cola e hidropesía branquial y/o abdominal, la cual, en la mayoría de los casos, estuvo asociada con la malformación o alteración del desarrollo de los órganos internos como intestino, corazón y branquias internas. Asimismo, se registraron malformaciones cefálicas y de estructuras del disco

oral de las larvas, coincidiendo con los estudios previos mencionados. Las malformaciones de los órganos se observaron principalmente en larvas expuestas a malatión desde etapas tempranas del desarrollo, confirmando lo expuesto por Bonfanti et al. (2004) y Yu et al. (2013), que este compuesto es un potente teratógeno.

Anguiano et al. (2001) plantearon que el aumento de GST, y su conjugación con pesticidas, disminuye su concentración intercelular lo que podría disminuir la capacidad de resistencia de las células al estrés oxidativo volviéndolas más susceptibles a sufrir daño en el ADN, alteraciones del ciclo celular y detenimiento del desarrollo. Acquaroni et al. (2021) demostraron una asociación entre distintos efectos subletales causados por dimetoato, un insecticida organofosforado, con alteraciones en el sistema de defensa antioxidante de larvas de *Rhinella arenarum*. El daño oxidativo ha sido considerado como un importante mecanismo de la toxicidad reproductiva y del desarrollo, inducida por pesticidas (Pašková et al. 2011) y podría explicar las malformaciones y alteraciones del desarrollo de embriones y larvas de *Rhinella arenarum* causadas por la exposición a malatión. Sin embargo, a pesar de que la capacidad teratógena de inhibidores de ACHE ha sido ampliamente demostrada, los mecanismos moleculares de su embriotoxicidad y el modo de acción aún no han sido aún dilucidados (Tsiaoussis et al. 2018).

La hidropesía es una acumulación de humor seroso en los espacios intercelulares y constituye una manifestación de alguna anomalía o proceso patológico. La inhibición de la AChE ha sido asociada con una disfunción autonómica de glándulas y del sistema excretor (Nostrandt et al. 1997) y la ocurrencia de necrosis tubular causante de insuficiencia renal aguda (Betrosian et al. 1995). La disfunción renal es una de las causas de la acumulación de líquido en las cavidades corporales que se manifiesta como edemas o hidropesía. Esta anomalía, como ya se ha mencionado, ha sido observada en varias especies de anuros expuestos a malatión y podría estar asociada a algún proceso disruptivo de la función renal y desequilibrio electrolítico, provocada por el tóxico. La hidropesía ha sido la alteración morfológica más frecuente registrada en este trabajo y, en la mayoría de los casos, estuvo asociada con la malformación o subdesarrollo de órganos del sistema digestivo y branquias internas. La hidropesía, cuando se manifiesta durante el desarrollo embrionario y fetal en humanos, genera severas complicaciones que pueden conducir a la muerte del individuo, antes o después del nacimiento (Gallego et al. 2009). En relación a esto, se han descrito malformaciones gastrointestinales,

cardiovasculares y respiratorias asociadas a la hidropesía fetal (Cervantes et al. 2000, Gutiérrez et al. 2008). La hidropesía, como consecuencia de la exposición a pesticidas ha sido reportada para distintas especies de anuros (Pérez-Coll y Herkovits 2004, Lenkowski et al. 2010, Mussi y Calcaterra 2010, Aronzon et al. 2011, Pašková et al. 2011, Svartz et al. 2012, Yu et al. 2013, Babalola et al. 2019, Herek et al. 2020, Turhan et al. 2022, Ramadani et al. 2022). A este respecto, es necesario profundizar el estudio de las malformaciones de los órganos internos provocadas por el malatión en los anuros y su posible relación con la hidropesía.

SECCIÓN II - HERBICIDAS

En los últimos años, la aplicación de herbicidas en los sistemas agrícolas se ha incrementado considerablemente como consecuencia principalmente de las prácticas de monocultivo (Gupta 2018). Los herbicidas modernos presentan mecanismos de acción fitoespecíficos y pueden dividirse en cinco grupos: 1. Inhibidores de la fotosíntesis, 2. Desviadores de la energía fotosintética, 3. Inhibidores del desarrollo de los cloroplastos y carotenoides, 4. Desacoplantes de la respiración, y 5. Reguladores del crecimiento (Fedtke y Duke 2005). Pequeñas concentraciones de subproductos de su fabricación o contaminantes en las formulaciones de los herbicidas han sido asociados con efectos tóxicos, teratogénicos y cancerígenos, en diversos grupos animales, incluido el ser humano (Gupta 2018).

TOXICIDAD DEL ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO y ESTERÓN ULTRA®

INTRODUCCIÓN

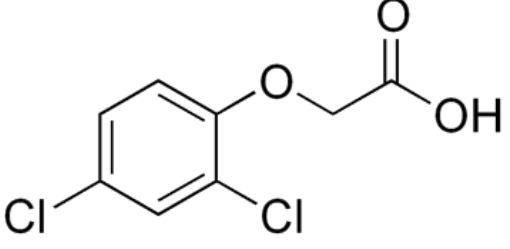
El ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (Tabla 1) también conocido como hedonal o trinoxol es un eficaz herbicida de amplio espectro utilizado para el control de malezas agrícolas, el manejo de bosques y el control de vegetación acuática. Se lo emplea en una gran variedad de compuestos comerciales y se caracteriza por su acción sistémica y uso postemergente. Este herbicida, análogo a las auxinas vegetales, induce la síntesis de proteínas y producción de etileno causando una división incontrolada de las células. En elevadas concentraciones interfiere con la actividad enzimática, la producción de energía y la división celular provocando inhibición de crecimiento, daño tisular y muerte de la planta (de Castro Marcato et al. 2017).

La formulación básica del 2,4-D es un ácido, pero también es producido como una sal inorgánica, amina o éster y se utiliza en muchos productos comerciales. El 2,4-D es un herbicida de baja persistencia, con un tiempo de vida media de aproximadamente 7 días (Candela et al. 2003). Sin embargo es poco biodegradable en ambientes acuáticos y es detectado con frecuencia como un anión libre. La descomposición de esta forma

aniónica se produce principalmente por degradación microbiana, dependiendo de la temperatura y la disponibilidad de oxígeno y nutrientes presentes en los cuerpos de agua (de Castro Marcato et al. 2017). En ambientes acuáticos, su vida media es de 15 días en condiciones aeróbicas y de 41 a 333 días en condiciones anaeróbicas (Gervais et al. 2008). Existen básicamente tres tipos de formulaciones, sales de amina, ésteres y 2,4-D colina de más reciente introducción en el mercado. La formulación a base de sal amina hace que el ingrediente activo ácido 2,4-D sea soluble en agua e incluyen isopropilamina, triisopropanolamina, dietanolamina y dimetilamina. Los ésteres hechos con alcoholes incluyen: butil éster de butilo (BEE), 2-etilhexil éster (2-EHE), propilenglicol butil éter éster, metil éster, isopropil éster y butil éster. Las dos primeras formas se caracterizan por su baja solubilidad en agua y baja volatilidad y son las más utilizadas en las formulaciones comerciales. Una vez aplicadas, las formulaciones de éster penetran rápidamente en la superficie de la hoja (cutícula) y se convierten en ácido. Las formulaciones de éster no se disocian o ionizan en agua como las formulaciones de amina, y por lo tanto, no reaccionan con cationes para formar precipitados insolubles. Las formulaciones con sal de colina tienen mayor estabilidad y menor volatilización que las otras formulaciones (Peterson et al. 2016).

El 2,4-D fue introducido en 1940 y se convirtió en uno de los herbicidas más utilizados en el mundo (USEPA 2005). Debido a esto existe un alto riesgo de exposición particularmente para la anfibiafauna asociada a los agroecosistemas. Este herbicida, si bien es una sustancia tóxica diseñada para vegetales, también tiene efectos adversos sobre una amplia variedad de organismos animales (de Castro Marcato et al. 2017). Entre los principales efectos tóxicos se incluyen mortalidad, anormalidades de células sanguíneas, anomalías del desarrollo y alteraciones del comportamiento (Disner et al. 2021). Su absorción ocurre rápidamente a través del tracto gastrointestinal y la piel, y se distribuye rápidamente al hígado, riñones pulmones y cerebro unido a proteínas. Es excretado por orina predominantemente como el compuesto original, ya que no se metaboliza a intermediarios reactivos (Gupta 2018).

Tabla 1. Características físico-químicas del 2,4-D. Fuente: de Castro Marcato et al. (2017).

Nombre químico (IUPAC)	Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)acético
Fórmula molecular	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃
Estructura química	
Número CAS	94-75-7
Peso molecular	221.04
Propiedades	cristales incoloros o polvo blanco
Punto de fusión	140°C
Solubilidad en agua	900 mg/l a 25 °C
Kow	0.027 (pH ácido) y 18,23 (pH alcalino)
Presión de vapor	0,02 mPa a 25 °C
Miscibilidad	Miscible en la mayoría de disolventes orgánicos
Persistencia	poco persistente
Bioconcentración	baja
Toxicidad	Clase III (ligera a moderadamente tóxico para organismos acuáticos)

Entre los efectos adversos provocados por el 2,4-D en mamíferos, incluido el hombre, se pueden citar: disminución de producción de ATP, inhibición de enzimas que participan en el metabolismo de lípidos y síntesis proteica, inhibición de enzimas detoxificantes del hígado, inhibición la síntesis de ADN y disrupción del sistema nervioso (Bukowska 2006). A este respecto, el 2,4-D es atípico entre los herbicidas ya que tiene efectos adversos sobre el sistema nervioso siendo uno de los síntomas neurotóxicos más destacados la miotonía que resulta en la imposibilidad del músculo para relajarse luego de la contracción. Oliveira y Palermo-Neto (1993) demostraron alteración del comportamiento en ratas tratadas con 2,4-D y la asociaron con cambios en los niveles de serotonina y sus productos de degradación en el cerebro. Rosso et al. (1997) informaron que la exposición de ratas, durante las tres primeras semanas luego del nacimiento, provoca reducción en la talla del cerebro y alteraciones en las membranas de las células nerviosas. Asimismo, se ha reportado inhibición de la extensión de las neuritas, desorganización del citoesqueleto y del aparato de Golgi en cultivo de células cerebelares luego de 24 horas de exposición a 2,4-D (Rosso et al.

2000) e incremento del número de células nerviosas con número inusual de cromosomas en conejos luego de la administración oral de dicho compuesto (Atanassov 1992). El efecto citotóxico del 2,4-D fue verificado en estudios con fibroblastos humanos donde se observó que este compuesto provoca inhibición del crecimiento celular con inhibición de síntesis de ADN (Jacobi y Witte 1991).

La toxicidad de formulaciones comerciales de 2,4-D ha sido estudiada en peces como *Cnesterodon decemmaculatus* (De Arcaute et al. 2016, 2018, Carvalho et al., 2020) y *Astyanax lacustris* (Zafra-Lemos et al. 2021). Estos autores destacaron el efecto genotóxico y citotóxico del herbicida. Asimismo, Li et al. (2017) y Gaaied et al. (2020) describieron los efectos embriotóxicos del 2,4-D en *Danio rerio*. Para el caso de los anfibios anuros se ha demostrado que el 2,4-D actúa como inhibidor del crecimiento (Losthe y Roth 1946) e inhibidor de hormonas tiroideas impidiendo la metamorfosis en larvas de *Rana temporaria* (Buslovich y Borushko 1976). Además, Morgan (1996) analizó el efecto tóxico y teratogénico del herbicida en embriones de *Xenopus laevis* y Stebbins-Boaz et al. (2004) concluyeron que el 2,4-D altera la organización del citoesqueleto y bloquea la maduración de los ovocitos en dicha especie. En *Lithobates catesbeianus* se registró aumento del número de micronúcleos y alteraciones morfológicas de eritrocitos en larvas expuestas a 2,4-D (i.a.) (Mesak et al. 2018). Curi et al. (2019) observaron, en *Physalaemus albonotatus*, alteraciones morfológicas y un marcado aumento de melanomacrófagos en hígado, por exposición a un formulado comercial de 2,4-D. Viriato et al. (2021) observaron alteraciones morfológicas en branquias, riñón y tegumento en larvas de *Lithobates catesbeianus* expuestas a una formulación comercial de 2,4-D. En lo que respecta a estudios realizados específicamente en *Rhinella arenarum*, Aronzon et al. (2011) reportaron los efectos tóxicos de este herbicida durante el periodo embrionario y larval temprano destacando diferencias en la susceptibilidad estadio-dependiente, y Lajmanovich et al. (2015) hallaron que la exposición a una formulación de 2,4-D induce neurotoxicidad, estrés oxidativo y depresión inmunológica. En referencia al efecto letal, la tabla 2 muestra las CLs 50 calculadas para varias especies de anuros expuestas a 2,4-D en su forma activa y formulaciones comerciales.

Tabla 2: Valores de CL50 de 2,4-D (ingrediente activo y formulados comerciales) para embriones y larvas de distintas especies de anuros. Datos obtenidos de: ECOTOX (Ecotoxicology Knowledgebase). <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>

ESPECIE	TIPO DE COMPUESTO	ESTADIO	CL 50 (mg/l)	REFERENCIA
<i>Duttaphrynus melanostictus</i>	Formulado comercial	Larvas	8,05	Vardia et al. (1984)
<i>Leptodactylus fuscus</i>	Formulado comercial	Larvas	28,8	Freitas et al. (2019)
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Formulado comercial	Embriones	792	Viriato et al. (2021)
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Formulado comercial	Larvas	700	Viriato et al. (2021)
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Formulado comercial	Larvas	574,5	Freitas et al. (2019)
<i>Physalaemus albonotatus</i>	Formulado comercial	Larvas	754,2	Curi et al. (2019)
<i>Physalaemus nattereri</i>	Formulado comercial	Larvas	143	Freitas et al. (2019)
<i>Rhinella arenarum</i>	Ingrediente activo	Embriones	13,4	Aronzon et al. (2009)
<i>Rhinella arenarum</i>	Formulado comercial	Embriones	2.6	Aronzon et al. (2009)
<i>Xenopus laevis</i>	Ingrediente activo	Embriones	254	Morgan et al. (1996)

En este contexto, este estudio tuvo como objetivo caracterizar la toxicidad del 2,4-D durante el desarrollo embrionario y larval de *Rhinella arenarum*, comparando el ingrediente activo y un formulado comercial.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Analizar comparativamente la toxicidad del herbicida 2,4-D (i.a.) y un formulado comercial (Esterón Ultra®) durante el desarrollo embrionario y larval temprano de *Rhinella arenarum*.
- 2) Evaluar la susceptibilidad estadio-dependiente para cada compuesto e identificar los estadios embrionarios y/o larvales más sensibles.
- 3) Evaluar los efectos letales y subletales como alteraciones del comportamiento, alteraciones morfológicas (teratogénesis), retraso en el desarrollo y alteraciones del crecimiento por exposición de dichos compuestos.

METODOLOGÍA

Metodología empleada para los estudios comparativos de la toxicidad entre 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra®

Se preparó una solución madre de butil ester of 2,4-D (pureza: 99 %; Lote VW169891, Merk) en acetona con una concentración de 2 g/l 2,4-D (i.a.) y una solución de la formulación comercial en agua desionizada con una concentración de 4 mg/l (i.a.). El formulado comercial utilizado fue Esterón Ultra® compuesto por butil ester of 2,4-D 100 g/100 cc (579.7 g equivalente ácido de 2,4-D/100 cc), una mezcla tensioactiva (8 g/100 cc), y querosén como solvente (cantidad suficiente para 100 cc). Ambos compuestos fueron suministrados por Dow AgroSciences Argentina. A partir de estas soluciones se prepararon las distintas concentraciones de ensayo.

Las concentraciones de ensayo estuvieron comprendidas dentro del rango de 1 a 36 mg/l 2,4-D (i.a.) y de 0,1 a 10 mg/l (equivalente i.a.) para Esterón Ultra®, más un CSA y CA a la máxima concentración presente en la concentración más alta del tóxico.

Se realizaron los siguientes bioensayos:

- 1) Test AMPHISHORT. Ensayo crónico corto semiestático de 144 h de exposición a 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra® a partir del E. 25 (opérculo completo), con renovación del medio cada 48 h. Concentraciones de ensayo: 5; 7,5; 9; 11; 13 y 15 mg/l 2,4-D (i.a.) y 2; 2,5; 3; 5; 7,5 y 10 mg/l Esterón Ultra®, más CSA y CA.
- 2) Test AMPHIEMB. Ensayo semiestático de 168 h de duración con embriones a partir del E. 3 (2 blastómeros), con renovación del medio cada 48 h. Concentraciones de ensayo: 1; 1,6; 2,7; 5; 7,7; 10; 15 y 20 mg/l 2,4-D (i.a.) y 0,5; 0,8; 1,38; 2,31 y 3,85 mg/l Esterón Ultra®, más CSA y CA.
- 3) Test de EXPOSICIÓN POR PULSO. Ensayo de exposición a 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra® durante 24 h y posterior cambio a SA con embriones y larvas en diferentes estadios del desarrollo. Estadios evaluados: E. 3 (2 blastómeros), E. 9 (blástula tardía), E. 11(gástrula media), E. 13 (placa neural), E. 17 (brote caudal), E. 18 (respuesta muscular), E. 21 (boca abierta), E. 23 (pliegue opercular) y E. 25

(opérculo completo). Concentraciones de ensayo: rango de 1 a 36 mg/l 2,4-D (i.a.) y de 1 a 3,6 mg/l Esterón Ultra®, más CSA y CA.

Puntos finales

Los parámetros de toxicidad evaluados fueron: letalidad y efectos subletales (alteraciones del comportamiento, alteraciones morfológicas (teratogénesis), retraso en el desarrollo y alteraciones del crecimiento)

RESULTADOS

1) Test AMPHISHORT. Exposición crónica corta de larvas en E. 25 (opérculo completo) a 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra®

Letalidad

Las figuras 1 y 2 resumen la sobrevida de las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra® a partir del E. 25. Los resultados obtenidos muestran que concentraciones de hasta 13 mg/l 2,4-D (i.a.) inclusive, no tuvieron efecto letal significativo, siendo similar a la mortalidad registrada en los controles. A partir de las 48 h de ensayo, la concentración de 15 mg/l produjo una mortalidad progresiva alcanzando el 100 % a las 168 h de ensayo. Durante todo el ensayo, la mortalidad en el CSA y CA no superó el 15 %. Las CLs 10, 50 y 90 calculadas para las 96 h de ensayo con sus respectivos límites de confianza (95 %) fueron las siguientes: 6,9 (5,8-8,3), 14,2 (11,1-19,8) y 47 (31,4-73,7) mg/l 2,4-D (i.a.), respectivamente.

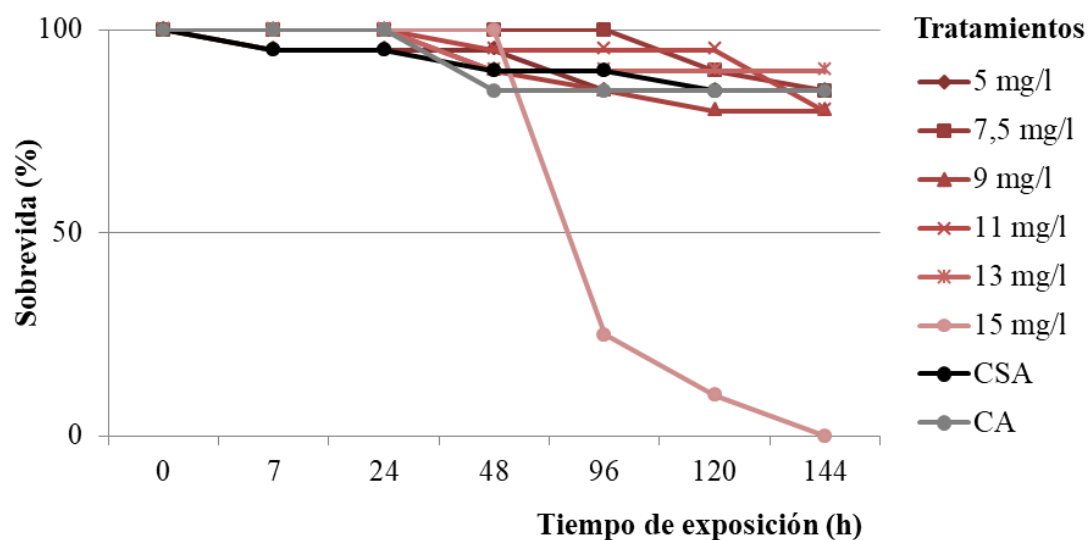


Figura 1: Curvas de sobrevida de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en E. 25 (opérculo completo) a 2,4-D (i.a.), durante 144 h. Los tratamientos se expresan en mg/l 2,4-D (i.a.).

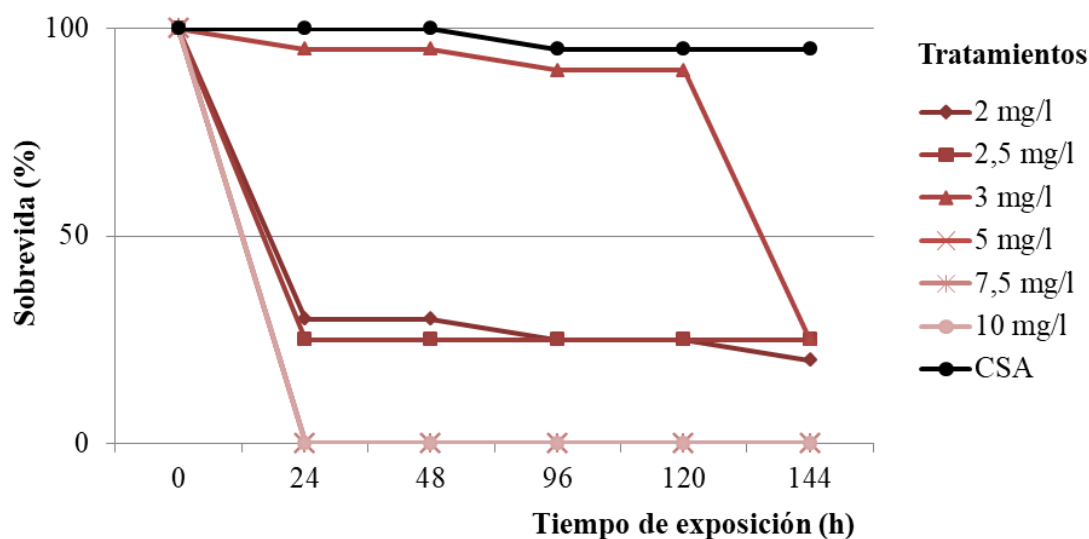


Figura 2: Curvas de sobrevida de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en E. 25 (opérculo completo) a Esterón Ultra® durante 144 h. Los tratamientos se expresan en mg/l Esterón Ultra®.

Para los ensayos con el formulado comercial, concentraciones de 5 mg/l Esterón Ultra® y superiores produjeron 100 % de letalidad a las 24 horas de ensayo. Concentraciones de 2; 2,5 y 3 mg/l Esterón Ultra®, disminuyeron progresivamente la sobrevida alcanzando el 25 % al finalizar el ensayo. La mortalidad de los controles no superó 5 %. Las CLs 10, 50 y 90 calculadas para las 96 h de ensayo con sus respectivos

límites de confianza (95 %) fueron las siguientes: 1,3(1,5-1,9); 2,6 (2,2-3,3) y 3,8 (4,75-6,15) mg/l Esterón Ultra®, respectivamente. La figura 3 muestra comparativamente las CLs calculadas para 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra®. Como se observa, considerando la CL 50, el formulado comercial resultó hasta 5,3 veces más tóxico que el i.a. solo.

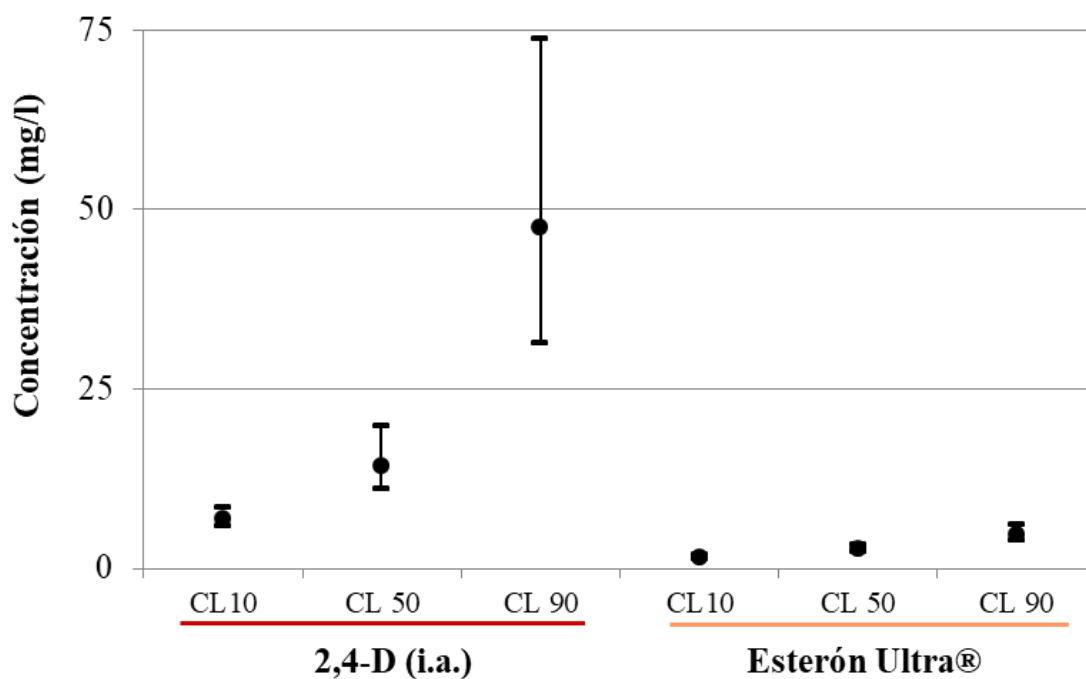


Figura 3. Comparación de las Concentración Letal (CL) 10, 50 y 90 para 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra®, y sus correspondientes límites de confianza (95 %), calculadas a las 96 h de ensayo para larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a partir del E. 25 (opérculo completo).

Alteraciones del comportamiento y de la morfología

Para el caso del 2,4-D (i.a.), concentraciones de 13 mg/l y superiores provocaron alteraciones en el comportamiento dentro de las primeras horas de ensayo. Se observó escasa respuesta al estímulo y natación en círculo. Estas respuestas también se registraron con concentraciones de 3 mg/l y superiores de Esterón Ultra®. Al finalizar el ensayo, no se registraron alteraciones en la morfología de las larvas expuestas a dichos compuestos.

2) Test AMPHIEMB. Exposición de embriones a partir del E. 3 (2 blastómeros) a 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra®

Letalidad

Exposición a 2,4-D (i.a.)

La figura 4 representa el porcentaje de sobrevivencia de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a 2,4-D (i.a.) a partir del E. 3. La mortalidad en concentraciones de hasta 2,7 mg/l 2,4-D (i.a.) no se diferenció de la registrada en el CSA y estuvo comprendida entre el 15 y 20 %. En la concentración de 5 mg/l se registró una mortalidad del 23 % mientras que concentraciones de 7,5 y 10 mg/l 2,4-D (i.a.) tuvieron un progresivo efecto letal durante todo el ensayo disminuyendo la sobrevivencia al 50 y 30 %, respectivamente, al finalizar el ensayo. Concentraciones de 12,5 y 15 mg/l 2,4-D (i.a.) tuvieron un marcado efecto letal desde las primeras horas alcanzando el 100 % a las 72 h de ensayo. La mortalidad en CSA y CA no superó el 10 %. Las CLs 10, 50 y 90 a las 168 h, con sus respectivos límites de confianza (95 %). fueron las siguientes: 6,0 (4,0-7,0); 8,3 (7,0-9,1) y 11,4 (10,3-14) mg/l 2,4-D, respectivamente.

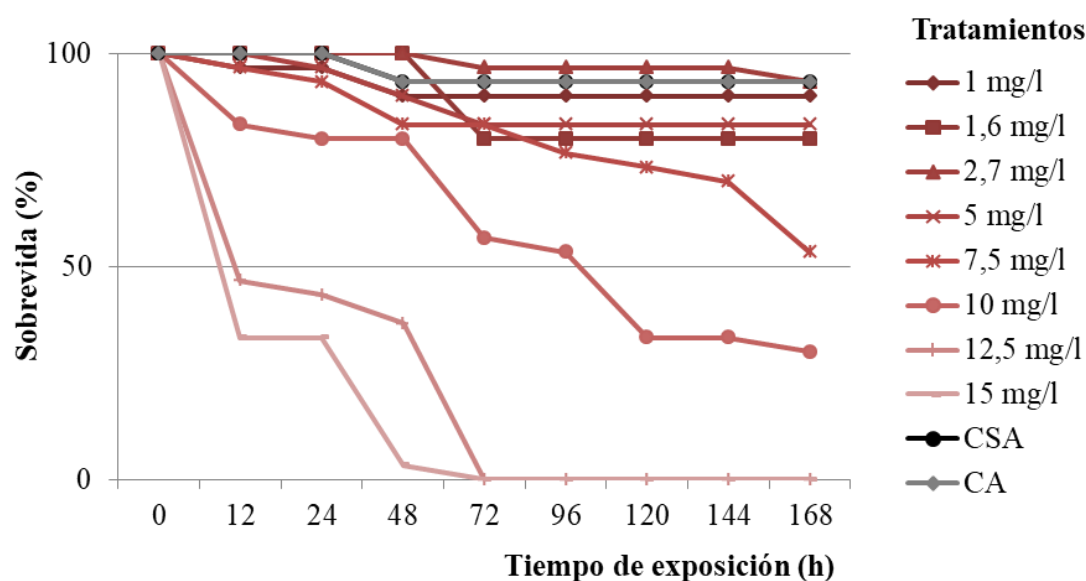


Figura 4. Curvas de sobrevivencia de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a 2,4-D (i.a.) a partir del E. 3 (2 blastómeros) durante 168 h. Los tratamientos se expresan en mg/l 2,4-D (i.a.).

Exposición a Esterón Ultra®

La sobrevivencia de los embriones expuestos a Esterón Ultra® se muestra en la figura 5. La mortalidad, en concentraciones de hasta 1 mg/l del formulado no se diferenció de la

registrada en el CSA. Concentraciones de 3,5 y 4 mg/l del formulado tuvieron un efecto letal dentro de las primeras horas de ensayo disminuyendo la sobrevida progresivamente hasta aproximadamente el 20 %, al finalizar el ensayo. La sobrevida en el CSA fue del 87 %. Las CLs 10, 50 y 90 a las 168 h, con sus respectivos límites de confianza (95 %), fueron las siguientes: 2,1 (0,8-2,7); 2,8 (2,0-3,3) y 4,1 (3,7-5,5) mg/l Esterón Ultra®.

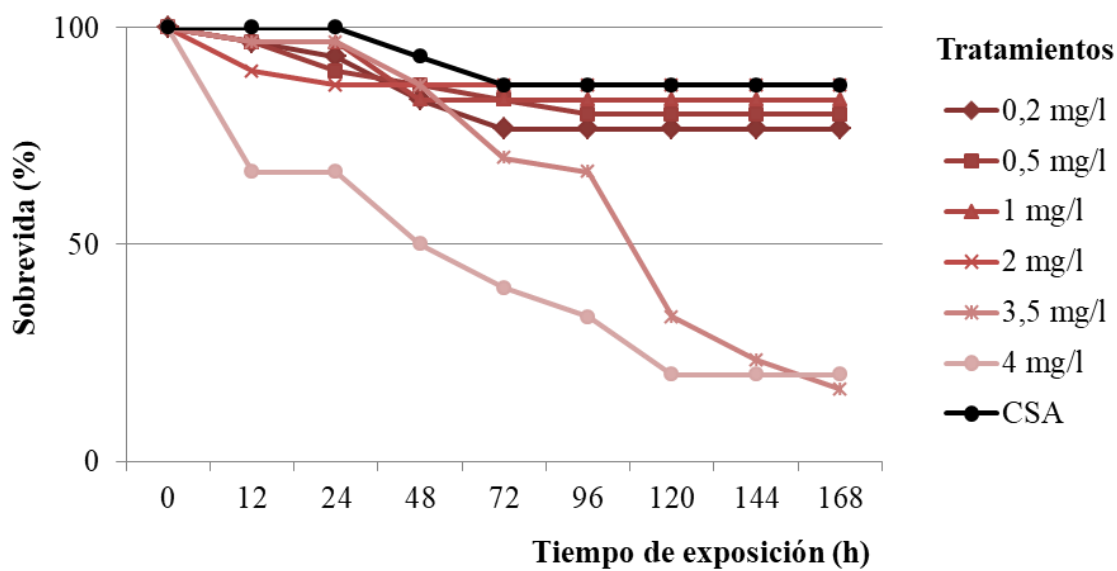


Figura 5. Curvas de sobrevida de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a Esterón Ultra® a partir del E. 3 (2 blastómeros) durante 168 h. Los tratamientos se expresan en mg/l Esterón Ultra®.

La figura 6 muestra comparativamente las CLs calculadas a las 168 h de ensayo para 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra®. Como se observa el formulado comercial resultó hasta 3 veces más letal que el i.a. solo.

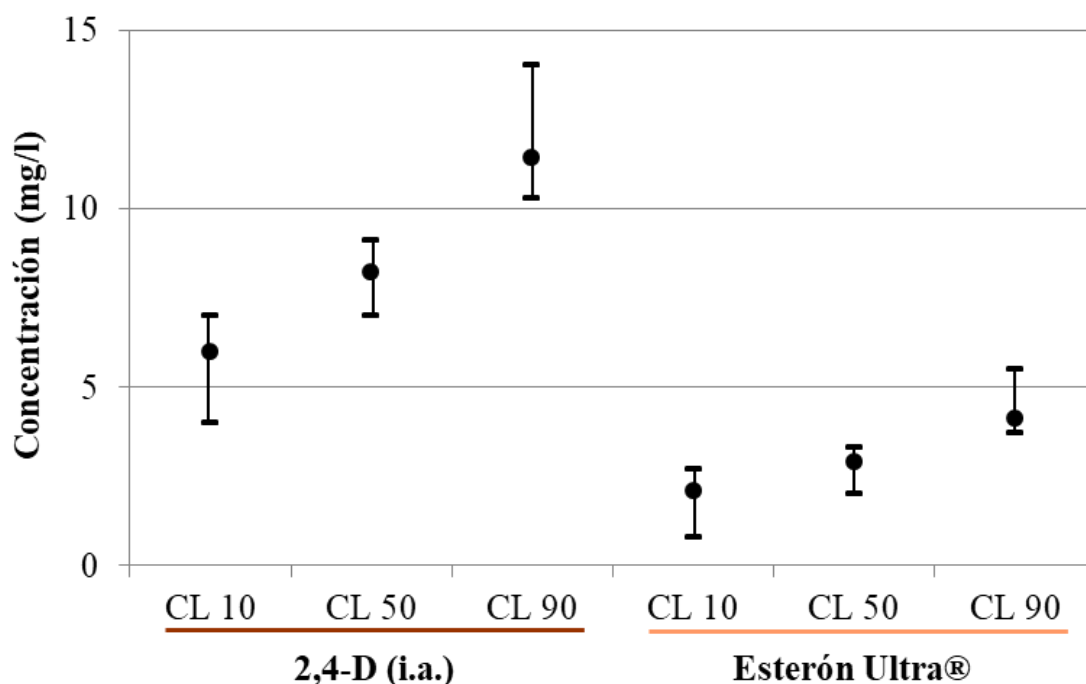


Figura 6. Comparación de la Concentración Letal (CL) 10, 50 y 90 para 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra®, y sus correspondientes límites de confianza (95 %), calculadas a las 168 h de ensayo para larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a partir del E. 3 (2 blastómeros).

Alteraciones de la morfología

Exposición a 2,4-D (i.a.)

A las 24 h de ensayo, tanto los embriones del CSA y CA como los tratados con hasta 7,7 mg/l 2,4-D (i.a.) habían alcanzado el E. 9 (blástula tardía). La mayoría de los embriones tratados con 10, 12,5 y 15 mg/l de 2,4-D (i.a.) se encontraban detenidos en estadios iniciales de blástula y mostraron desprendimiento de células epiteliales y contorno irregular. A las 48 h de ensayo los individuos del CSA y CA alcanzaron el E. 16 (tubo neural), mientras que los tratados con el tóxico tuvieron un leve retraso en el desarrollo, no superando el E. 15 y presentando anomalías como disociación y desprendimiento celular. A las 96 h de exposición, los embriones del CSA y CA alcanzaron el E. 20 (circulación branquial) o 21 (boca abierta) aunque entre el 3 y 6 % de los individuos presentó retraso en el desarrollo y malformaciones cefálicas, edema cardíaco, incurvación del eje y escaso desarrollo de la cola. Los embriones expuestos a las distintas concentraciones del tóxico alcanzaron el E. 20 o 21 y mostraron anomalías morfológicas como persistencia de tapón vitelino, incurvaciones del eje, microcefalia,

edema abdominal, subdesarrollo de branquias externas. Al finalizar el ensayo, los individuos del CSA y CA y los sobrevivientes tratados con 2,4-D (i.a.) alcanzaron el E. 25, aunque algunas larvas presentaron distintas alteraciones morfológicas en número variable según el tratamiento (Figura 7).

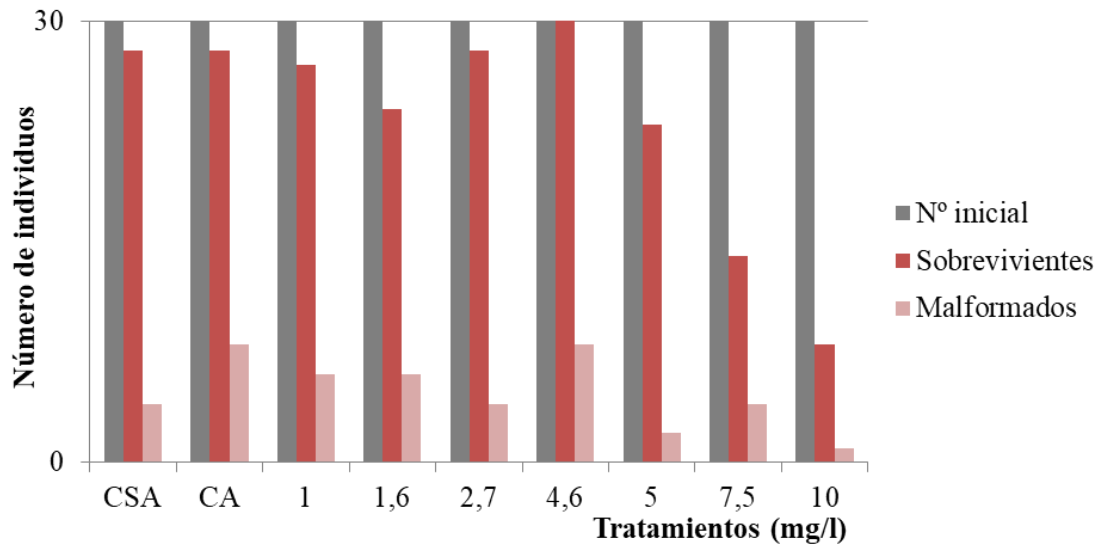


Figura 7. Número de individuos de *Rhinella arenarum* sobrevivientes y malformados expuestos de forma continua a 2,4-D durante 168 h, desde el E. 3 (2 blastómeros), con respecto al número inicial. Los tratamientos se expresan en mg/l 2,4-D (i.a.).

La figura 8 representa el porcentaje de cada tipo de malformación registrada.

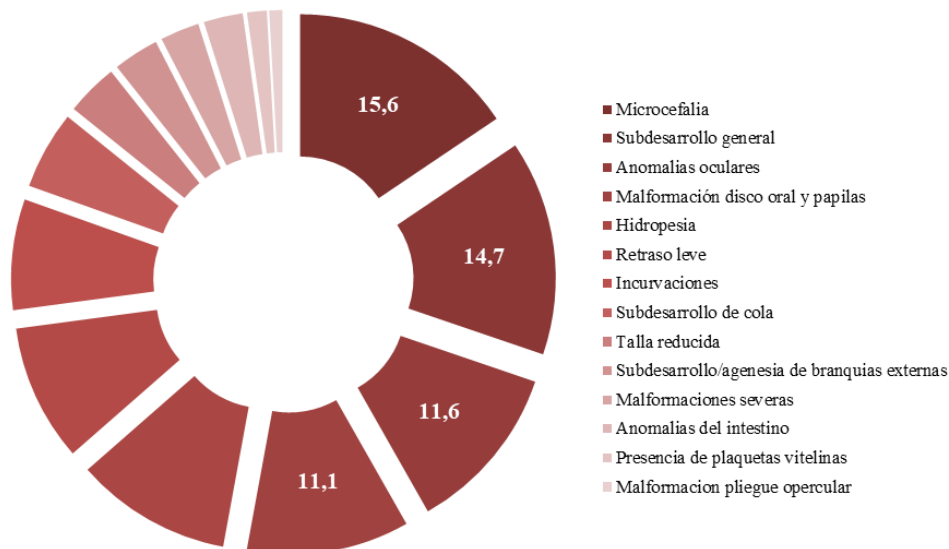


Figura 8. Porcentaje de malformaciones registradas en los individuos tratados con 2,4-D (i.a.) desde el E. 3 (2 blastómeros). N = 225.

Entre las malformaciones se registraron incurvaciones leves del eje ($> 160^\circ$) e hidropesía leve. Las malformaciones severas observadas fueron: incurvaciones del eje ($< 160^\circ$), persistencia de plaquetas vitelinas, microcefalia, subdesarrollo de branquias, subdesarrollo o agenesia de ojos, malformación de estructuras bucales y discos adhesivos, subdesarrollo de la cola, subdesarrollo de aleta caudal e hidropesía severa con malformación de órganos internos, en algunos casos (Figura 9).

El análisis con MEB (Figura 10) permitió observar, además, anomalías en la formación de las estructuras craneales, microcefalia, alteraciones del disco oral, subdesarrollo de branquias externas, subdesarrollo de la aleta caudal, alteraciones en la formación del opérculo y pliegues en el tegumento.

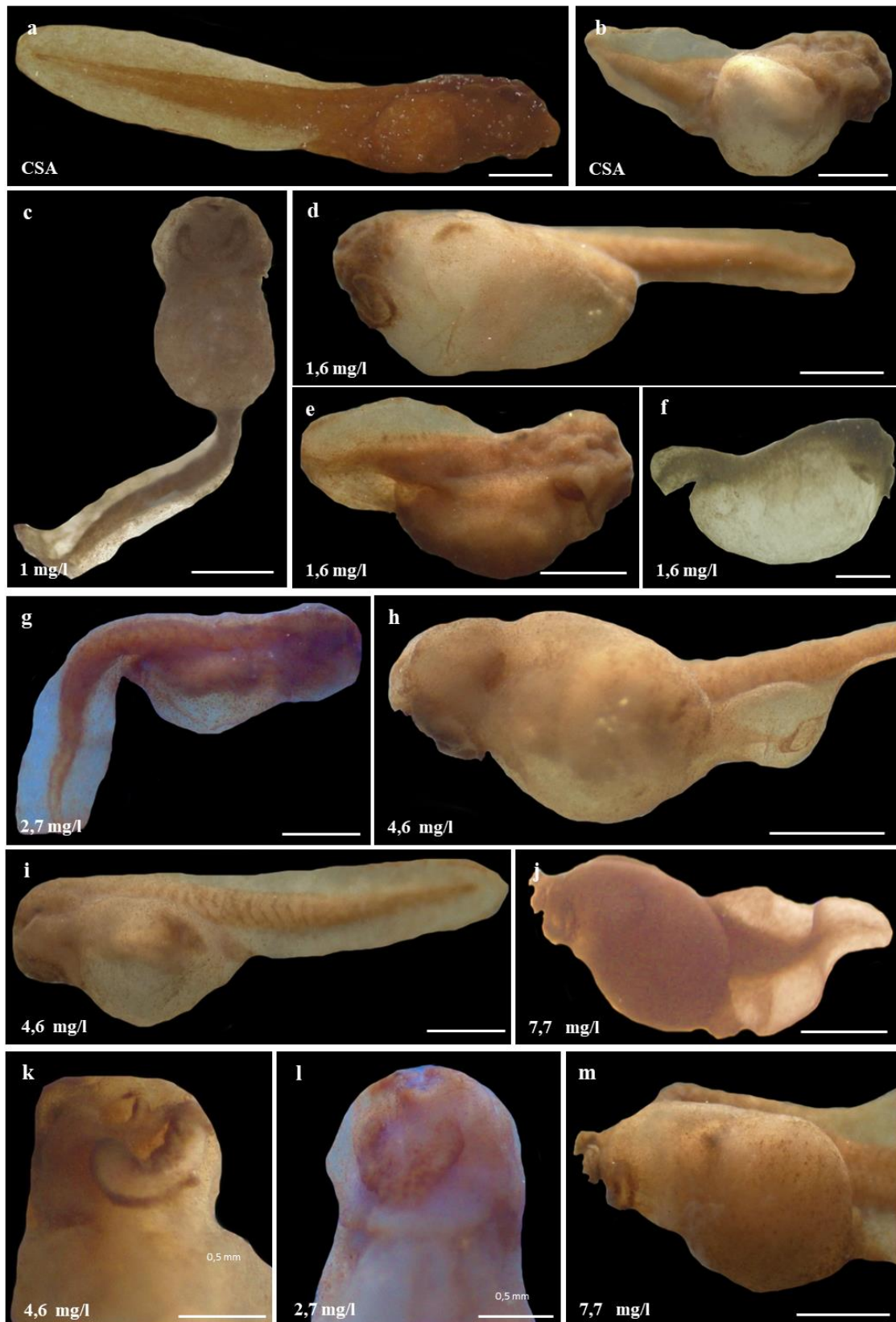


Figura 9. Alteraciones morfológicas de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a 2,4-D (i.a.) desde el E. 3 (2 blastómeros), en comparación con el control (CSA). a, b, e, f, g) vista lateral derecha; d, h, i, j, m) vista lateral izquierda; c) vista ventral, k-m) detalle

región cefálica. Nótese en b) hidropesía abdominal, microcefalia y subdesarrollo de la cola, en c y g) incurvación del eje y malformación del disco oral, en d) hidropesía abdominal y microcefalia con agenesia de ojos, estructuras bucales y branquias externas y subdesarrollo de la aleta caudal, en e) microcefalia con agenesia de ojos y de branquias externas y subdesarrollo de la cola, en f) severa hidropesía abdominal con agenesia de órganos internos, microcefalia y agenesia de ojos, disco oral, branquias externas, en h) hidropesía abdominal y cloacal, subdesarrollo de aleta caudal, malformación de estructuras bucales, subdesarrollo de branquias externas, en i) hidropesía abdominal, en j) severa incurvación y subdesarrollo de la cola, microcefalia, en k, i y m) malformación de papilas adhesivas y del disco oral con ausencia de surpraostrodonte e infrarostrodonte, papilas bucales y de hileras de queratodontes. Las concentraciones se expresan en mg/l 2,4-D (i.a.). Escala: a-j: 1 mm., k-l: 0,5 mm.

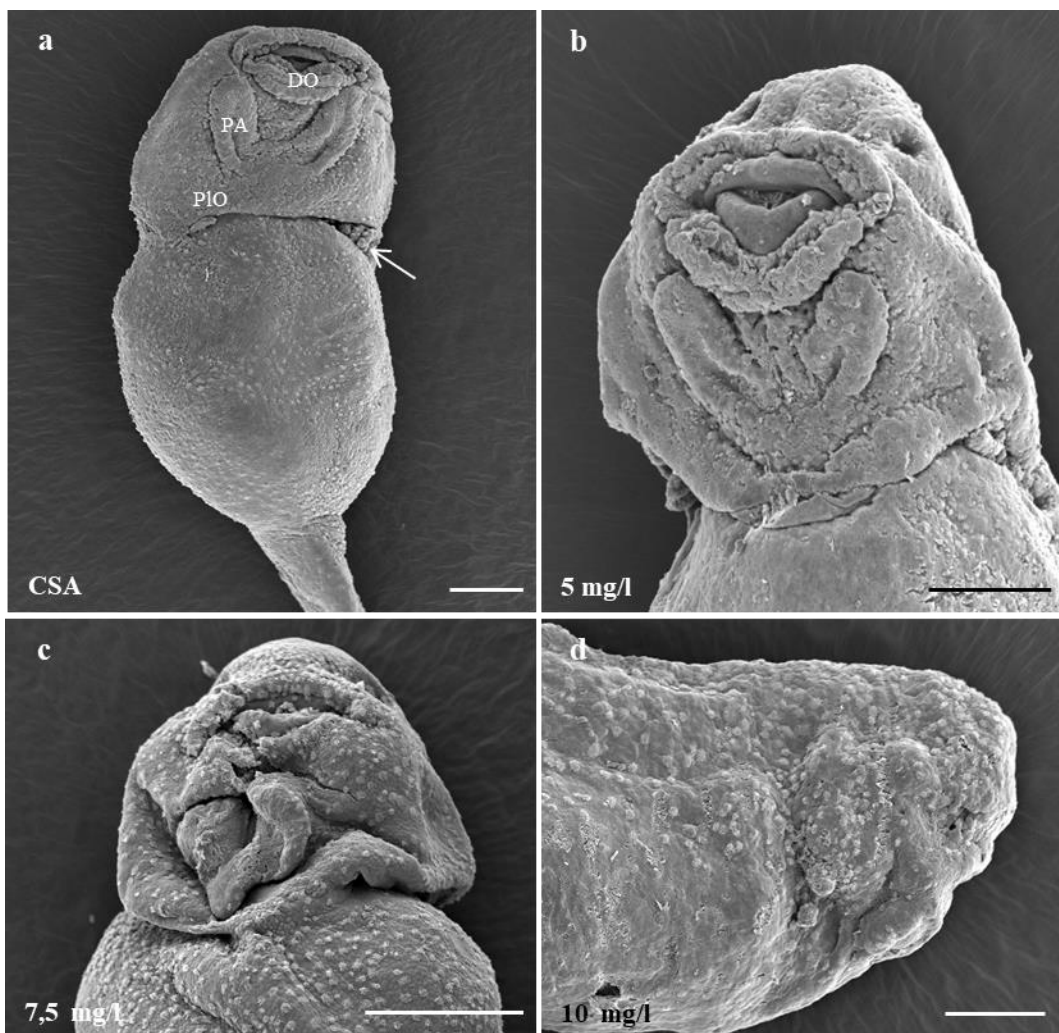


Figura 10: Fotografías de MEB de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas de forma continua a 2,4-D a partir del E. 3 (2 blastómeros). a) Vista ventral de un embrión del CSA en E. 24 con formación del pliegue opercular. b) Vista ventral de un embrión tratado con 2,4-D. Nótese el subdesarrollo del pliegue opercular. c) Detalle de la región cefálica ventral mostrando pliegues del tegumento y malformación del disco oral. d) Vista lateral de la región cefálica de una larva tratada con 2,4-D. Obsérvese

microcefalia, agenesia/subdesarrollo de branquias externas, agenesia pliegue opercular, agenesia de estructuras del disco oral. Referencias: **DO**: disco oral, **PA**: papilas adhesivas, **PIO**: pliegue opercular, flecha: branquias externas. Escala: 0.25 mm.

El IT calculado fue de 0,01. Considerando el número de muertos y el número de individuos que presentaron malformaciones al finalizar el ensayo, se observa que las concentraciones de 7,5 y 10 mg/l fueron las más perjudiciales (Figura 11), afectando a más del 65 % de los individuos expuestos.

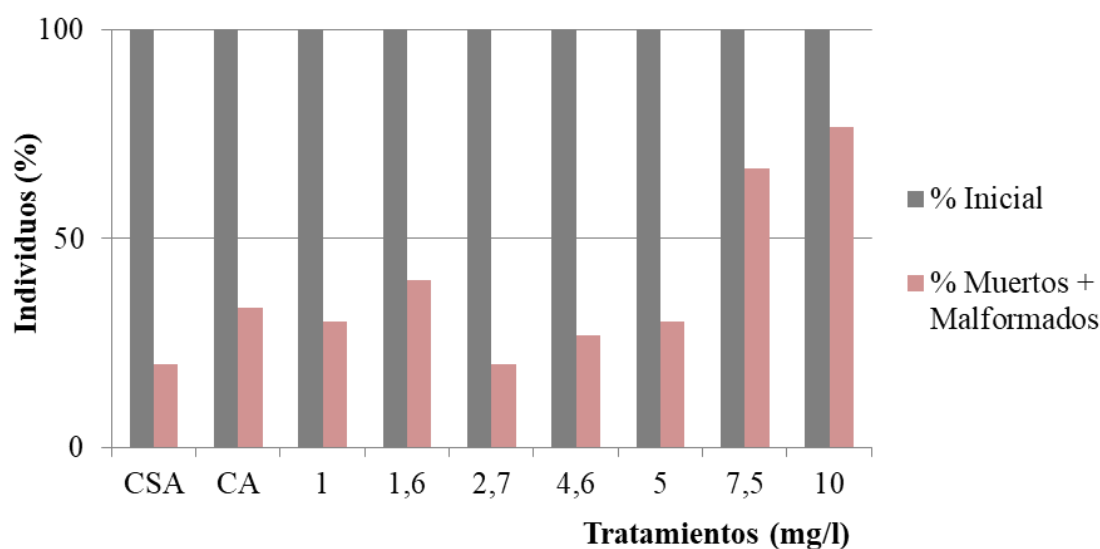


Figura 11. Porcentaje de larvas de *Rhinella arenarum* afectadas (muertas + malformadas) registrado a las 168 h en el ensayo de exposición continua a 2,4-D (i.a.) desde el E. 3 (2 blastómeros). Los tratamientos se expresan en mg/l 2,4-D (i.a.).

El análisis de la varianza no mostró diferencias significativas ($F_{4,88} = 0,29$, $P = 0,8821$) entre la talla de los individuos del control y los tratados con 2,4-D, al finalizar el ensayo. Los tratados con concentraciones de 4,6 mg/l 2,4-D (i.a.) y superiores presentaron natación anómala y contracciones espasmódicas, luego de ser estimulados.

Exposición a Esterón Ultra®

A las 24 h de ensayo, los embriones control y los tratados con el formulado alcanzaron el estadio de blástula final. Sin embargo, los tratados con el formulado presentaron aspecto anómalo y se observó desprendimiento de células epiteliales, particularmente en las dos concentraciones más altas. A las 48 h, los embriones del

CSA alcanzaron el E. 16-17 al igual que los expuestos a 0,5 y 1 mg/l del formulado. Sin embargo estos últimos presentaron anomalías como persistencia del tapón vitelino, abdomen globoso y disociación celular. Los embriones tratados con concentraciones de 2 mg/l del formulado y superiores no superaron el E. 15 y presentaron disociación y descamación celular, persistencia del tapón vitelino, abdomen globoso y microcefalia. A las 96 h de ensayo, los embriones control y los tratados con 0,5 mg/l del formulado alcanzaron el E. 21, mientras que los expuestos a concentraciones superiores no superaron el E. 20. Los individuos expuestos al formulado mostraron menor talla y subdesarrollo general con anomalías morfológicas, tales como microcefalia, agenesia de ojos, agenesia de branquias externas, subdesarrollo o agenesia de la cola y/o aleta caudal, pliegues del tegumento, incurvaciones e hidropesía. Al finalizar el ensayo, los individuos del control y los tratados con el formulado sobrevivientes, alcanzaron el E. 25.

La figura 12 representa la proporción de cada tipo de malformación registrada. Las malformaciones observadas fueron incurvaciones, microcefalia o acefalia, persistencia de plaquetas vitelinas, subdesarrollo de branquias externas, subdesarrollo o agenesia de ojos, malformación de estructuras bucales y discos adhesivos, subdesarrollo de la cola y de la aleta caudal, e hidropesía con agenesia o malformación de órganos internos (Figura 13).

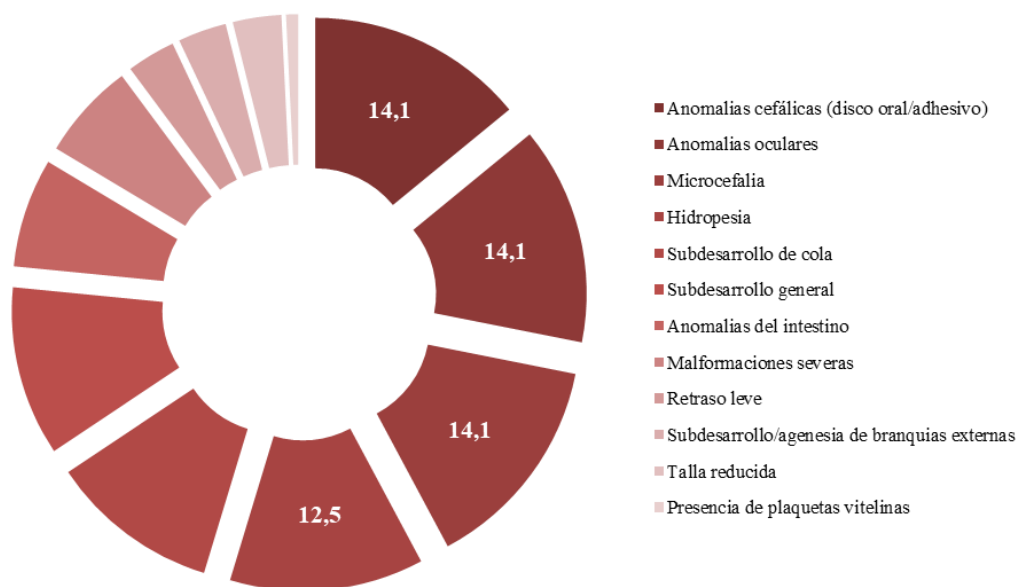


Figura 12. Porcentaje de los distintos tipos de malformaciones registradas en los individuos tratados con Esterón Ultra® desde el E. 3 (2 blastómeros). N = 128.

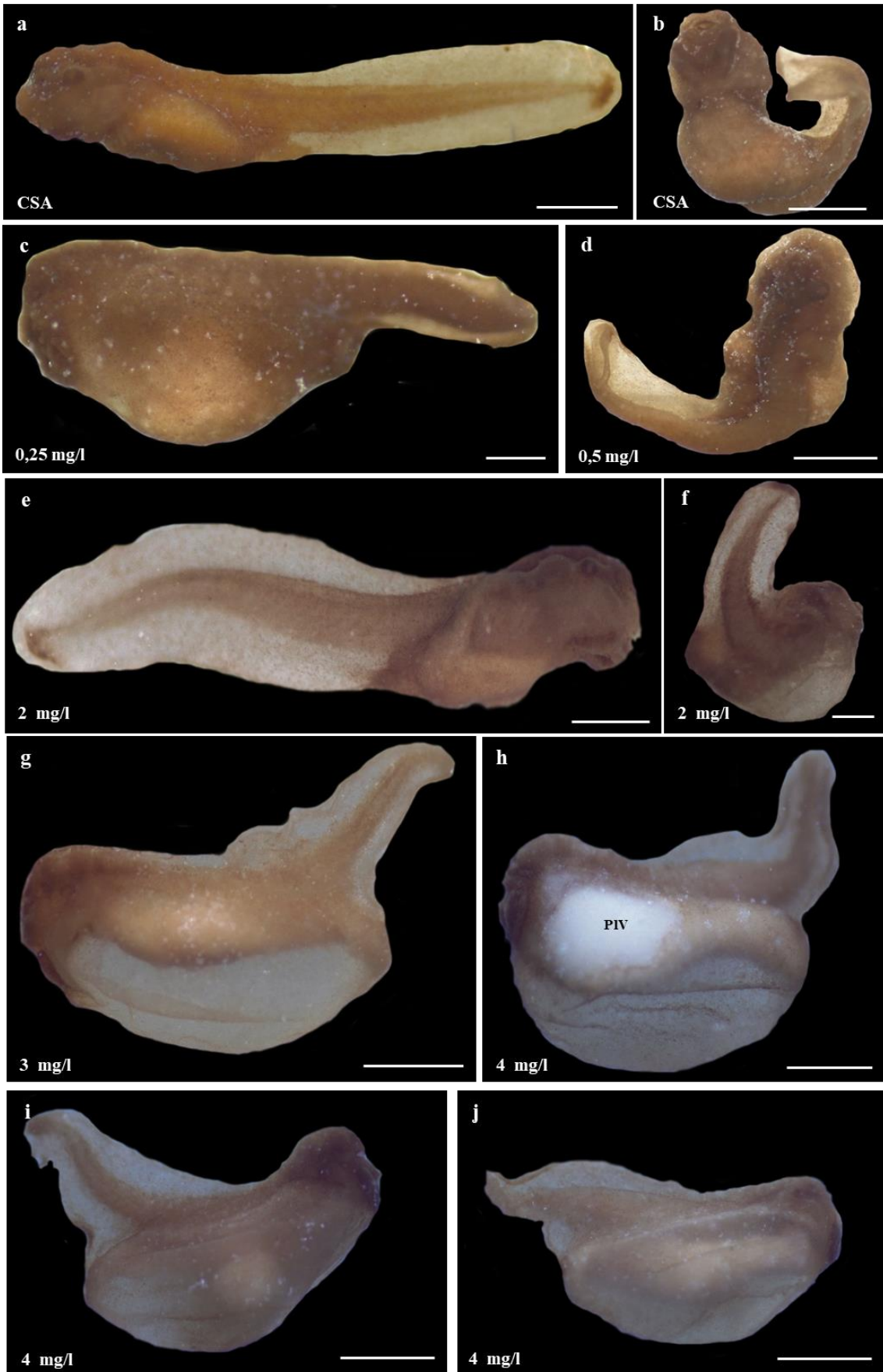


Figura 13. Alteraciones morfológicas de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a Esterón Ultra® desde el E. 3 (2 blastómeros), en comparación con el tratamiento control (CSA). a, c) vista lateral izquierda; e, f, i, j) vista lateral derecha; b) vista ventral, d) vista dorsal. Nótese: en b y d) severa incurvación y subdesarrollo de la cola, en c) microcefalia y subdesarrollo de la cola, en e) incurvación de la cola, hidropesía abdominal y microcefalia con agenesia de ojos, estructuras bucales y branquias externas y subdesarrollo de la aleta caudal, en f) severa incurvación y microcefalia con agenesia de ojos y de branquias externas y subdesarrollo de la cola, en g, h, i y j) subdesarrollo general, severa hidropesía, microcefalia con agenesia de estructuras cefálicas, subdesarrollo de la cola e incurvación, presencia de plaquetas de vitelinas, anomalías del intestino. Referencias: **PIV**: plaquetas vitelinas. Escala: 1 mm.

La figura 14 muestra comparativamente el número de individuos sobrevivientes y los que presentaron malformaciones en cada uno de los tratamientos. Como se observa, en las dos concentraciones más altas la sobrevivencia fue marcadamente menor que en el resto de los tratamientos y el CSA y provocó malformaciones en el 100 % de los individuos sobrevivientes. El IT calculado fue de 1,26.

Asimismo, los individuos expuestos a 1,38 mg/l y concentraciones superiores del formulado comercial presentaron natación anómala (desplazamientos breves e incoordinados o en círculo) durante la exposición al tóxico.

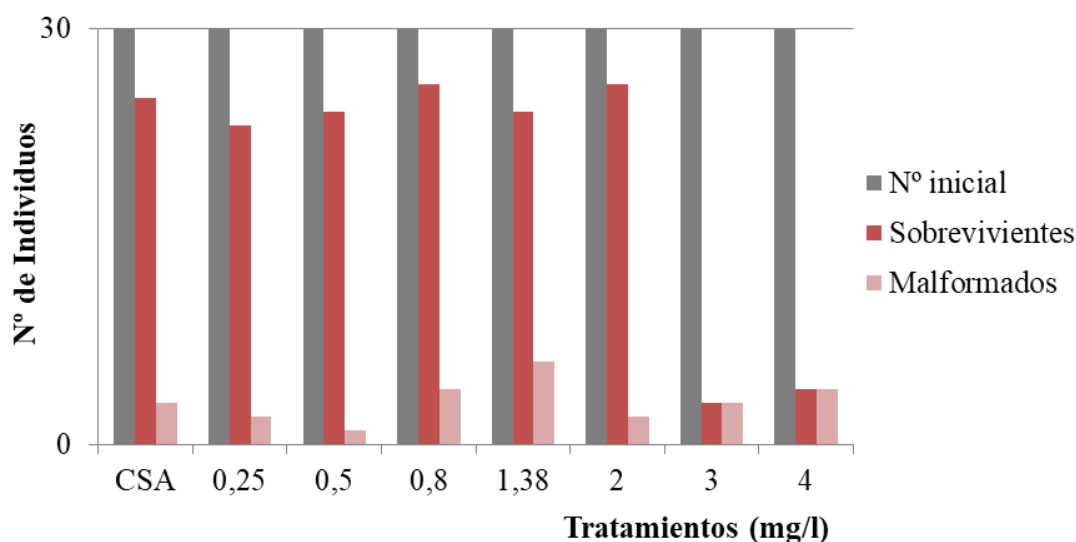


Figura 14. Número de individuos de *Rhinella arenarum* sobrevivientes y malformados luego de la exposición continua a Esterón Ultra® desde el E. 3 (2 blastómeros), con respecto al número inicial. Los tratamientos se expresan en mg/l Esterón Ultra®.

El análisis de la varianza mostró diferencias significativas ($p < 0,01$) entre la talla de los individuos del control y los tratados con el formulado, al finalizar el ensayo (Figura 15). La talla de los individuos tratados con 4 mg/l Esterón Ultra® fue significativamente menor ($F_{6,123} = 7,56$ $P = < 0,0001$) en comparación con el resto de los tratamientos y el CSA.

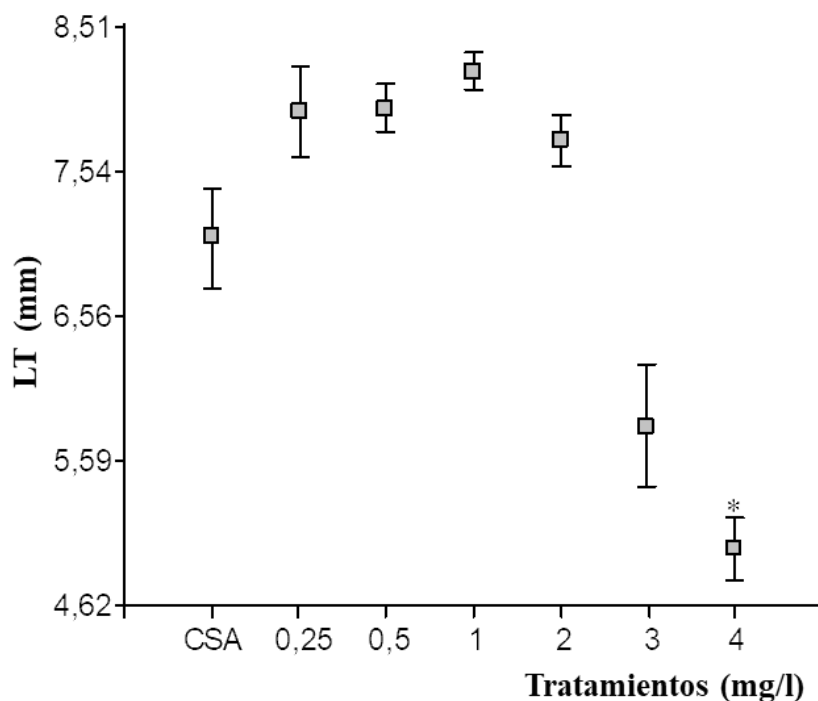


Figura 15. Comparación de la Longitud Total (LT) alcanzada por las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a Esterón Ultra® a partir del E. 3 (2 blastómeros). Los tratamientos se expresan en mg/l Esterón Ultra®. El asterisco indica diferencias significativas con el CSA ($p < 0,01$).

3) Tets de EXPOSICIÓN POR PULSO. Exposición de embriones y larvas en distitos estadios del desarrollo a 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra® por 24 h

Letalidad

El análisis de la sensibilidad estadio-dependiente a partir de la exposición por pulso mostró diferencias significativas ($p < 0,5$) entre las CLs 50 calculadas para 2,4-D ($T = 9,04$, $P < 0,0001$) y para Esterón Ultra® ($T = 4,38$, $P = 0,0024$).

La figura 16 muestra los valores de CL 50 para 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra® para cada estadio del desarrollo analizado. Como se observa en la gráfica, se registró

variabilidad en la susceptibilidad entre estadios, siendo los estadios embrionarios tempranos (E. 3, 9 y 11) los más susceptibles, para 2,4-D (i.a). En el caso del formulado comercial, los estadios embrionarios avanzados (E. 18 y 21) y larvales premetamórficos (E. 23 y 25) mostraron ser los más sensibles al efecto letal. Para todos los casos analizados el formulado comercial fue en promedio 4,7 veces más tóxico que el ingrediente activo. Para estadios embrionarios tempranos (E. 3, 9, 11 y 13), el formulado comercial fue aproximadamente 2 veces más tóxico que el ingrediente activo, mientras que para estadios embrionarios avanzados (E. 18 y 21) y larvales premetamórficos (E. 23 y 25) la toxicidad del formulado comercial fue aproximadamente 7 y 6 mayor que la del ingrediente activo, respectivamente.

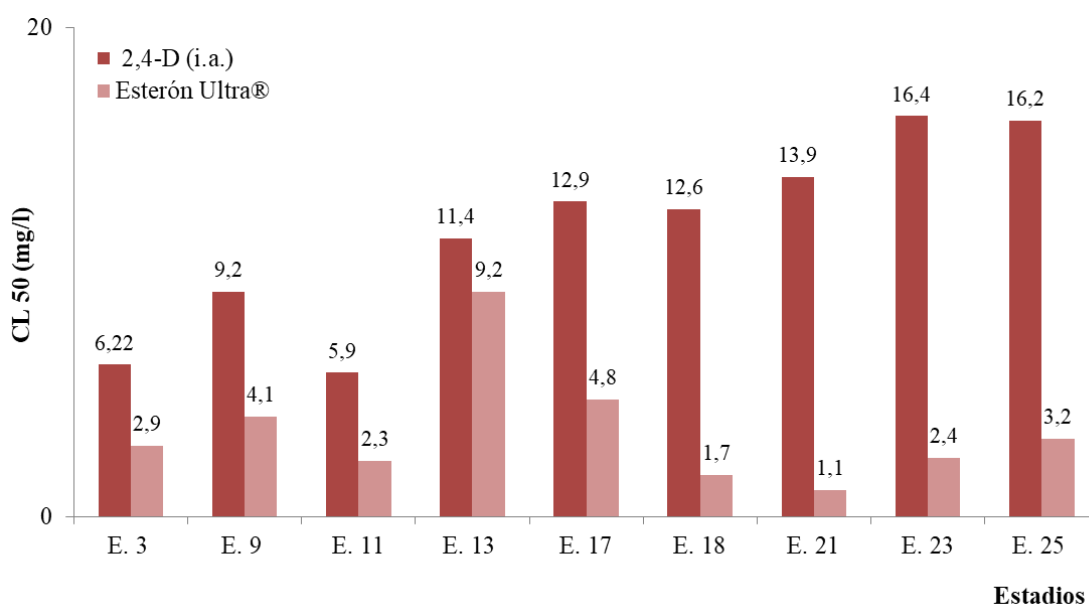


Figura 16: Comparación de los valores de CL50 para 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra® para distintos estadios embrionarios y larvales de *Rhinella arenarum* expuestos por pulso de 24 h y posterior cambio a SA.

Alteraciones del comportamiento y de la morfología

Las alteraciones en el comportamiento y malformaciones variaron según el estadio de exposición. La exposición a 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra® en E. 3 y E. 9 provocó alteraciones morfológicas dentro de las primeras 24 h de ensayo. En concentraciones de entre 10 y 16 mg/l 2,4-D (i.a.), se observó disociación y desprendimiento celular dentro de las primeras 24 h de ensayo, con una importante

disminución de la sobrevida en las horas subsiguientes. Concentraciones de 20 mg/l y superiores provocaron el detenimiento del desarrollo y muerte de los embriones a las 24 h de ensayo. Concentraciones de 4 mg/l y superiores del formulado comercial provocaron tanto disociación y desprendiendo celular como anomalías en la pigmentación en las primeras horas de ensayo, y alteraciones en la gastrulación con persistencia de plaquetas vitelinas en las horas subsiguientes.

El análisis de las individuos sobrevivientes al finalizar el ensayo mostró que tanto los individuos del CSA y CA, como los tratados con 2,4-D y Esterón Ultra® presentaron malformaciones en proporción variable (Figuras 17 y 18). Las malformaciones más frecuentes fueron: hidropesía, microcefalia con anomalías en el desarrollo de estructuras cefálicas (ojos, disco oral, papilas adhesivas y branquias externas), subdesarrollo de la cola y de la aleta caudal e incurvaciones severas del eje (Figura 19). Asimismo, se observó que las concentraciones más altas de ambos compuestos provocaron severas alteraciones morfológicas en aproximadamente el 5 % de los individuos malformados. En dichos individuos, clasificados como severamente malformados, no se reconocieron estructuras cefálicas, no presentaron cola o presentaron una cola pequeña bifurcada, tuvieron un abdomen globoso sin diferenciación de órganos internos y en la mayoría de los casos con persistencia de plaquetas vitelinas. Este tipo de malformaciones se registró en el 100 % de los individuos sobrevivientes tratados con 8 mg/l Esterón Ultra® en el E. 9.

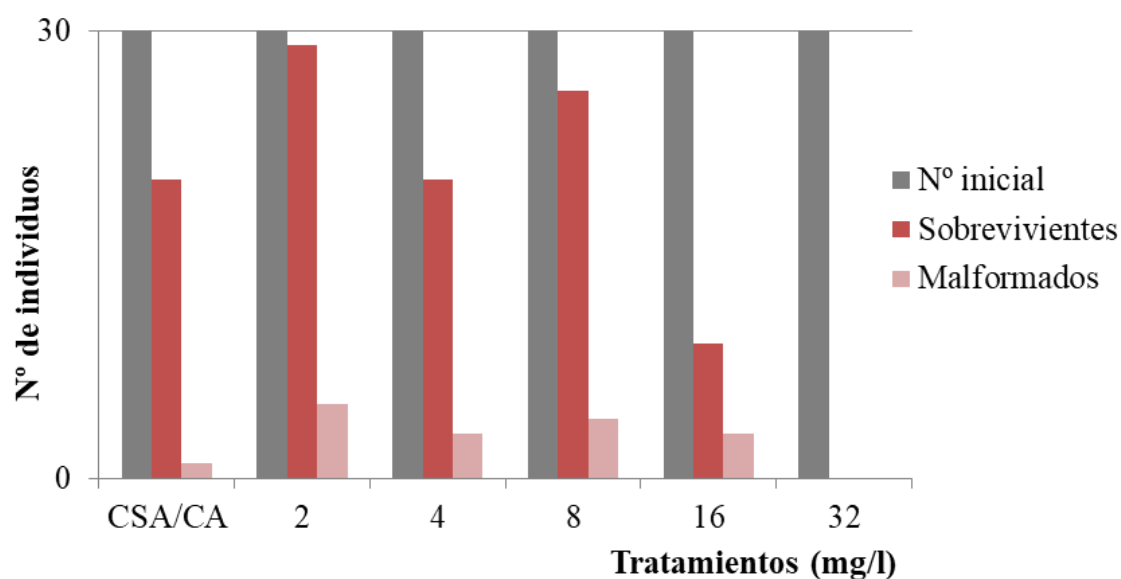


Figura 17. Número de individuos de *Rhinella arenarum* sobrevivientes y malformados luego de la exposición por pulso de 24 h a 2,4-D (i.a.) en el E. 3 (2 blastómeros), con respecto al número inicial. Los tratamientos se expresan en mg/l 2,4-D (i.a.). El número de sobrevivientes y malformados de CSA/CA representa un promedio entre ambos controles.

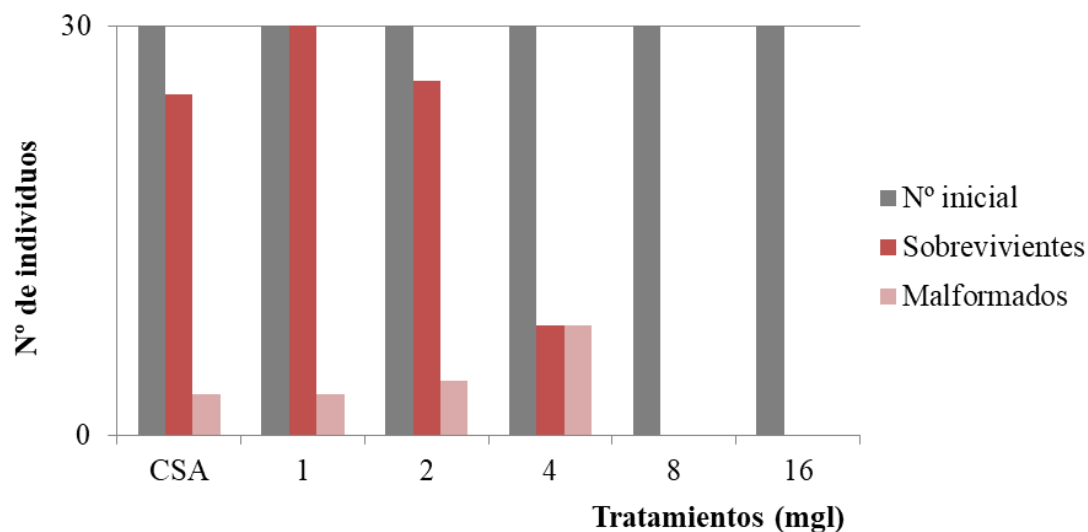


Figura 18. Número de individuos de *Rhinella arenarum* sobrevivientes y malformadas luego de la exposición por pulso de 24 h a Esterón Ultra® en el E. 3 (2 blastómeros), con respecto al número inicial. Los tratamientos se expresan en mg/l Esterón Ultra®.

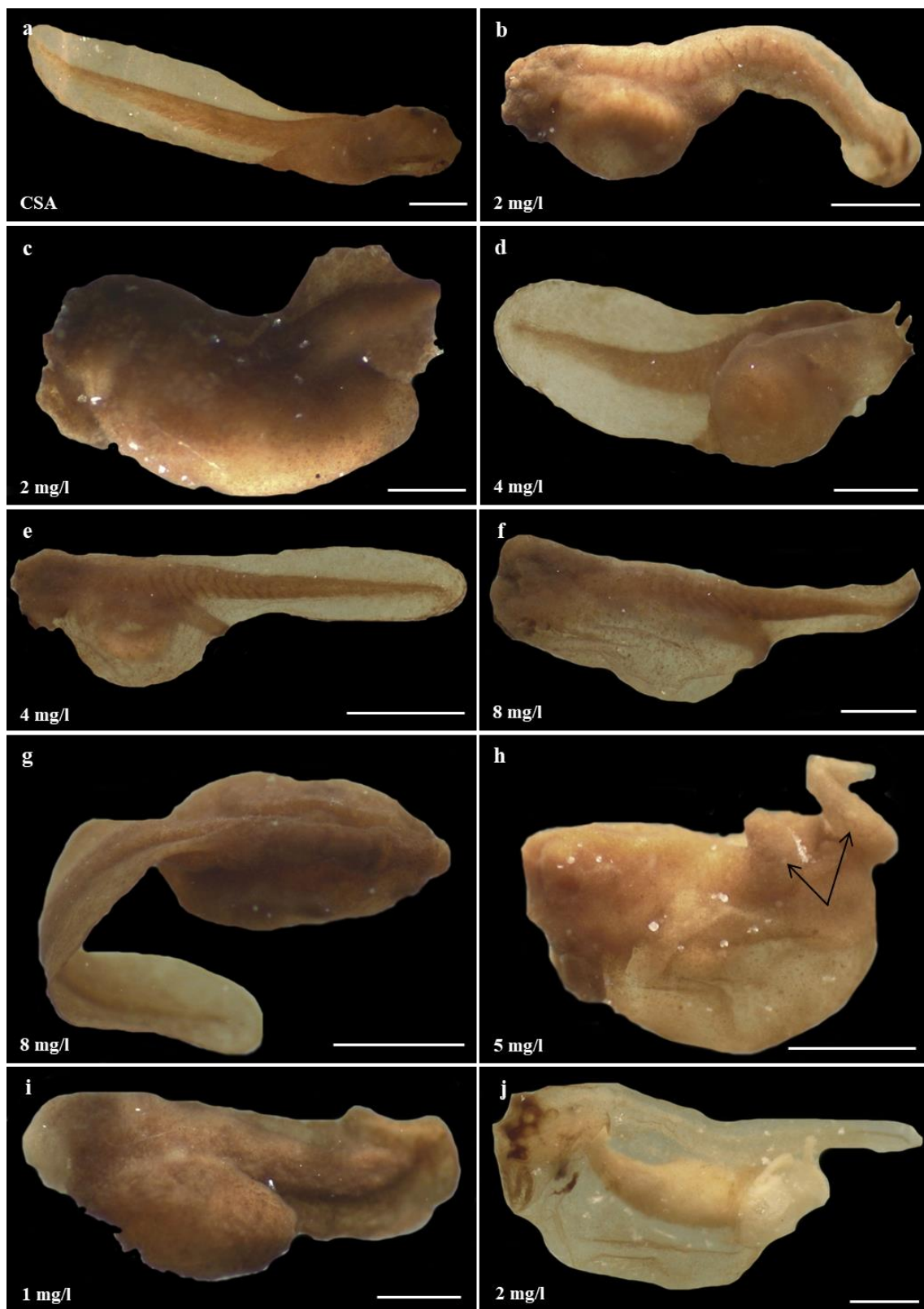


Figura 19. Alteraciones morfológicas de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas por pulso de 24 h a 2,4-D (i.a.) en E. 3 (a-g) y E. 9 (h) y a Esterón Ultra® en E. 3 (i) y E. 9 (j), en comparación con el tratamiento control (CSA). Nótese: en b) microcefalia, incurvación y subdesarrollo de la cola y aleta caudal, en c) severas malformaciones, microcefalia con agenesia de estructuras cefálicas y subdesarrollo caudal, en d) acefalia

con agenesia de estructuras orales, papilas adhesivas y branquias externas, en e, f) microcefalia, hidropesía con agenesia o malformación de asas intestinales, subdesarrollo caudal, en g) acefalia e incurvación del eje, en h) severas malformaciones, microcefalia, hidropesía, cola bifurcada (flechas), en i) acefalia y subdesarrollo general, en j) severas malformaciones, microcefalia, subdesarrollo general, nótese severa hidropesía con agenesia de asas intestinales y presencia de plaquetas vitelinas en la cloaca. Escala: a-g, j: 1 mm, h, i: 0,5 mm.

La exposición a 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra® en E. 11 provocó alteraciones como disociación y desprendimiento de células de la masa vitelina y alteraciones en la gastrulación, dentro de las 24 h de ensayo. Concentraciones de 8 y 16 mg/l de 2,4-D (i.a.) y todas las concentraciones de Esterón Ultra® provocaron la persistencia de plaquetas vitelinas en estadios de neurulación. Al finalizar el ensayo, los embriones tratados presentaron malformaciones similares a las descritas anteriormente (Figura 20), en proporción variable según la concentración (Figuras 21 y 22).



Figura 20. Alteraciones morfológicas de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas por pulso de 24 h a 2,4-D (i.a.) (a-e, g) y a Esterón Ultra® (f), en E. 11 (gástrula media), en comparación con el tratamiento control (CSA). Nótese: en b) malformación de estructuras orales y papilas adhesivas, subdesarrollo de la cola y aleta caudal y descamación celular, en c) severas malformaciones, microcefalia con agenesia de

estructuras cefálicas, subdesarrollo caudal e incurvación, en d) microcefalia, hidropesía, subdesarrollo de asas intestinales, cola bifurcada, en e) microcefalia, malformación de estructuras orales, papilas adhesivas y branquias externas, subdesarrollo caudal e incurvación, en f) acefalia con agenesia de estructuras orales, papilas adhesivas y branquias externas, subdesarrollo caudal e incurvación, g) microcefalia, malformación de estructuras orales, papilas adhesivas y branquias externas, subdesarrollo caudal e incurvación. Escala: 1 mm.

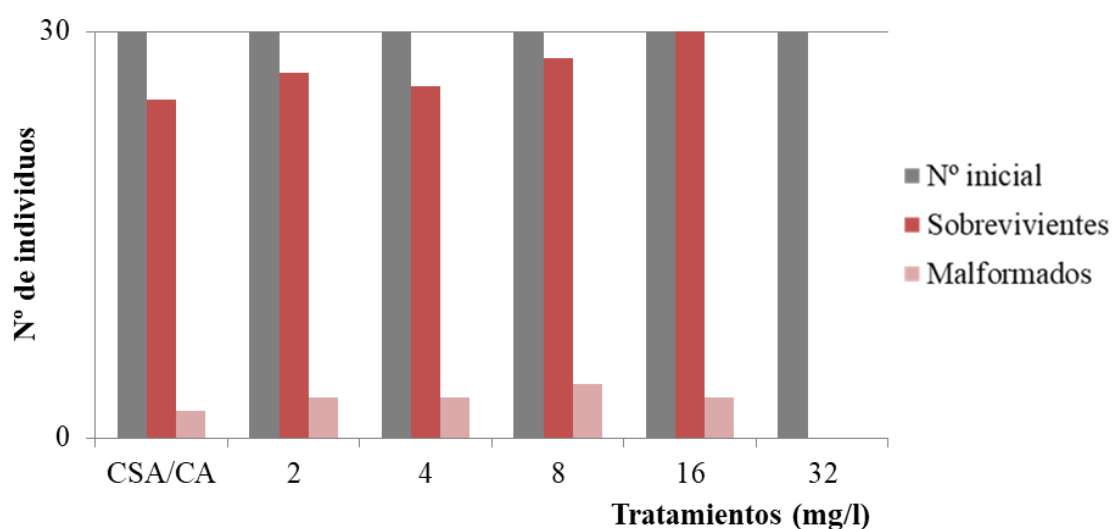


Figura 21. Número de individuos de *Rhinella arenarum* sobrevivientes y malformados luego de la exposición por pulso de 24 h a 2,4-D (i.a.) en el E. 11 (gástrula media), con respecto al número inicial. Los tratamientos se expresan en mg/l 2,4-D (i.a.).

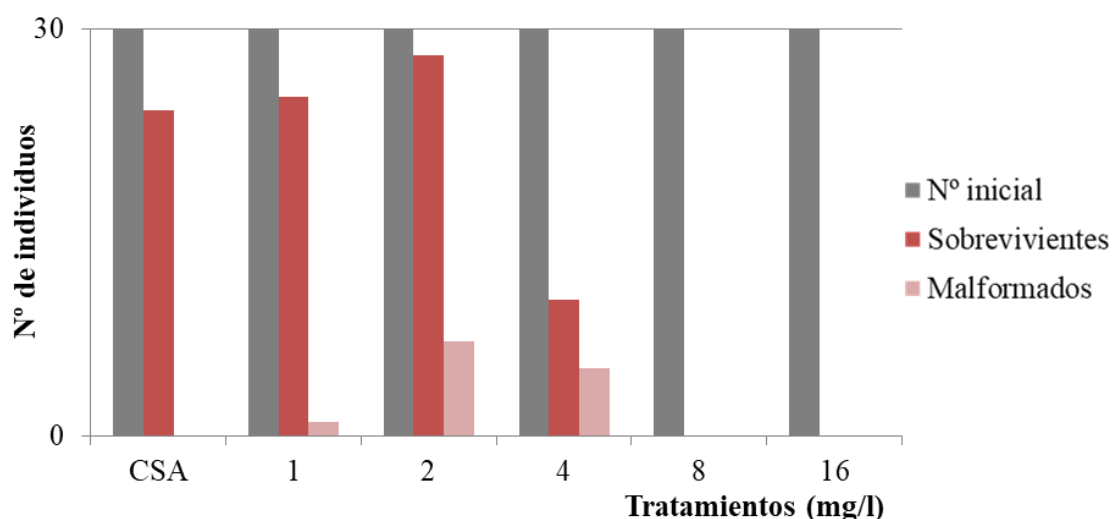
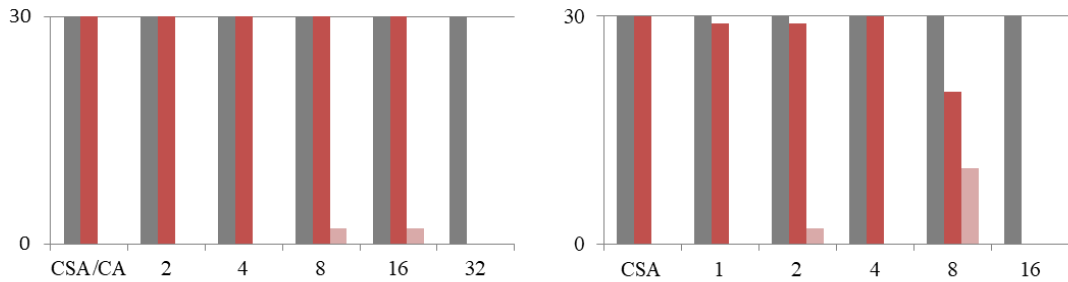


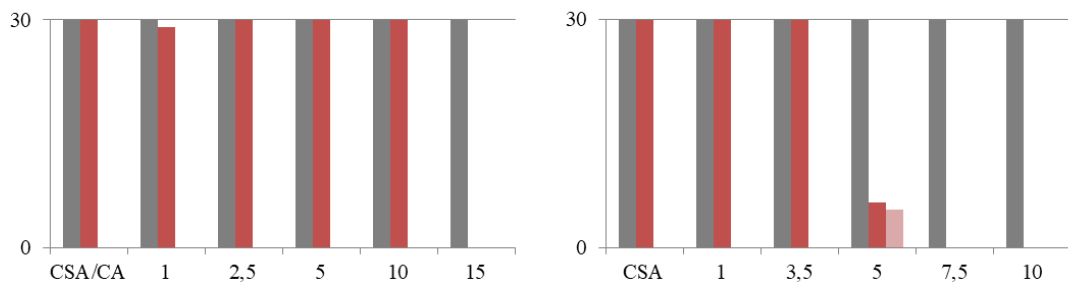
Figura 22. Número de individuos de *Rhinella arenarum* sobrevivientes y malformadas luego de la exposición por pulso de 24 h a Esterón Ultra® en el E. 11 (gástrula media), con respecto al número inicial. Los tratamientos se expresan en mg/l Esterón Ultra®.

La proporción de sobrevivientes y malformados registrada en los ensayos de exposición a 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra® durante 24 h en los E. 13, 17, 21 y 25 se presenta en la figura 23. En estos casos, a diferencia de lo registrado en los E. 3, 9 y 11, se observa una disminución en la proporción de malformados en relación a los sobrevivientes y, por lo tanto, una menor susceptibilidad al efecto letal y teratogénico, particularmente para el E. 25.

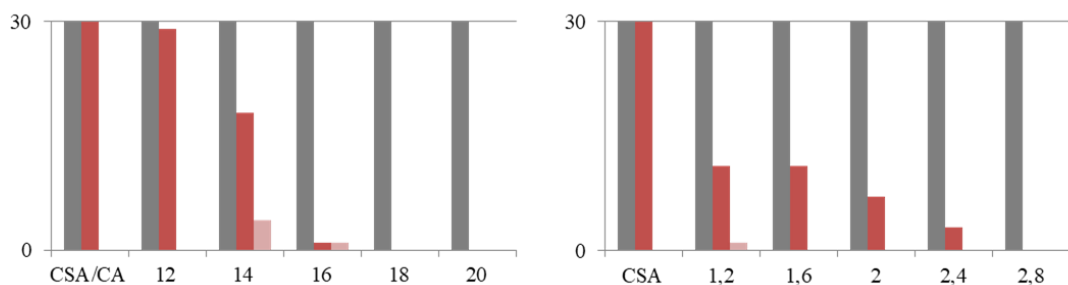
E. 13



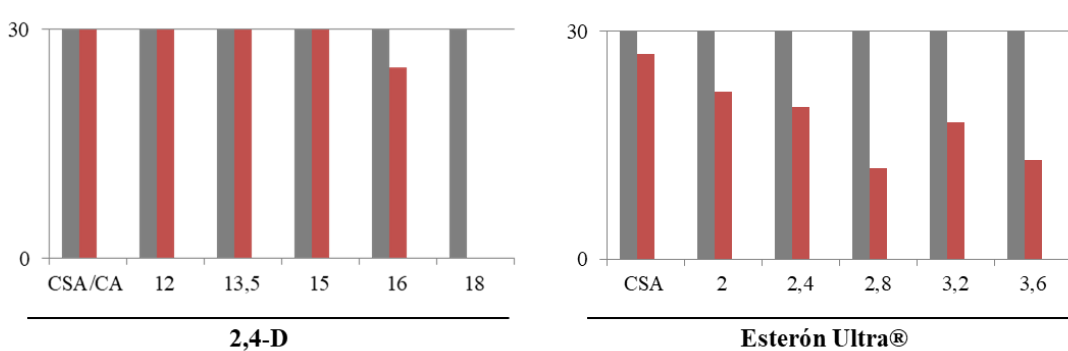
E. 17



E. 21



E. 25



2,4-D

Esterón Ultra®

Figura 23. Número de individuos de *Rhinella arenarum* sobrevivientes y malformados luego de la exposición por pulso de 24 h a Esterón Ultra® durante los E. 13 (placa neural), 17 (brote caudal), 21 (boca abierta) y 25 (opérculo completo), con respecto al número inicial. Ordenada: Número de individuos. Abscisa: Tratamientos. Los tratamientos se expresan en mg/l 2,4-D (i.a.) o Esterón Ultra®.

El análisis de la talla de los individuos sobrevivientes al finalizar los ensayos mostró diferencias significativas ($p < 0,01$) en la longitud total de los individuos del CSA y los en el E. 21 con 2,4-D ($F_{5,54} = 42,06$, $P = <0,0001$) y Esterón Ultra® ($F_{4,45} = 7,79$, $P = < 0,0001$). El análisis muestra que los tratados con 12 y 13 mg/l 2,4-D (i.a.) y los del CA y los tratados con 2,5 mg/l de Esterón Ultra®, alcanzaron menor talla que los del CSA (Figura 24).

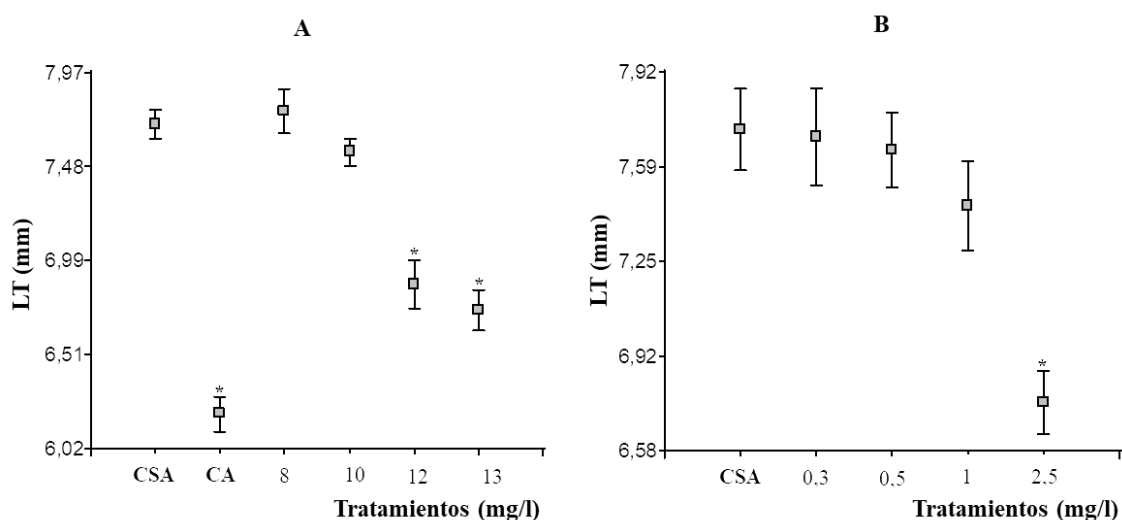


Figura 24. Comparación de la Longitud Total (LT) alcanzada por las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a 2,4-D (i.a.) (A) y Esterón Ultra® (B) en el E. 21 (boca abierta). Los asteriscos indican diferencias significativas con el CSA ($P < 0,01$). Los tratamientos se expresan en mg/l 2,4-D (A) y mg/l Esterón Ultra® (B).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A partir de los resultados obtenidos se ha podido caracterizar y comparar la toxicidad del herbicida 2,4-D en su forma pura y uno de sus formulados comerciales, Esterón Ultra®, sobre embriones y larvas de *Rhinella arenarum*.

La mayoría de los estudios sobre la toxicidad de este herbicida refieren principalmente a formulaciones comerciales (Nagy et al. 2020), y pocos estudios analizan a la toxicidad del ingrediente activo (Tabla 1). En este estudio se reportan las diferencias en cuanto a los efectos letales y teratogénicos del 2,4-D (i.a.) en comparación con los causados por la formulación comercial Esterón Ultra®. Asimismo, se ha podido demostrar la existencia de una sensibilidad estadio-dependiente.

Para el caso de la exposición continua a partir del E. 25, se obtuvo una CL 50 de 14,2 mg/l 2,4-D (i.a.) y de 2,6 mg/l Esterón Ultra®, lo que demuestra la mayor toxicidad de la formulación comercial. Según Lenkowski et al. (2010), concentraciones superiores a 70 mg/l 2,4-D (i.a.) resultaron muy tóxicas para *Xenopus laevis*, causando el 100 % de mortalidad. Este valor difiere significativamente de lo observado en *Rhinella arenarum*, para la cual 15 mg/l 2,4-D (i.a.) redujeron la sobrevivencia a cero, poniendo de manifiesto la alta susceptibilidad de esta especie.

Como se constata en la tabla 1, se registra un amplio rango de valores de CL 50 para distintas formulaciones comerciales y para distintas especies de anfibios. Estas diferencias podrían deberse a la susceptibilidad especie específica y/o a la composición de las formulaciones analizadas. Comparando los datos de CL50 reportados para larvas *Physalaemus albonotatus* (Curi et al. 2019) y *Lithobates catesbeianus* (Freitas et al. 2019, Viriato et al. 2021) con los resultados obtenidos en este trabajo podemos suponer que *Rhinella arenarum* es hasta 52 veces más sensible o que Esterón Ultra® resulta mucho más tóxico que otras formulaciones comerciales.

A diferencia de otros estudios, en este trabajo no se observaron alteraciones en la morfología de las larvas tratadas con 2,4-D (i.a.) o Esterón Ultra®. Curi et al. (2019) reportaron alteraciones como disminución en la pigmentación, anomalías intestinales, edema, alteración de la forma corporal y malformaciones del disco oral en larvas de *Physalaemus albonotatus* expuestas a partir del E. 25 a 2,4-D Amina Zamba® en el rango de concentraciones de 350 a 2400 mg/l. Freitas et al. (2019) informaron disminución de la talla y retraso en el desarrollo de larvas de *Lithobates catesbeianus*, *Leptodactylus fuscus* y *Physalaemus nattereri* expuestas a partir del E. 25 a DMA® 806 en un rango de entre 20 y 650 mg/l, y Viriato et al. (2021) reportaron alteraciones en las laminillas branquiales de larvas de *Lithobates catesbeianus* expuestas entre los E. 31 y 36 a concentraciones de entre 150 y 1200 mg/l este mismo formulado. Estas alteraciones podrían estar relacionadas con el tiempo de exposición a las formulaciones

del herbicida. Dichos autores evaluaron los efectos de la exposición crónica a los 34, 21 y 49 días respectivamente, mientras que en este estudio el tratamiento fue de seis días. Esto supone que los efectos subletales de este herbicida sobre estadios larvales podría manifestarse recién luego de una exposición crónica, lo que pone de manifiesto la importancia de evaluar diversos escenarios de exposición para tener una visión más integral de los mecanismos de toxicidad y efectos adversos de las sustancias tóxicas en general y en particular, de este herbicida. Sin embargo, para este caso analizado, no pueden establecerse comparaciones precisas, ya que dichos estudios analizan formulaciones diferentes de las cuales no se conoce la composición de los denominados compuestos adyuvantes que podrían ser determinantes en la toxicidad y manifestación de efectos adversos.

La exposición continua a 2,4-D (i.a.) y al formulado comercial Esterón Ultra® a partir de los primeros estadios del desarrollo provocó una importante disminución en la sobrevivencia a partir de concentraciones de 7,5 mg/l 2,4-D (i.a.) y de 3 mg/l Esterón Ultra®, evidenciándose también mayor embriotoxicidad del formulado comercial. Respecto a las malformaciones registradas, es importante destacar que el número de individuos malformados respecto del total de sobrevivientes y el tipo de malformaciones registradas fue similar en todas las concentraciones de 2,4-D (i.a.) analizadas, así como también en el CSA y CA, por lo que no pueden ser interpretadas como consecuencia directa de la exposición al tóxico.

En el caso del CSA, dichas malformaciones se corresponderían con malformaciones espontáneas que son muy difícil de registrar al momento de la selección del material biológico (E. 3) y que normalmente ocurren en los procedimientos de fertilización *in vitro* y cuyo porcentaje se encuentra dentro del valor de aceptación del test AMPHITOX (Herkovits y Perez-Coll 1999). Para el caso del CA, estos valores superan el porcentaje de aceptación por lo que las malformaciones registradas podrían ser consecuencia del solvente utilizado y probablemente explicaría también, por un efecto sinérgico, las malformaciones observadas en los tratamientos con 2,4-D (i.a.). Los solventes son comúnmente utilizados en estudios de toxicidad para facilitar la disolución de compuestos hidrófobos, sin embargo, estos pueden tener efectos sinérgicos o antagonistas que pueden conducir a una sobreestimación o subestimación de los efectos tóxicos del compuesto estudiado (Green y Wheeler, 2013). Young et al. (2020) observaron anomalías oculares y craneales y subdesarrollo de la cola en

embriones de *Lithobates pipiens* expuestos a acetona, por lo que no recomiendan el uso de concentraciones \geq a 10 mg/l. Asimismo, plantean que las interacciones del solvente con el compuesto pueden variar dependiendo de las especies y del estadio del desarrollo. Por otra parte, Lenkowski et al. (2010) observaron malformaciones y edemas intestinales leves en larvas tratadas con concentraciones de 60 y 70 mg/l de 2,4-D, desde etapas tempranas de la organogénesis, por lo que plantean que este herbicida produce malformaciones poco severas. A este respecto, es necesario contar con un diseño experimental que permita analizar la toxicidad intrínseca del 2,4-D (i.a.) y desestimar un efecto sinérgico del solvente utilizado.

Con respecto al formulado comercial, Esterón Ultra®, el porcentaje de malformaciones registradas con concentraciones de hasta 2 mg/l no se diferenció del registrado para el CSA y se podrían asimilar con malformaciones espontáneas. Sin embargo, concentraciones de 3 y 4 mg/l del formulado redujeron significativamente la sobrevivencia y el 100 % de los sobrevivientes presentó malformaciones severas, lo que permite inferir que para estas concentraciones las malformaciones se deben a la acción teratogénica del formulado. En los embriones expuestos a estas concentraciones, se observaron anomalías morfológicas desde las primeras horas de ensayo registrándose alteraciones en procesos clave del desarrollo como la gastrulación, neurulación u organogénesis temprana que provocaron el detenimiento del desarrollo en la mayoría de los individuos expuestos y severas malformaciones en los sobrevivientes. Estas consistieron en severa hidropesía con malformación o agenesia de órganos internos, presencia de plaquetas vitelinas, microcefalia con malformación o agenesia de estructuras cefálicas como ojos, disco oral, papilas adhesivas, branquias externas, subdesarrollo de la cola y aleta caudal e incurvaciones severas. Este tipo de malformaciones son notablemente más severas que las descritas por Morgan et al. (1996) y han sido reportadas por Aronzon et al. (2011).

En base a estos resultados, la exposición al formulado Esterón Ultra® implica un riesgo para embriones y larvas de *Rhinella arenarum* no solo por su efecto letal sino también por la severidad de las malformaciones que provoca. Estas comprometen sus capacidades de completar el crecimiento, desarrollo y metamorfosis normal a la vez que limitan sus recursos para obtener alimento y/o escapar de depredadores, disminuyendo así sus posibilidades de sobrevivencia en el ambiente natural. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la talla de las larvas expuestas a 2,4-D (i.a.) al

finalizar el ensayo. Sin embargo se observaron diferencias en la talla de las larvas expuestas al formulado comercial siendo la LT de los individuos tratados con 4 mg/l, 1,5 veces menor que la de los controles. Esta menor talla registrada se corresponde con individuos severamente malformados.

El análisis de la sensibilidad estadio-dependiente a partir de la exposición por pulso permitió identificar que el E. 11 (gástrula media) fue el más sensible al efecto letal del 2,4-D (i.a.) con una CL50 de 5,9 mg/l, mientras que el E. 21 (boca abierta) fue el más sensible al efecto letal del formulado comercial con una CL50 de 1,1 mg/l. Para todos los estadios analizados el formulado comercial fue varias veces más tóxico que el ingrediente activo. La figura 16 permite determinar la variabilidad en la sensibilidad siendo los estadios larvales más resistentes al efecto letal del ingrediente activo. Para el caso del formulado comercial, si bien se observaron diferencias en la CL 50 calculada, en general los estadios embrionarios y larvales tempranos fueron altamente susceptibles a concentraciones superiores a 5 y 2,5 mg/l, respectivamente, indicando la mayor susceptibilidad de estos últimos. En comparación con el tratamiento continuo, a partir del E. 3 y el E. 25, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las CLs 50 calculadas para 2,4-D (i.a.) ni para Esterón Ultra®. Esto permitiría afirmar que dichos compuestos tienen un efecto letal agudo que se manifiesta dentro de las primeras horas de exposición, y por lo tanto, no se revierte en el caso de la eliminación o degradación del compuesto.

En referencia a las malformaciones, comparando lo registrado en el tratamiento continuo y en el de exposición por pulso de 24 h a 2,4-D (i.a.) y Esterón Ultra®, a partir del E.3, se observan similitudes en la proporción de individuos malformados a concentraciones comparables. Para el caso del 2,4-D (i.a.), como se ha mencionado previamente, dichos valores no se diferenciaron de las malformaciones registradas en el CA y podrían ser consecuencia de la embriotoxicidad del solvente. En referencia al formulado comercial, concentraciones de 3 mg/l y superiores fueron altamente embriotóxicas y críticas para el desarrollo normal de los embriones, tanto para el tratamiento continuo como para la exposición por pulso de 24 h, afectando particularmente los eventos tempranos del desarrollo. En los estadios de exposición por pulso subsiguientes (E. 11 - E.21), se observó que la proporción de individuos severamente malformados disminuyó significativamente y no se observaron

malformaciones en los expuestos en el E. 25, incluso para el tratamiento de exposición continua.

Varios estudios han demostrado los efectos citotóxicos del 2,4-D. Suwalsky et al. (1996) demostraron que el 2,4-D tiene la capacidad para perturbar la estructura bicapa de fosfolípidos, cuya integridad es esencial para que no se alteren las funciones de la membrana celular. Venkov et al. (2000) demostraron la citotoxicidad, mutagenicidad y disminución de la actividad mitótica por efecto del 2,4-D, en cultivos celulares. Por otra parte, Mustonen et al. (1986) compararon los efectos del 2,4-D en su estado puro y los de un formulado comercial, en cultivos de linfocitos humanos y encontraron que, si bien el producto comercial provocó aberraciones cromosómicas, el ingrediente activo no produjo daños. Estos autores atribuyeron esta diferencia a la presencia de impurezas en el formulado. Finalmente, Charles et al. (2001) también demostraron que el 2,4-D en estado puro no tenía efectos teratogénicos sobre ratas y ratones.

Los resultados de este trabajo no son concluyentes acerca de la capacidad teratogénica del 2,4-D en su estado puro, la cual estaría asociada al vehículo utilizado en los test. Sin embargo, queda demostrada la capacidad teratogénica del Esterón Ultra® la cual, como plantean otros autores, estaría asociada a la presencia de adyuvantes presentes en la formulación.

CAPÍTULO III - METALES PESADOS



Generalidades de los metales pesados

El ciclo global de los metales se mantiene por la erosión de las rocas y las erupciones volcánicas en un flujo balanceado entre la atmósfera, la hidrósfera, la litosfera y la biosfera (Figura 1). La abundancia natural local o regional de los metales varía considerablemente en función del tipo de metal y las características geo-hidroquímicas del ambiente (Linder y Grillitsch 2000).

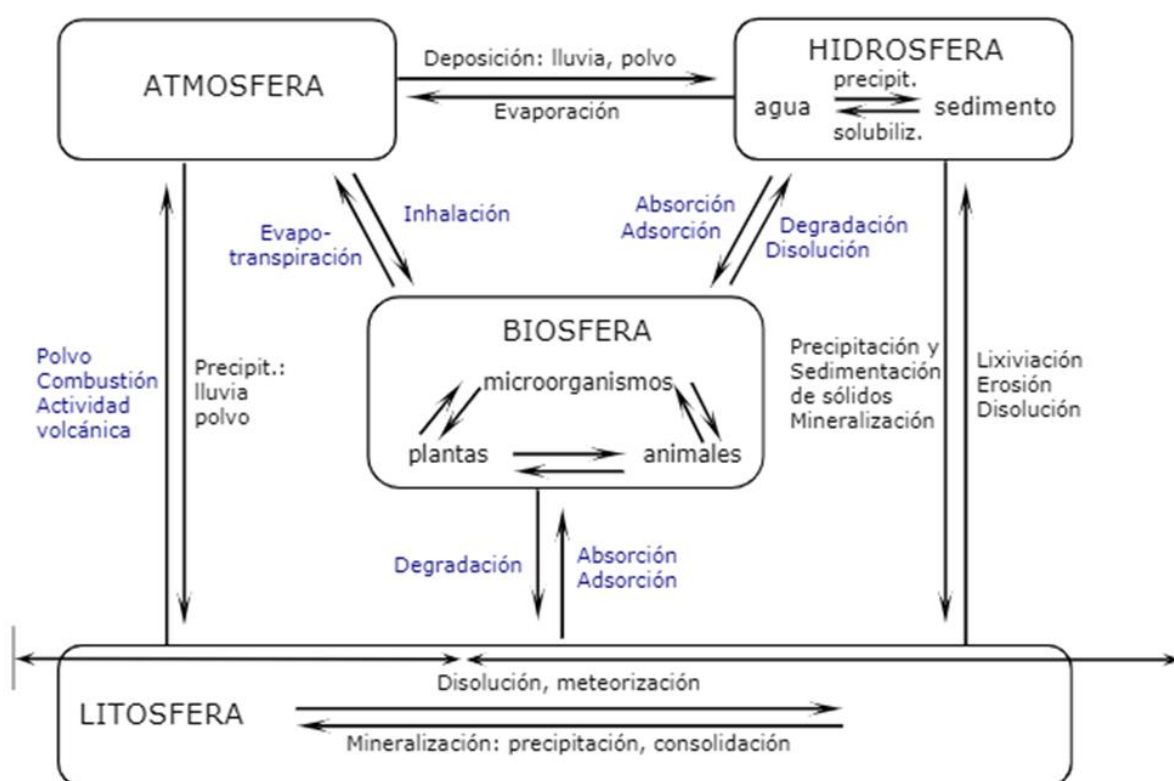


Figura 1. Ciclo biogeoquímico general de los metales pesados. Extraído de: Rodríguez (2005).

Metales y no-metales son esenciales para la vida y están involucrados en procesos metabólicos como el funcionamiento de una gran diversidad de enzimas. Algunos ejemplos de estos elementos incluyen hierro, cobalto, cobre, manganeso, molibdeno y zinc. Los iones metálicos juegan un papel fundamental en los organismos vivos en la activación de enzimas y estabilización de factores de transcripción de dedos de Zn (II) (Cuillel 2009).

Los metales, por encima de un determinado umbral, alteran todos los niveles de organización biológica: molecular, celular, organismos y biocenosis. El riesgo que supone de la presencia de metales pesados en el ambiente depende de las condiciones de exposición y de las condiciones propias del sistema biológico, como capacidad regulatoria y susceptibilidad. Los metales pueden ser activos en su forma elemental o en combinaciones con compuestos orgánicos o inorgánicos y esto determina en última instancia su interacción con ligandos biológicos y su toxicidad (Linder y Grillitsch 2000). Diversas actividades industriales y ciertos procesos naturales son responsables de su alta concentración en el ambiente. En los últimos años, las altas concentraciones de metales pesados en la atmósfera, la litósfera, la pedosfera, la hidrosfera y la biosfera, se han convertido en un problema mundial (Rahman y Singh 2019).

Los denominados “metales pesados” se definen como metales naturales que tienen un número atómico superior a 20 y una densidad elemental superior a 5 g/cm^3 . Son contaminantes ambientales debido a su toxicidad, persistencia en el ambiente y capacidad de bioacumulación. Sus fuentes naturales incluyen la meteorización de las rocas que contienen metales y las erupciones volcánicas, mientras que las fuentes antropogénicas incluyen la minería y diversas actividades industriales y agrícolas. La minería y el procesamiento industrial para la extracción de recursos minerales y sus posteriores aplicaciones para el desarrollo industrial, agrícola y económico han llevado a un aumento en la movilización de estos elementos en el medio ambiente y la alteración de sus ciclos biogeoquímicos (Ali et al. 2019). Además, la inadecuada disposición de residuos metálicos también ha ocasionado la contaminación del suelo, agua superficial y subterránea. Tanto las fuentes naturales como antropogénicas pueden contribuir a la emisión de elementos metálicos a la atmósfera. Sin embargo, en el plano regional las fuentes antropogénicas pueden contribuir de manera significativa y convertirse en contaminantes a escala local (Ali et al. 2019).

La contaminación de los ecosistemas acuáticos y terrestres, con metales pesados tóxicos, es un problema ambiental de interés para la salud pública. Los metales pesados se consideran peligrosos debido a tres características: persistencia, bioacumulación y toxicidad. Dado que son persistentes en el ambiente, se acumulan en los organismos vivos y se transfieren a través de distintos niveles tróficos de las cadenas alimentarias (Figura 2). La acumulación de metales pesados en la biota depende de su tasa de acumulación y su tasa de eliminación del organismo pudiendo ingresar al mismo

directamente del ambiente abiótico, agua, sedimentos o suelo, o a partir del alimento. La acumulación de metales pesados tóxicos en la biota genera una amenaza para la salud de sus consumidores, incluidos los humanos (Ali et al. 2019).

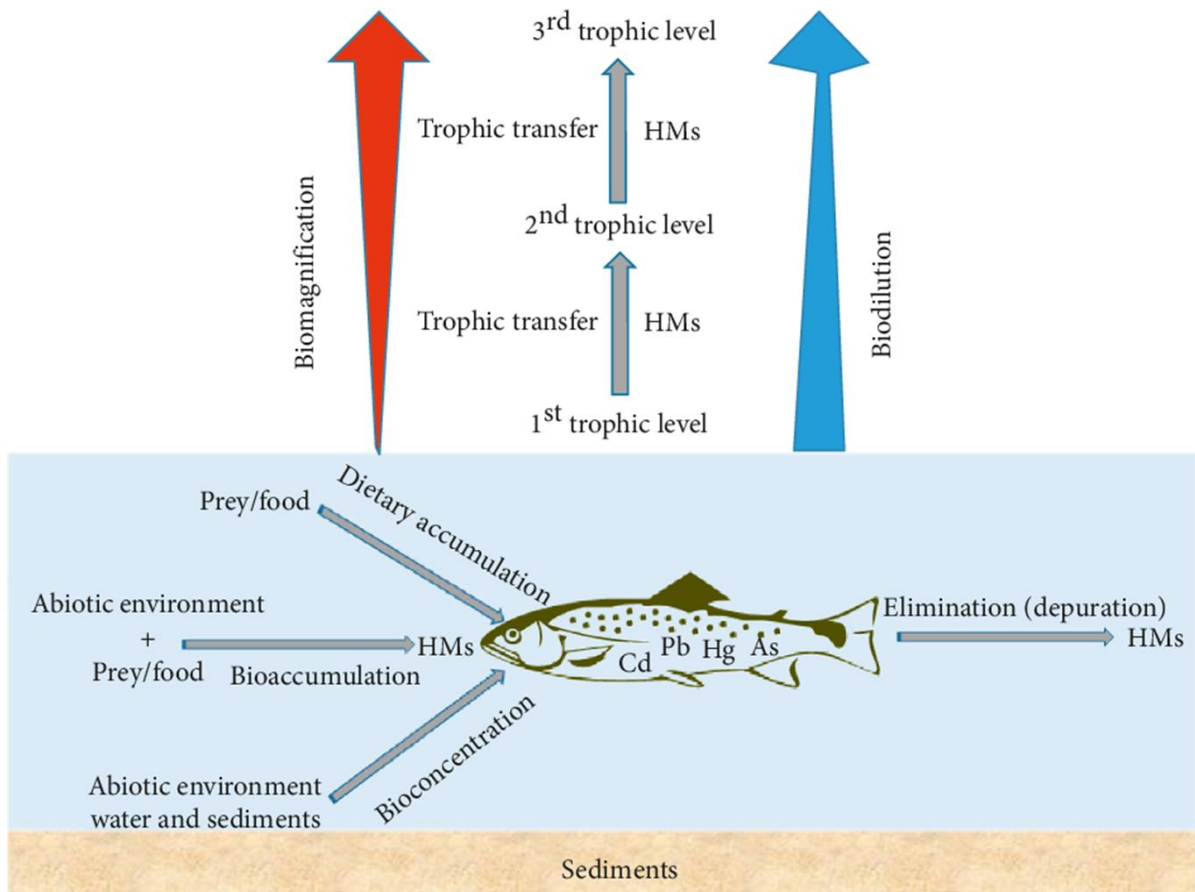


Figura 2: Términos y conceptos de la dinámica trófica de los metales pesados. Extraído de: Ali y Khan (2019).

Los metales pesados y metaloides más peligrosos desde el punto de vista ambiental incluyen: arsénico (As), cadmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr), mercurio (Hg), níquel (Ni), plomo (Pb) y zinc (Zn) (Tchounwou et al. 2012). Muchos de estos metales tienen la capacidad de acumularse en la biota y componentes abióticos de los ecosistemas y su transferencia trófica en las redes alimentarias acuáticas y terrestres tiene implicancias para la vida silvestre y la salud humana. Los anfibios ocupan frecuentemente zonas de transición entre hábitats terrestres y acuáticos y, consecuentemente, sus condiciones de exposición cambian sustancialmente a través de su historia de vida. Particularmente, las fases acuáticas, estadios embrionarios y

larvales, están expuestas a una incorporación directa a través del agua especialmente porque los metales tienen alta solubilidad en agua (Linder y Grillitsch 2000).

Los efectos tóxicos de los metales pesados son causados por la unión no específica de los iones metálicos con macromoléculas biológicamente activas alterando sus funciones. La incorporación de metales induce la síntesis de proteínas específicas ligadoras de metales (metaloproteínas) que se unen a los iones reactivos del metal secuestrándolo en una forma inactiva y evitando sus efectos nocivos (Finkelstein 2009).

SECCIÓN I - COBRE

INTRODUCCIÓN

El cobre es un oligoelemento que se encuentra en una variedad de rocas y minerales. Es uno de los micronutrientes esenciales, y es necesario para numerosos procesos metabólicos tanto en procariotas como en eucariotas. El Cu funciona como cofactor, siendo necesario para la adquisición de propiedades catalíticas de una variedad de enzimas importantes, como el citocromo c oxidasa, la tirosinasa, la p-hidroxifenil piruvato hidrolasa, la dopamina beta hidroxilasa, la lisil oxidasa y la superoxidasa dismutasa de Cu-Zn (Cu, Zn-SOD). Estas enzimas están involucradas en una serie de procesos biológicos necesarios para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento del organismo (Gaetke y Chow 2003). Asimismo, por su potencial redox es utilizado por numerosas enzimas en muchos procesos metabólicos (Grosell 2011). Por ejemplo, se requiere para las funciones celulares como la respiración, la protección contra el estrés oxidativo, la formación de pigmentos, la biosíntesis de neurotransmisores, la péptido amidación, transporte de hierro, y maduración del tejido conectivo (Peña et al. 1999). Se conocen al menos treinta enzimas que contienen Cu, todas las cuales funcionan como catalizadores redox (p. ej., citocromo oxidasa, nitrato reductasa) o portadores de oxígeno (p. ej., hemocianina) (Linder y Hazegh-Azam 1996).

La homeostasis del cobre está coordinada por varias proteínas para asegurar que sea entregado a compartimentos subcelulares específicos y proteínas que requieren cobre sin liberar iones de cobre que puedan causar daño a los componentes celulares (Peña et al. 1999). Sin embargo, aunque es un elemento esencial, a niveles elevados, el Cu se vuelve tóxico. Su potencial redox también genera especies reactivas de oxígeno (ROS) cuando la célula posee elevadas concentraciones de cobre. El exceso de cobre induce no solo estrés oxidativo, sino también daño en el ADN y reducción de la proliferación celular (Royer y Sharman 2021). Esta esencialidad y toxicidad del cobre es regulada por un complejo sistema de control homeostático. Esta oposición entre "absolutamente requerido" y "altamente tóxico" se balancea por la presencia de una serie de pequeñas proteínas que se unen a los iones Cu(I) que permiten su almacenamiento y transporte a través de compartimentos celulares como complejos estables y no tóxicos (Cuillel 2009).

El cobre es un metal de transición con tres estados de oxidación: 0 (Cu^0 , metal sólido); +1 (Cu(I) , ion cuproso); y +2 (Cu(II) , ion cúprico). El Cu(I) libre es uno de los oligoelementos más tóxicos ya que genera el radical hidroxilo altamente reactivo que reacciona instantáneamente con todos los componentes celulares, azúcares, proteínas, lípidos de membrana y ácidos nucleicos, inhibiendo la maquinaria celular. Además, el cobre puede manifestar su toxicidad al desplazar otros iones metálicos en moléculas estructurales o catalíticas. Por ejemplo, la sustitución de Zn^{2+} por Cu^{2+} en el dominio dedo de zinc del ADN del receptor de estrógeno humano, inactiva totalmente el receptor (Cuillel 2009). Este metal se absorbe a través del epitelio intestinal hacia la circulación sanguínea, donde se une a la albúmina, la transcupreína o la histidina y forma un compuesto intercambiable reserva de Cu(II) . Una vez eliminado de la circulación, el cobre entra al hígado donde es metabolizado y excretado en la bilis (Cuillel 2009). Presenta poca tendencia a la bioconcentración en organismo acuáticos, excepto para moluscos filtradores donde se han detectados altos valores de bioconcentración. La mayoría de los estudios prueban que el cobre no está sujeto a biomagnificación en la cadena trófica (Moreno Grau 2003). Para estar disponible para los sistemas biológicos, el Cu debe estar presente en una forma fácilmente soluble. Su biodisponibilidad depende de la forma que toma el metal (iónico, complejoado, o precipitado) en función de factores ambientales como el pH, el potencial redox (Eh), tipo de suelo y sedimento, dureza del agua y contenido orgánico. Estos factores varían en el ambiente, dando lugar a posibles condiciones de deficiencia de Cu o toxicidad (Fleming y Trevors 1989).

Los niveles de Cu presentes en el ambiente han ido en aumento como resultado de actividades humanas como: fundiciones, minería, industria metalúrgica y emisión de residuos domésticos. Las fuentes industriales de cobre incluyen: producción de madera, producción de hierro y acero, incineración de desechos, aplicaciones industriales, combustión de carbón, minería de metales no ferrosos, combustión de petróleo y gasolina y fabricación de fertilizantes de fosfato (Willis y Bishop 2016). El cobre forma compuestos inestables en los que se encuentra más frecuentemente en el estado de oxidación +2, como el sulfato de cobre que fue uno de los primeros compuestos utilizado como pesticida. Las sales de cobre poseen efectos fungicidas y alguicidas y es utilizado también como herbicida en la agricultura, por lo puede representar un riesgo para organismos no blanco (IPCS 1998, Herkovits y Helguero 1998). La mayoría de las sales cúpricas se disuelven fácilmente en agua para dar el catión cúprico libre (Cu^{2+}). El

Cu(II) es un fuerte agente complejante y en forma catiónica libre tiene una gran tendencia hacia la hidrólisis. En el ambiente, el Cu se particiona en tres fases: acuosa (complejos iónicos y solubles libres); sólida (partículas, coloides, suelos y sedimentos) y biológica (adsorbidos e incorporados) (Fleming y Trevors 1989).

Las concentraciones de cobre en aguas naturales varían entre 2 y 30 $\mu\text{g/l}$, aunque se ha informado que ciertas actividades humanas pueden aumentar estas concentraciones a 200 $\mu\text{g/l}$, en cuerpos de agua cercanos a sitios industriales como las minas (Grosell 2011). Debe destacarse que concentraciones de 1-2 $\mu\text{g/l}$ de Cu pueden tener efectos adversos sobre la biota acuática (IPCS 1998). La tabla 1 muestra valores de CL50 para distintas especies de anuros, tanto para estadios embrionarios como larvales, expuestos a distintos compuestos de cobre.

El cloruro de cobre se utiliza en la industria del petróleo, los textiles, la metalurgia, la fotografía y los productos agrícolas, y como aditivo para piensos y conservante de la madera. También se usa en la fabricación de papel fotosensible, pigmentos para vidrio y cerámica, y en la fabricación de acrilonitrilo. Se encuentra clasificada como Sustancia Extremadamente Peligrosa (EPA) debido a su capacidad corrosiva (New Jersey Department of Health and Senior Services 2007). En este contexto, el presente trabajo tuvo como propósito evaluar los efectos letales y teratogénicos del cobre durante el desarrollo embrionario-larval de *Rhinella arenarum* y analizar la susceptibilidad estadio-dependiente.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Analizar comparativamente la toxicidad del cobre durante el desarrollo embrionario y larval temprano de *Rhinella arenarum*.
- 2) Evaluar la susceptibilidad estadio-dependiente e identificar los estadios embrionarios y/o larvales más sensibles.
- 3) Evaluar los efectos letales y subletales como alteraciones del comportamiento, alteraciones morfológicas (teratogénesis), retraso en el desarrollo y alteraciones del crecimiento de los embriones y larvas por exposición a cobre.

Tabla 1. Valores de CL50 de cobre para embriones y larvas de distintas especies de anuros. Datos obtenidos de: ECOTOX (Ecotoxicology Knowledgebase).

ESPECIE	COMPUESTO	ESTADIO	CL 50 (µg/l)	REFERENCIA
<i>Anaxyrus boreas</i>	Sulfato de cobre	Larvas	120	Dwyer et al. (2005)
<i>Duttaphrynus melanostictus</i>	Sulfato de cobre	Larvas	320	Shuhaimi-Othman et al. (2012)
<i>Epidalea calamita</i>	Sulfato de cobre	Embriones	80-220	García-Muñoz et al. (2009)
<i>Epidalea calamita</i>	Sulfato de cobre	Larvas	110	García-Muñoz et al. (2009)
<i>Euphlyctis hexadactylus</i>	Sulfato de cobre	Larvas	390-450	Khangarot et al. (1985)
<i>Gastrophryne carolinensis</i>	Cobre	Larvas	40	Flynn et al. (2015)
<i>Hyla chrysoscelis</i>	Sulfato de cobre	Larvas	44,7	Brown et al. (2012)
<i>Leptodactylus latrans</i>	Cobre	Larvas	606	Araújo et al. (2014)
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Cobre	Larvas	372	Araújo et al. (2014)
<i>Lithobates clamitans</i>	Sulfato de cobre	Larvas	162,6	Brown et al., (2012)
<i>Lithobates pipiens</i>	Cobre	Larvas	670	Redick y La Point (2004)
<i>Pelophylax perezii</i>	Cobre	Larvas	487	Araújo et al. (2014)
<i>Pelophylax perezii</i>	Sulfato de cobre	Larvas	970	Santos et al. (2013)
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Hidroxiclorigenato de cobre	Larvas	2400-4300	Ferreira et al. (2004)
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Sulfato de cobre	Larvas	3960	Ossana et al. (2010)
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Hidroxiclorigenato de cobre	Larvas	2800	Lombardi et al. (2002)
<i>Rhinella granulosa</i>	Cloruro de cobre	Larvas	23,5	Franco-de-Sá y Val (2014)
<i>Scinax ruber</i>	Cloruro de cobre	Larvas	36,4	Franco-de-Sá y Val (2014)
<i>Scinax ruber</i>	Cloruro de cobre	Embriones	50	Franco-de-Sá y Val (2014)
<i>Rhinella arenarum</i>	Cloruro de cobre	Embriones	50-120	Pérez-Coll y Herkovits (2006)
<i>Rhinella arenarum</i>	Cloruro de cobre	Embriones	50	Herkovits y Pérez-Coll (2007)
<i>Rhinella arenarum</i>	Cloruro de cobre	Larvas	19,5	Aronzon et al. (2011)
<i>Rhinella arenarum</i>	Cloruro de cobre	Blástula	137	Aronzon et al. (2011)
<i>Rhinella arenarum</i>	Cloruro de cobre	Larvas	85	Herkovits y Helguero (1998)
<i>Xenopus laevis</i>	Cloruro de cobre	Embriones	2900	Luo et al. (1993)
<i>Xenopus laevis</i>	Cloruro de cobre	Larvas	900-2400	Martini et al. (2012)
<i>Xenopus laevis</i>	Cobre	Embriones	400	Fort et al. (2004)
<i>Xenopus laevis</i>	Sulfato de cobre	Embriones	600-3900	Hamilton (2003)
<i>Xenopus tropicalis</i>	Cobre	Embriones	300	Fort et al. (2004)

METODOLOGÍA

Metodología empleada para los estudios con cobre

Se preparó una solución madre de 1,5 g Cu^{2+} , a partir de Cu(II) cloruro dihidrato ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (pureza 99 %, lote 11570; Riedel-de Haën) disuelto en agua destilada. A partir de esta solución, se prepararon las distintas soluciones de ensayo en Solución AMPHITOX. Las soluciones experimentales de Cu fueron medidas cuatro veces con espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer. El error entre la

concentración nominal y las concentraciones no superó el 5%. Las concentraciones de ensayo estuvieron comprendidas entre 3 y 375 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$.

Se realizaron los siguientes bioensayos:

- 1) Test AMPHISHORT. Ensayo crónico corto semiestático de 168 h de exposición a Cu^{2+} de larvas de *Rhinella arenarum* a partir del E. 25 (opérculo completo). Concentraciones de ensayo: 7,5; 11,5; 15; 22,5; 30, 37,5 y 45 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$, más CSA. Renovación del medio cada 48 h.
- 2) Test AMPHIEMB. Ensayo semiestático con embriones de *Rhinella arenarum* a partir del E. 4 (4 blastómeros) y hasta alcanzar el E. 25. Concentraciones de ensayo: 3,7; 7,5; 15; 45; 105; 180 y 300 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$, más CSA. Renovación del medio cada 48 h.
- 3) Test de EXPOSICIÓN POR PULSO. Ensayo de exposición durante 24 h y posterior cambio a SA en diferentes estadios del desarrollo embrionario y larval. Estadios del desarrollo evaluados: E. 4 (4 blastómeros), E. 11 (gástrula media), E. 14 (surco neural), E. 17 (brote caudal), E. 18 (actividad neuromuscular), E. 20 (circulación branquial), E. 21 (boca abierta), E. 23 (inicio pliegue opercular), E. 24 (pliegue opercular derecho) y E. 25 (opérculo completo). Rango de concentraciones de ensayo: 3 a 375 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$, más CSA.

Puntos finales

Los parámetros de toxicidad evaluados fueron: letalidad y efectos subletales (alteraciones del comportamiento, alteraciones morfológicas (teratogénesis), retraso en el desarrollo y alteraciones del crecimiento)

RESULTADOS

1) Test AMPHISHORT. Exposición crónica corta de larvas en E. 25 (opérculo completo) a Cu^{2+}

Letalidad

Al igual que en el CSA, no se observó mortalidad de las larvas expuestas a la concentración de 7,5 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$. En concentraciones superiores el efecto letal se

manifestó dentro de las primeras horas de ensayo, variando levemente en las horas subsiguientes. En las expuestas a 11,2, 15 y 22,5 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$, la mortalidad fue del 17,3 y 87 %, respectivamente, mientras que las tratadas con 30, 37,5 y 45 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ exhibieron el 100 % de mortalidad dentro de las primeras 48 h de exposición. La figura 1 muestra las curvas de sobrevivencia de las larvas expuestas a Cu^{2+} . Las CLs 10, 50 y 90, con sus correspondientes límites de confianza (95 %), calculadas a las 168 h de ensayo fueron: 10,5 (9,1-12,7), 16,7 (14,1-19,8) y 26 (21,9 -30,8) $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$, respectivamente.

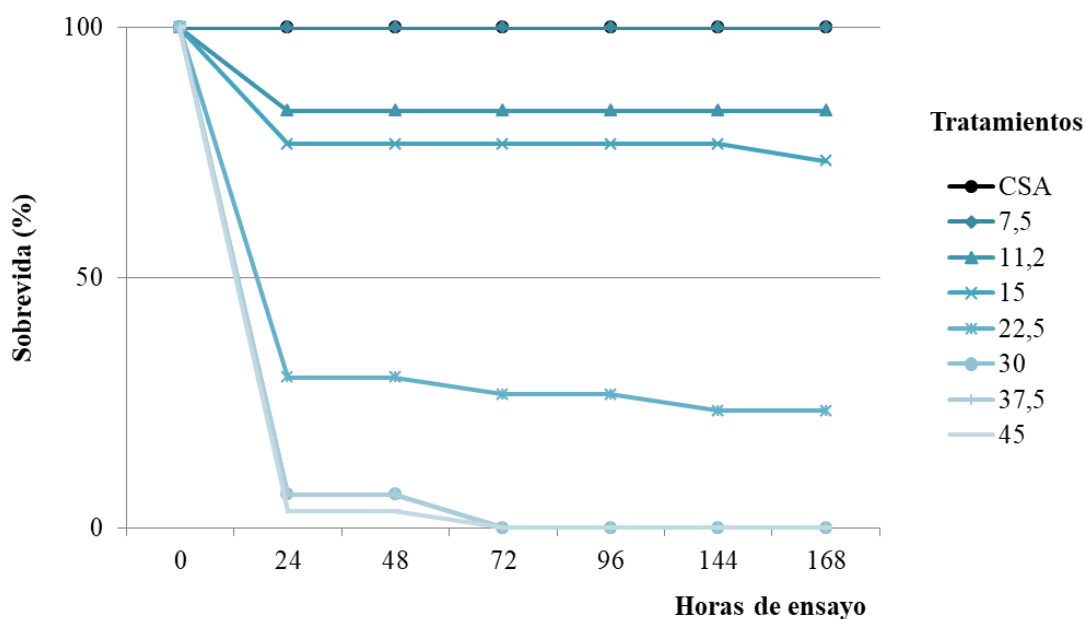


Figura 1. Curvas de sobrevivencia de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en E 25 (opérculo completo) a Cu^{2+} durante 168 h. Obsérvese el efecto letal dentro de las primeras horas de ensayo. Los tratamientos se expresan en $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$.

Alteraciones de la morfología y el crecimiento

Al finalizar el ensayo, las larvas tratadas con concentraciones de hasta 30 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ no mostraron alteraciones morfológicas en su anatomía externa, al igual que los controles. Las larvas sobrevivientes tratadas con 37,5 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$, presentaron hidropesía leve, escaso desarrollo de la aleta caudal, incurvaciones en el eje (Figura 2) y en algunos casos ausencia de papilas bucales.



Figura 2. Alteraciones morfológicas de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a cobre a partir del E. 25 (opérculo completo). a) Vista ventral, b) Vista dorsal, c, d) Vista lateral derecha. Obsérvese el escaso desarrollo de la aleta caudal. Escala: 1 mm.

El análisis de la varianza mostró diferencias significativas ($F_{(6,61)} = 8,95$, $P = <0,0001$) en la talla de los individuos tratados con 37,5 µg Cu²⁺/l con respecto al CSA y a los restantes tratamientos (figura 3).

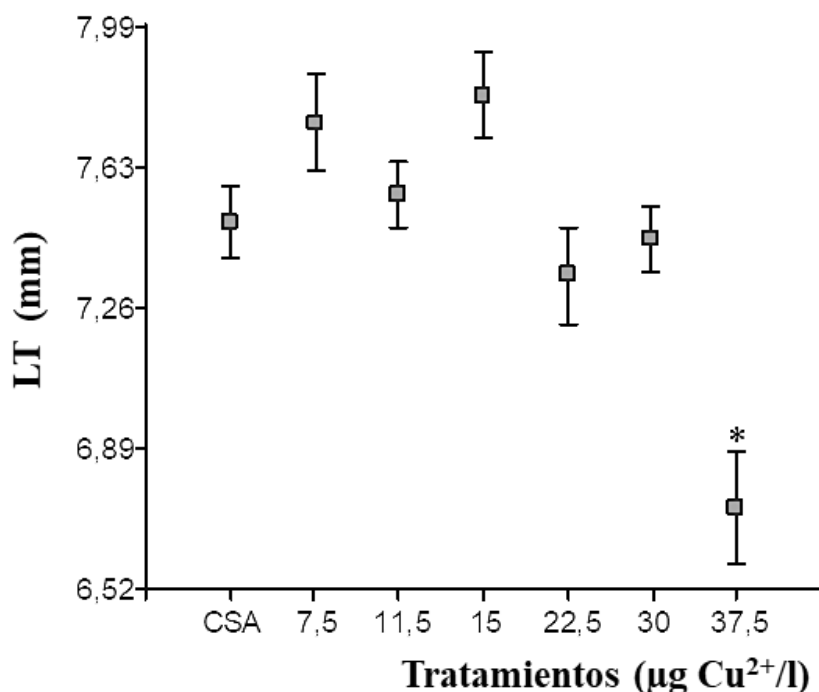


Figura 3. Comparación de la Longitud Total (LT) alcanzada por las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a Cu^{2+} a partir del E. 25 (opérculo completo). El asterisco indica diferencia significativa con el CSA ($p < 0,01$).

2) Test AMPHIEMB. Exposición a partir del E. 4 (4 blastómeros) a Cu^{2+}

Letalidad

La figura 4 muestra la curva de sobrevivencia de los embriones expuestos a Cu^{2+} a partir del E. 4 hasta las 168 h de ensayo. La gráfica muestra un importante descenso en la sobrevivencia luego de las primeras horas de ensayo para las concentraciones más altas, registrándose a las 96 h, el 53 y 93 % de letalidad para los embriones expuestos a 45 y 105 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$, respectivamente. Concentraciones de 180 y 300 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$, produjeron el 100 % de mortalidad dentro de las 24 horas de exposición. La mortalidad en concentraciones de 3,7, 7,5 y 15 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ no superó el 15 %, no diferenciándose significativamente del CSA. La sobrevivencia en el CSA fue del 100 %. Las CLs 10, 50 y 90 estimadas a las 168 h de ensayo fueron: 5,4 (3,6-8,2); 17,2 (11,3-26,1) y 154 (36-182,5) $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$, respectivamente.

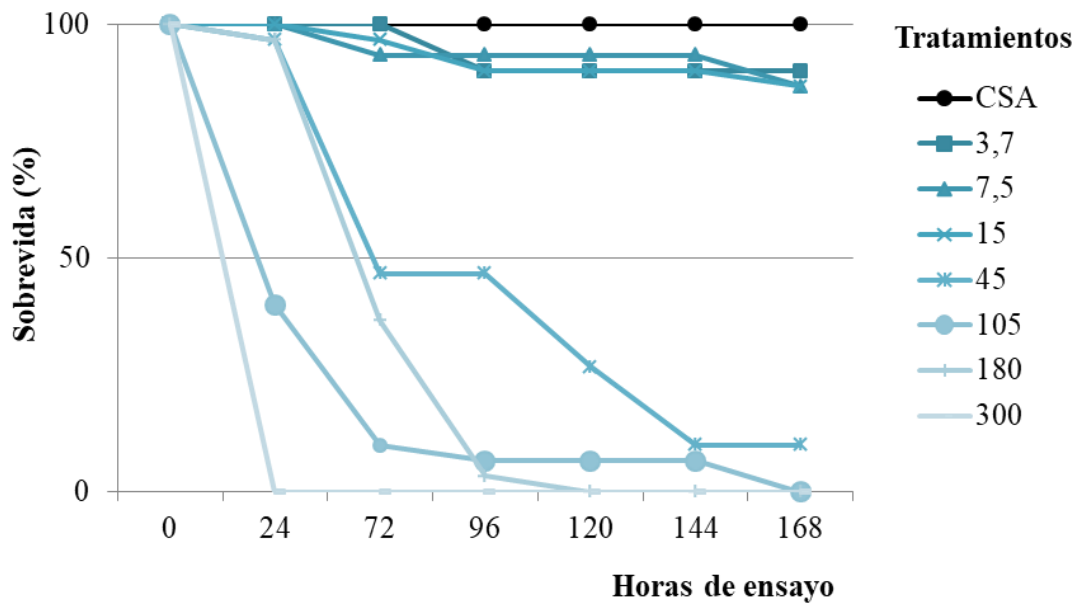


Figura 4. Curvas de sobrevivida de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a partir de E. 4 (4 blastómeros) a Cu^{2+} durante 168 h. Obsérvese el efecto letal dentro de las primeras horas de ensayo. Los tratamientos se expresan en $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$.

Alteraciones de la morfología y el crecimiento

Los embriones tratados con Cu^{2+} exhibieron alteraciones del desarrollo desde las primeras horas de exposición. A las 24 horas de exposición los embriones tratados con concentraciones de hasta $15 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ no se diferenciaron de los embriones del CSA y alcanzaron el E. 12 (gástrula avanzada). Los expuestos a concentraciones de $180 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ y superiores detuvieron su desarrollo en el estadio de blástula tardía o gástrula inicial, mostrando signos de disociación celular y exudación de plaquetas vitelinas hacia el espacio perivitelino. A las 48 horas de ensayo los individuos del CSA alcanzaron el E. 17 (brote caudal) al igual que los tratados con cobre hasta $15 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$, aunque alrededor del 30 % de estos últimos presentaron anomalías morfológicas de las cuales la más frecuente fue ensanchamiento de la región abdominal y la presencia de plaquetas vitelinas (Figura 5).

A las 168 h de ensayo alrededor del 85 % los embriones del CSA completaron el cierre del pliegue opercular en el flanco derecho, alcanzando el estadio 24, mientras que aproximadamente el 80 % de los tratados con $15 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ no superaron el estadio 23.

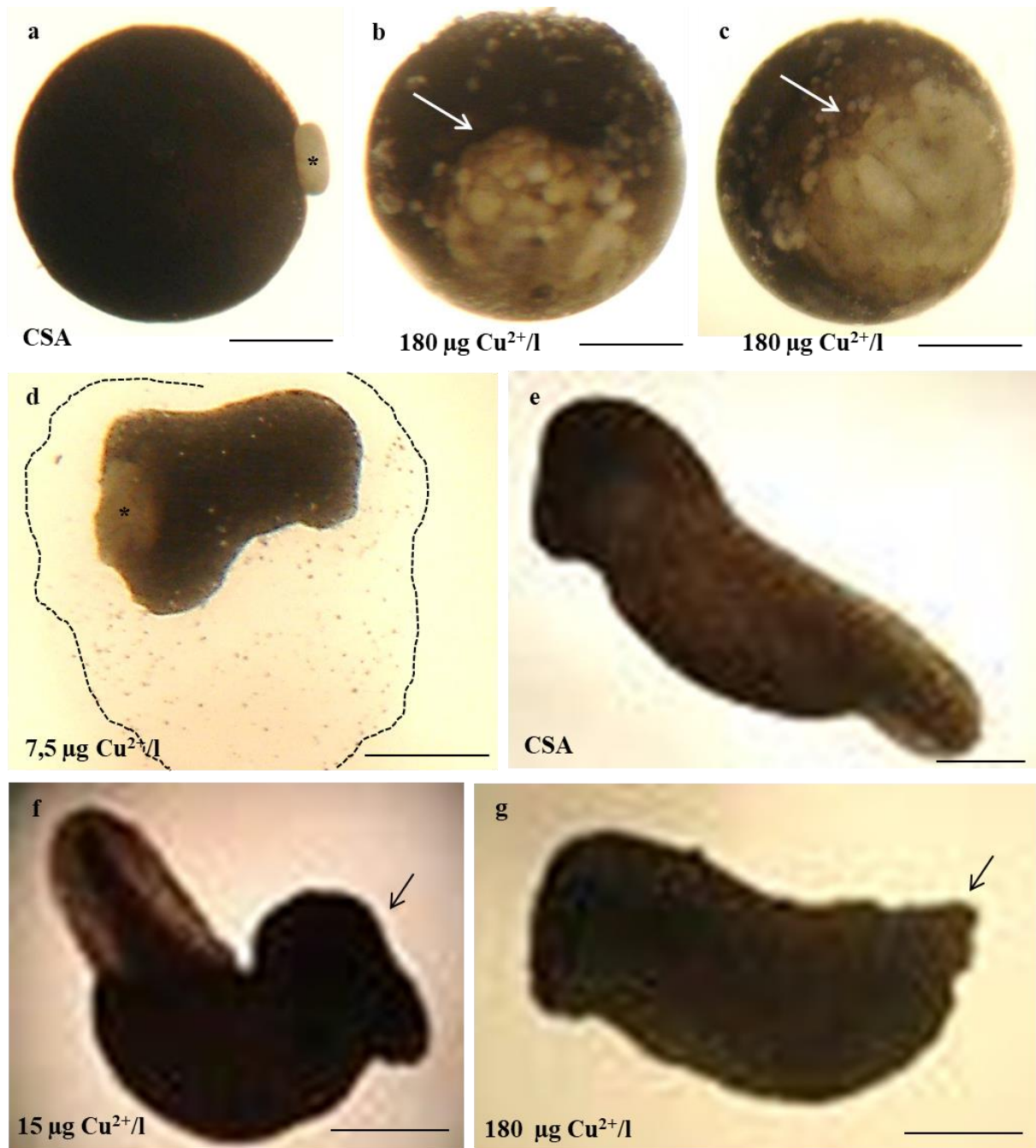


Figura 5: Alteraciones morfológicas de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos de forma continua a Cu^{2+} a partir del E. 4 (4 blastómeros). a-c) 24 h de tratamiento, d) 48 h de tratamiento, e-g) 96 h de tratamiento. Obsérvese en: a) embrión en E. 12 (gástrula avanzada) con tapón vitelino (*), b y c) embriones detenidos en fases iniciales de la gastrulación con desprendimiento y disociación celular (flechas), d) embrión en neurulación (región anterior) que no ha logrado completar la gastrulación (región posterior) con persistencia de tapón vitelino (*) y desprendimiento de células hacia el espacio perivitelino (la línea punteada indica el límite de la membrana vitelina que se encontraba muy distendida, e) embrión en E. 18 (respuesta muscular), f) embrión con anomalías cefálicas (flecha) y severa incurvación, g) embrión en E. 17 (brote caudal) con subdesarrollo de la cola (flecha). Escala: a-c) 0,25 mm, d-g) 1 mm.

Las principales malformaciones observadas durante la exposición fueron: persistencia de plaquetas vitelinas, anomalías de fusión de pliegues neurales, asimetría del tubo neural, disociación celular, desprendimiento de plaquetas vitelinas, subdesarrollo general, microcefalia o malformación de región cefálica, subdesarrollo de aleta caudal y/o cola bífida, severas incurvaciones, agenesia o subdesarrollo de branquias externas, malformación de estructuras del disco oral (Figura 6). Al igual que lo observado en el CSA, el porcentaje de individuos que presentó estas malformaciones no superó el 10 % en concentraciones de hasta 15 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$. Al finalizar el ensayo, el 100 % de los individuos sobrevivientes expuestos a 45 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ presentó severas malformaciones que incluyeron: acefalia o microcefalia, agenesia o subdesarrollo de branquias externas, malformación de estructuras del disco oral, subdesarrollo de la cola y aleta caudal e incurvaciones del eje (Figura 7). El IT calculado fue: 1,7.

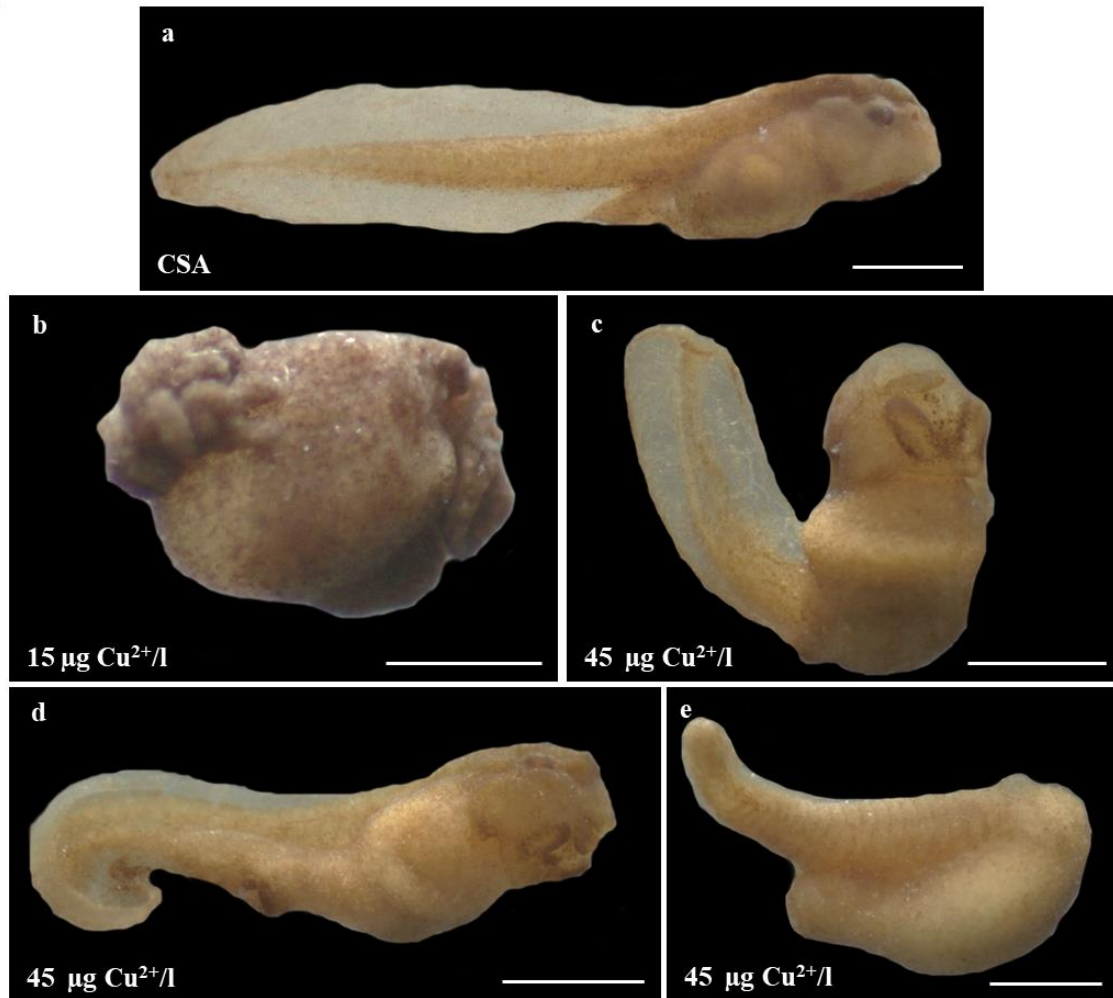


Figura 6. Alteraciones morfológicas de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a Cu^{2+} a partir del E. 4 (4 blastómeros). a) larva CSA en E. 25 (opérculo completo). b) individuo severamente malformado, no se reconocen regiones corporales,

c) individuo con severa incurvación y agenesia de estructuras del disco oral y subdesarrollo de branquias externas, d) individuo con incurvación de la cola, subdesarrollo de la aleta caudal, malformación de estructuras del disco oral, e) individuo con acefalia, subdesarrollo de la cola y aleta caudal e incurvación de la cola. Escala: a, c y d: 1 mm, b y e: 0,5 mm.

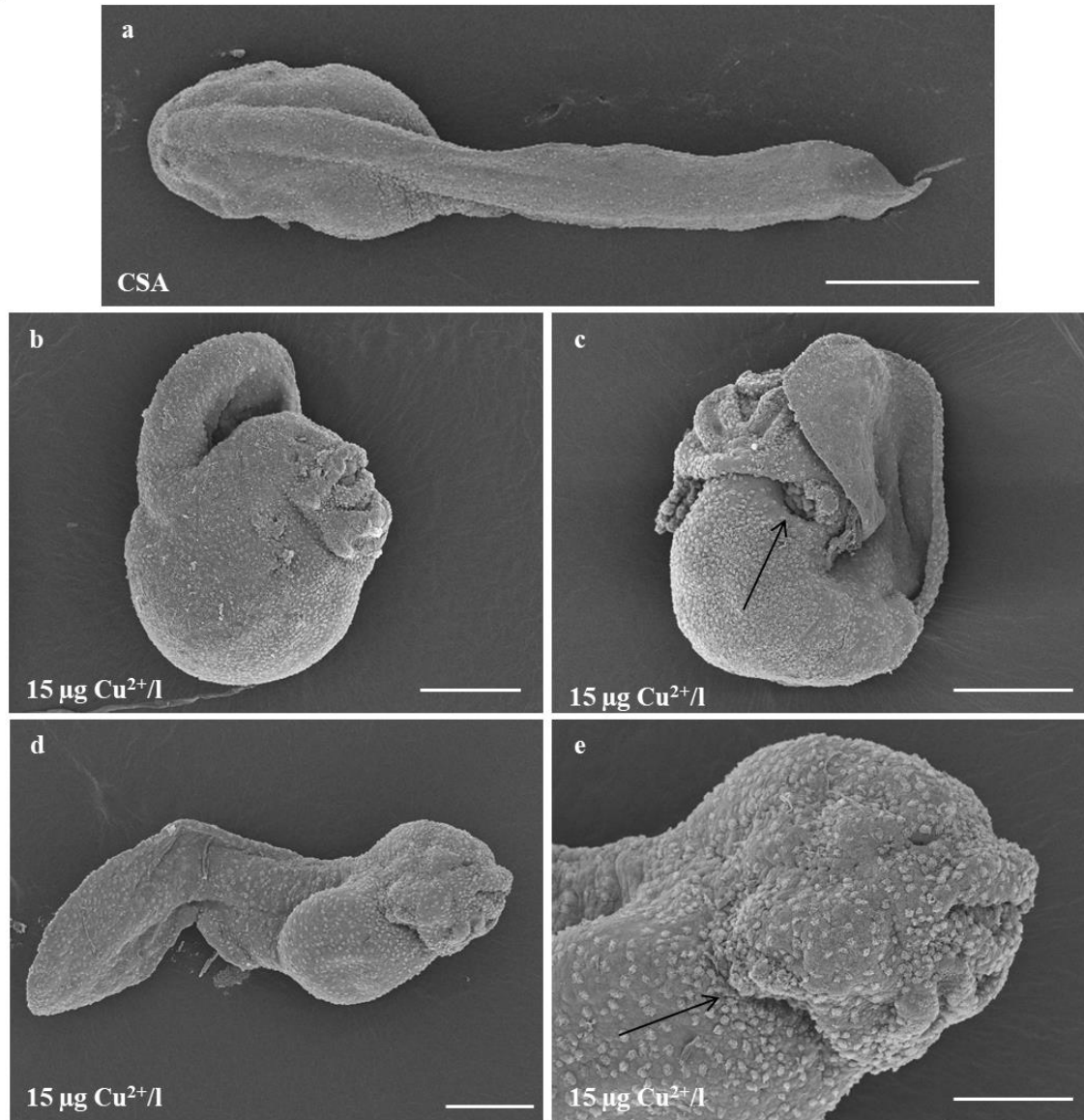


Figura 7. Fotografías de MEB de individuos de *Rhinella arenarum* expuestos a Cu^{2+} desde el E. 4 (4 blastómeros). a) larva del CSA en E. 25 (opérculo completo), b) individuo con subdesarrollo general, microcefalia con malformación de estructuras cefálicas, agenesia de branquias externas, severa incurvación, subdesarrollo de la cola, c) nótese subdesarrollo general, severa incurvación y subdesarrollo de branquias externas (flecha), d) nótese incurvación de la cola, malformación de estructuras cefálicas, e) detalle de la región cefálica de d). Nótese subdesarrollo de branquias externas (flecha) y malformación de estructuras del disco oral. Escala: a: 1 mm, b-c: 0,5 mm, d: 0,25 mm.

El análisis de la varianza mostró diferencias significativas en la talla alcanzada por las larvas sobrevivientes del tratamiento de 45 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ con respecto al CSA y los restantes tratamientos (Figura 8).

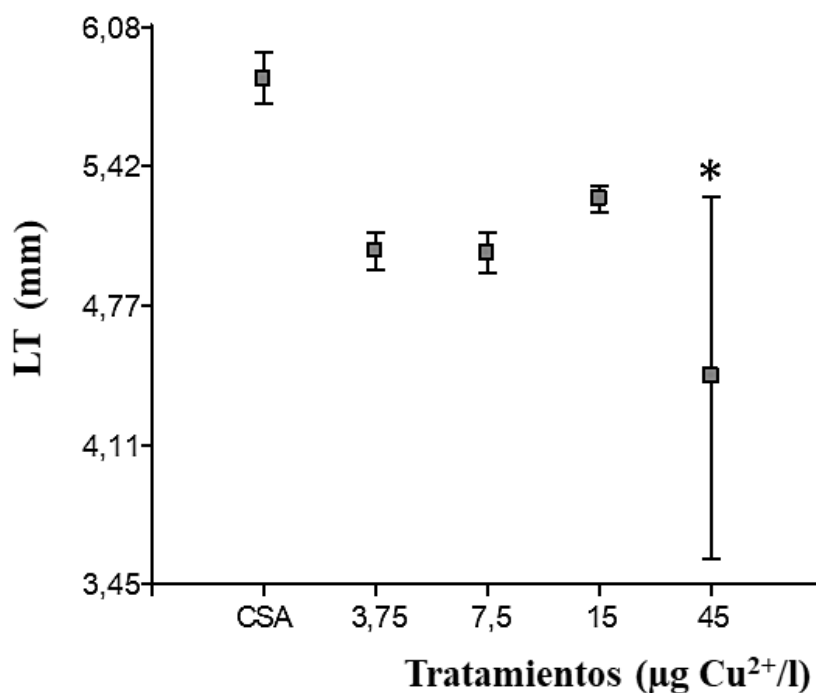


Figura 8. Comparación de la Longitud Total (LT) alcanzada por los individuos de *Rhinella arenarum* expuestos a Cu^{2+} a partir del E. 4 (4 blastómeros). El asterisco indica diferencia significativa con el CSA ($p < 0,01$).

3) Test EXPOSICIÓN POR PULSO. Exposición de embriones y larvas en distintos estadios del desarrollo a Cu^{2+} por 24 h

Letalidad

La comparación de la CL 50 calculada para los diferentes estadios del desarrollo (Figura 9), mostró diferencias significativas ($< 0,01$) en la sensibilidad al cobre siendo el E. 18 el más sensible al efecto letal y el E. 11 el más resistente ($F_{9,20} = 8,89$, $P = < 0,0001$). Asimismo, como se observa en la figura 9, los estadios embrionarios tempranos (E. 4-14) fueron más tolerantes al efecto tóxico del cobre que los estadios organogenéticos (E. 17-20) y larvales tempranos (E. 21-25). Para estos últimos estadios

del desarrollo los valores de CL 50 no se diferenciaron significativamente y mostraron un rango de variación mucho menor.

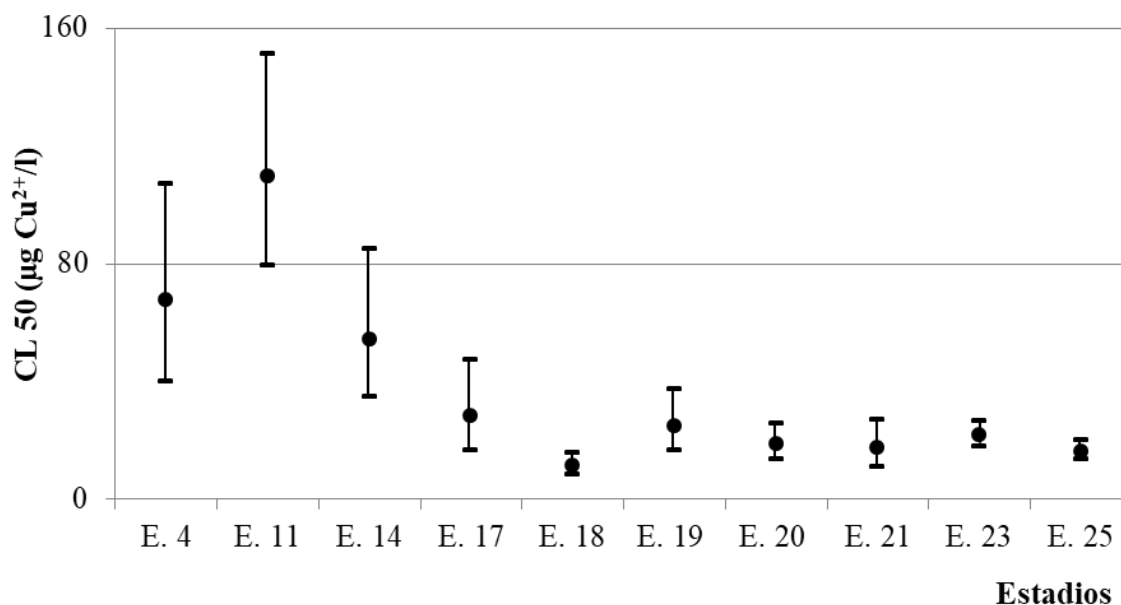


Figura 9. Comparación de los valores de CL 50 para Cu^{2+} para distintos estadios embrionarios y larvales de *Rhinella arenarum* expuestos durante 24 h y posterior cambio a SA.

Alteraciones de la morfología y el crecimiento

El tipo de malformaciones observadas varió en función de la concentración y del estadio en el cual se produjo la exposición y se describen a continuación.

Exposición en E. 4 (4 blastómeros)

A las 24 horas de ensayo, los embriones del CSA, alcanzaron el E. 12 (gástrula avanzada) o E. 13 (placa neural) al igual que los expuestos a 7,5 y 15 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$. Los embriones expuestos a concentraciones iguales y superiores a 45 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ mostraron severa disociación celular y exudación de plaquetas vitelinas hacia el espacio perivitelino. En el 100 % de los tratados con concentraciones de 300 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ se verificó el detenimiento del desarrollo en el estadio blástula final o gástrula inicial, también con severos signos de disociación celular.

Al finalizar el ensayo, entre el 7 y el 14 % de los individuos del CSA y los tratados con 3,5 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ y entre el 15 y 20 % de los tratados con 7,5, 15 y 45 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ presentaron malformaciones. El 100 % de los sobrevivientes a la exposición de 105 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ presentaron diversas anomalías como persistencia de plaquetas vitelinas, microcefalia, subdesarrollo de ojos, malformación de estructuras bucales y de órganos adhesivos, subdesarrollo o agenesia de branquias externas, escaso crecimiento de la cola, incurvaciones caudales, hidropesía abdominal con agenesia de asas intestinales y subdesarrollo general (Figura 10).

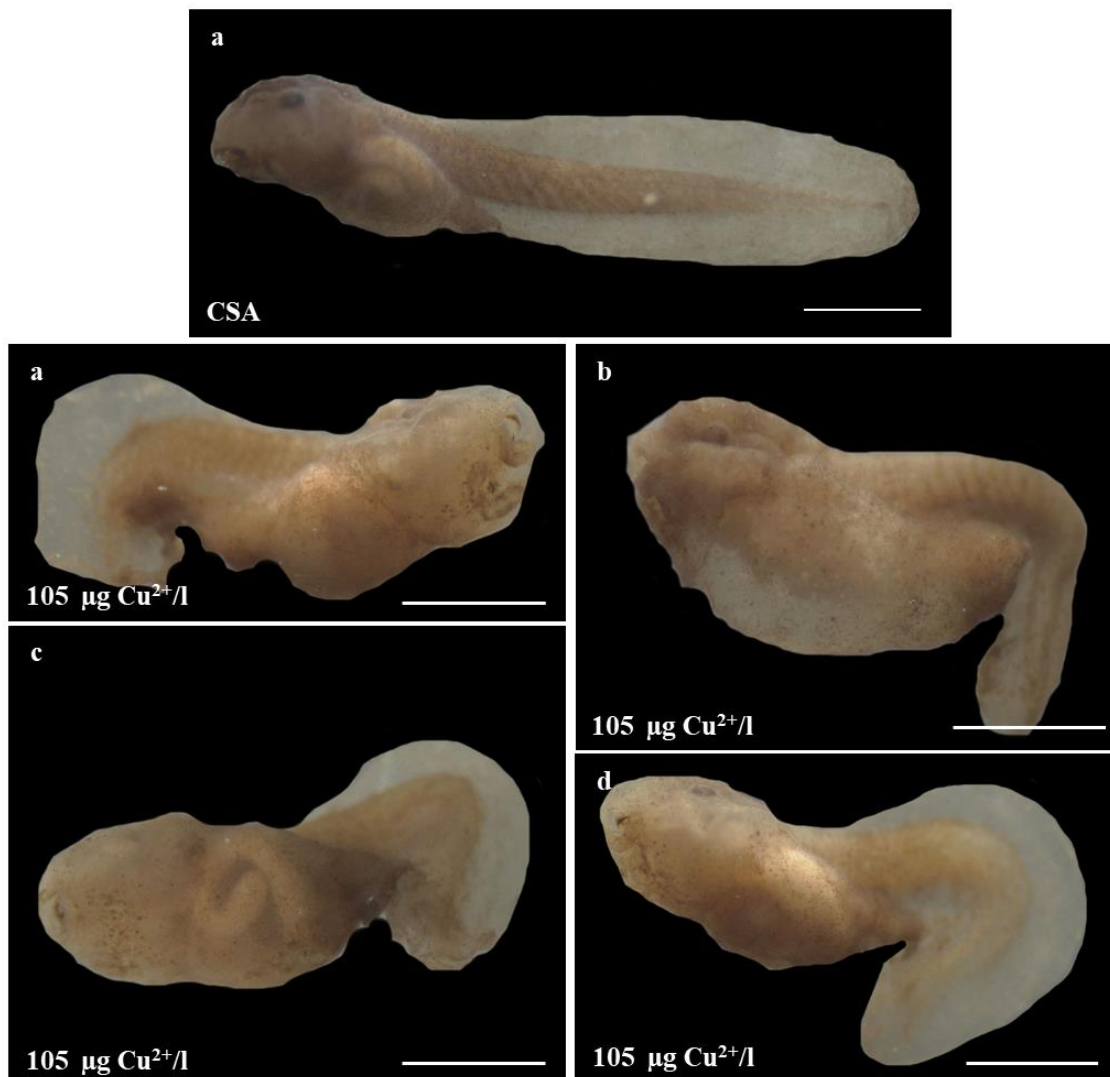


Figura 10. Alteraciones morfológicas de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a Cu^{2+} por pulso de 24 h, a partir del E. 4 (4 blastómeros). a) larva del CSA en E. 25 (opérculo completo), b-d) ejemplares con severa incurvación de la cola, y subdesarrollo de la aleta caudal, b) ejemplar con microcefalia y malformación de estructuras del disco oral y papilas adhesivas, subdesarrollo de branquias externas, hidropesía abdominal con malformación de órganos internos. Escala: 1 mm.

El análisis de la varianza mostró diferencias significativas ($F_{5,54} = 11,59$, $P = <0,0001$) en la talla de los individuos tratados con $105 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ y los del CSA y las restantes concentraciones (Figura 11).

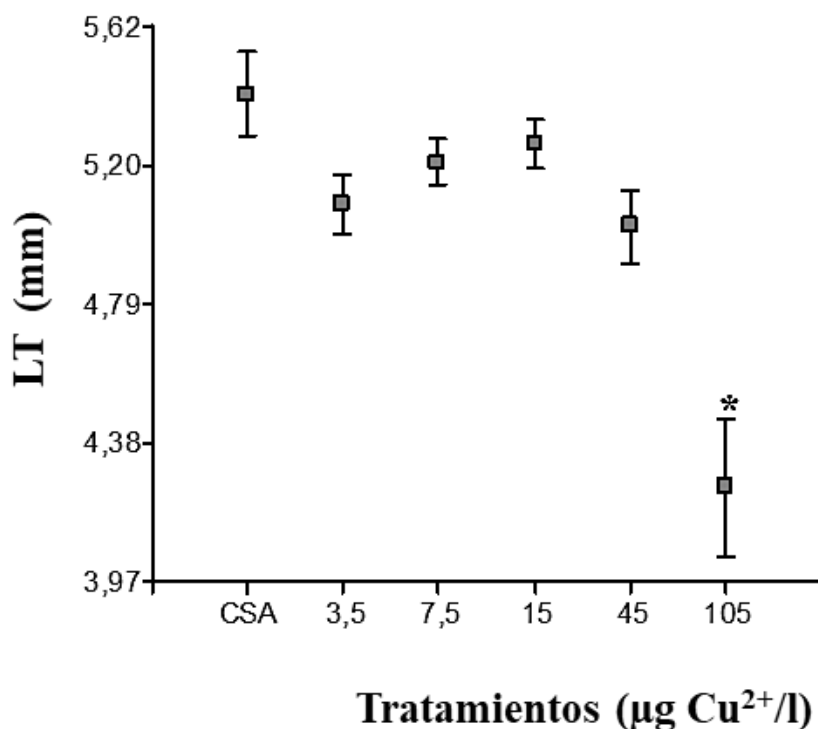


Figura 11. Comparación de la Longitud Total (LT) alcanzada por las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a Cu^{2+} a partir del E. 4 (4 blastómeros), por pulso de 24 h. Las concentraciones de los tratamientos se expresan en $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$. El asterisco indica diferencia significativa con el CSA ($p < 0,01$).

Exposición en E. 11 (gástrula media)

A las 24 horas de ensayo, los embriones del CSA avanzaron al estadio E. 13 (placa neural). Los embriones expuestos a concentraciones de 300 y $375 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ detuvieron su desarrollo dentro de las 24 h de exposición. Los tratados con concentraciones de $240 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ e inferiores, presentaron formas irregulares, disociación celular acompañada de dispersión de plaquetas vitelinas y anomalías en la gastrulación. A las 48 horas de ensayo los embriones del CSA alcanzaron el E. 18 (respuesta muscular) sin alteraciones, mientras que los tratados con 45 , 105 , 180 y $240 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ presentaron severas anomalías como tapones vitelinos persistentes, abdomen globoso y fallas en la fusión de los pliegues neurales cefálicos. Al finalizar el ensayo, el

20 y el 70 % de los expuestos a 45 y 105 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$, respectivamente, y el 100 % de los expuestos a 180 y 240 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ presentó malformaciones. Estos individuos mostraron acefalia o severas malformaciones cefálicas con agenesia de ojos, malformación de estructuras del disco oral y papilas adhesivas y agenesia o subdesarrollo de branquias externas, malformación del pliegue opercular, escaso desarrollo general y de la cola, repliegues de la aleta caudal, incurvaciones axiales, severa hidropesía con subdesarrollo o agenesia de órganos internos (Figura 12). Al finalizar, las larvas del CSA alcanzaron el E. 25 (opérculo completo). El análisis de la varianza no mostró diferencias significativas ($p > 0,01$) en la talla de las larvas del CSA y las tratadas con cobre, al finalizar el ensayo.

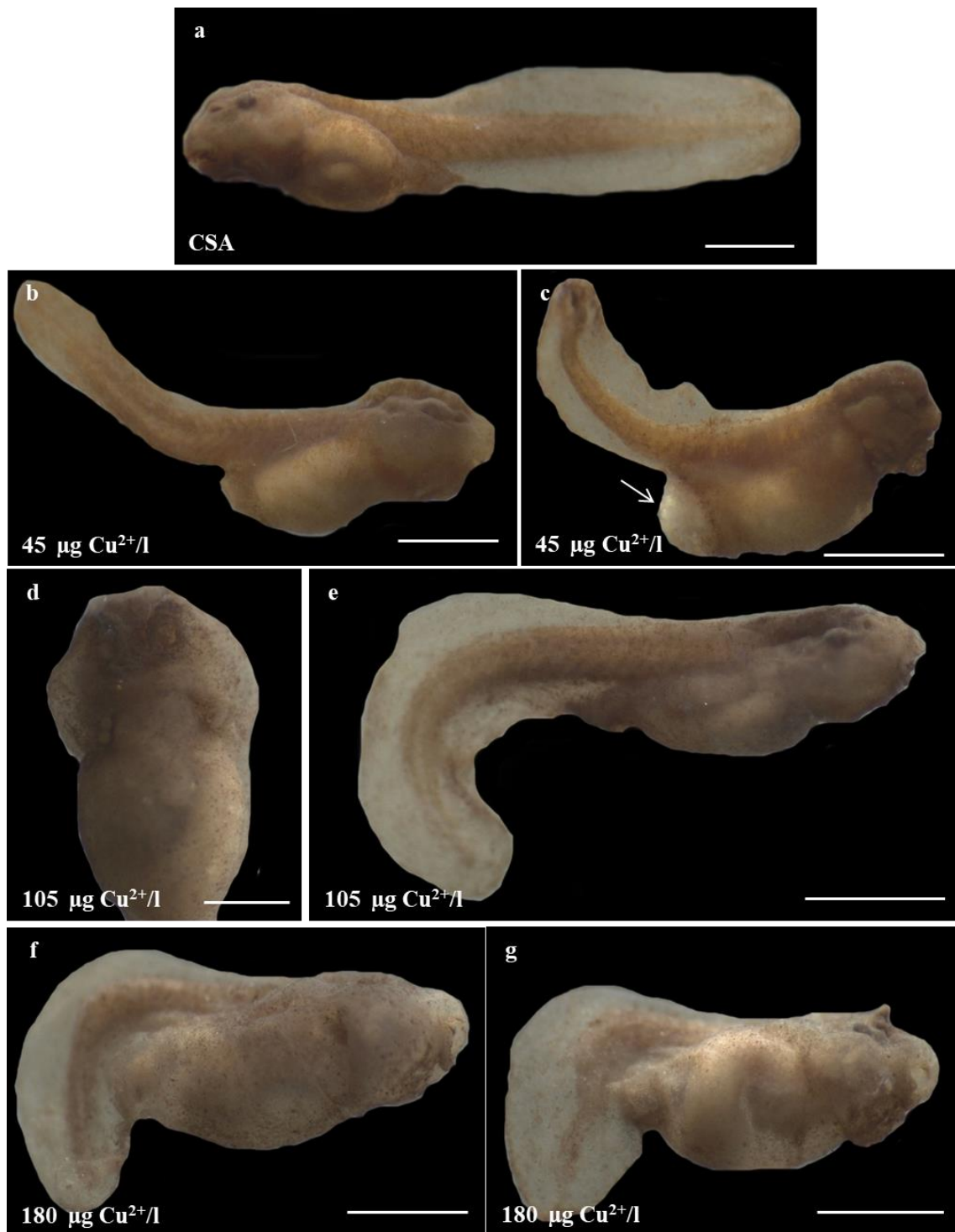


Figura 12. Alteraciones morfológicas de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a Cu^{2+} por pulso de 24 h, a partir del E. 11 (gástrula media). a) Larva del CSA en E. 25 (opérculo completo), b) ejemplar con incurvación de la cola, subdesarrollo de la cola y aleta caudal, alteración de las estructuras del disco oral, c) ejemplar con incurvación caudal, subdesarrollo de la cola, microcefalia con malformación del disco oral y papilas adhesivas, subdesarrollo de branquias externas y persistencia de plaquetas vitelinas (flecha), d) vista ventral de la región cefálica; nótese malformación de estructuras del

disco oral y papilas adhesivas, malformación del pliegue opercular, subdesarrollo de branquias externas, e-g) ejemplares con severa incurvación caudal y subdesarrollo de la cola, malformación de estructuras del disco oral y papilas adhesivas, f y g) nótese hidropesía abdominal y malformación de órganos internos. Escala: 1 mm.

Exposición en E. 14 (surco neural)

A las 24 horas de ensayo, los embriones del CSA alcanzaron el E. 17 (brote caudal) mientras que los expuestos a 240 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ y superiores detuvieron su desarrollo. Los embriones expuestos a concentraciones menores, si bien alcanzaron el E. 17, mostraron alteraciones en su morfología externa como: disociación celular y dispersión de plaquetas vitelinas. A las 96 h los embriones del CSA y los expuestos a 45, 105 y 108 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ alcanzaron el E. 20 (circulación branquial) sin embargo los expuestos a cobre presentaron incurvaciones axiales y subdesarrollo de branquias externas. A las 144 horas de ensayo los individuos expuestos a cobre presentaron contracciones espasmódicas y temblores frente al estímulo táctil, mientras que los controles reaccionaron con natación normal. Al finalizar el ensayo el 90 % las larvas del CSA alcanzaron el E. 25 (opérculo completo) y presentaron una morfología normal. Los sobrevivientes a la exposición a 3,5, 7,5, 15, 45 y 105 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ tuvieron retraso en el desarrollo y severas malformaciones (Figura 13) como microcefalia, malformación de estructuras cefálicas y órganos bucales y adhesivos, agenesia o subdesarrollo de ojos, subdesarrollo o agenesia de filamentos branquiales externos, hidropesía acompañada de agenesia o malformación de órganos internos, escaso desarrollo de la cola e incurvaciones axiales. En algunos casos se observó también extrusión de masa vitelina abdominal. Para concentraciones de 3,5 a 15 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ el porcentaje de malformados fue de entre 3,5 y 10 %, mientras que para 45 y 105 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ fue del 26 y 100 %, respectivamente.

El análisis de la varianza no mostró diferencias significativas ($p > 0,01$) en la talla de los individuos sobrevivientes a la exposición a Cu^{2+} con respecto al CSA.

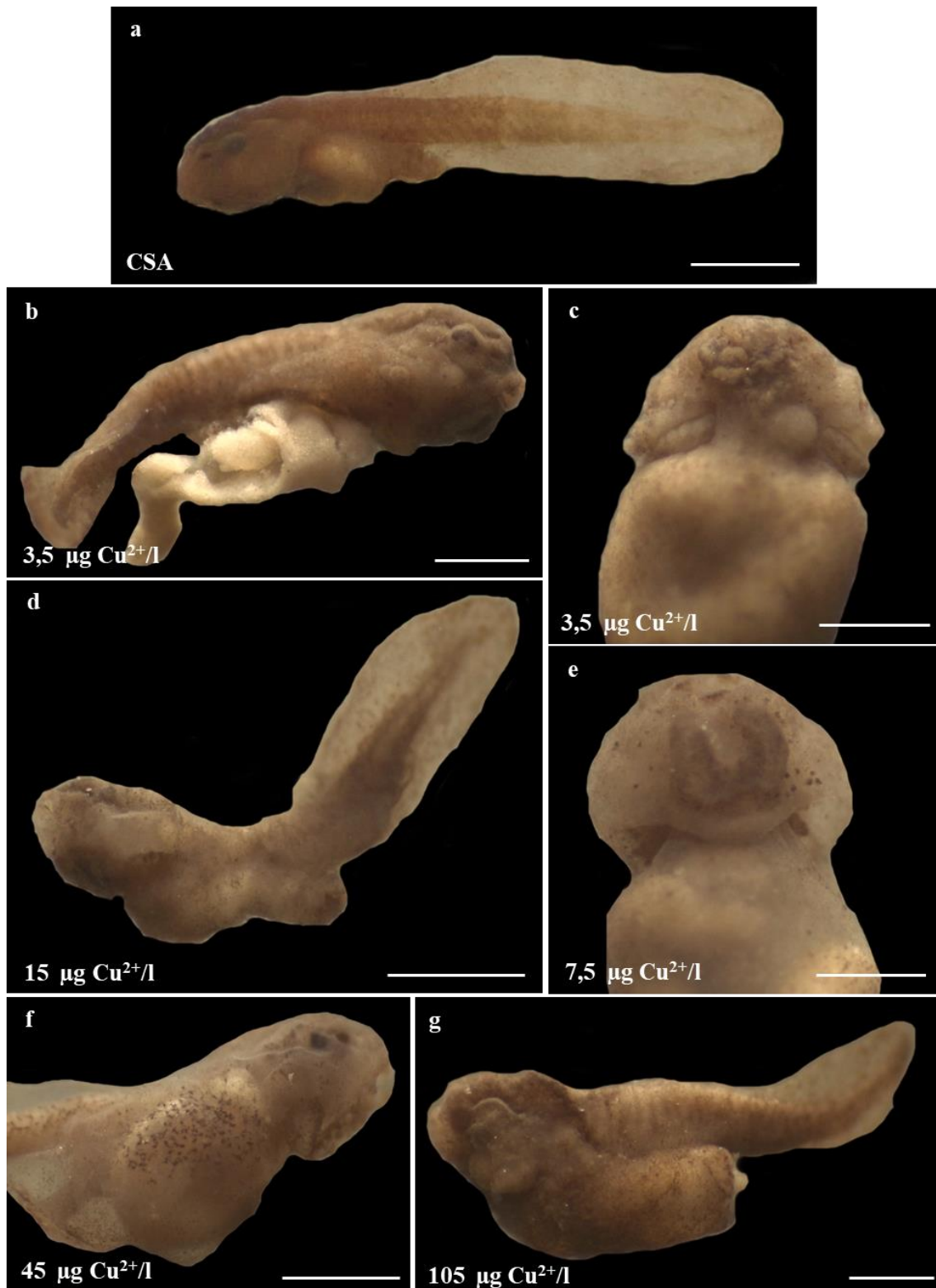


Figura 13. Alteraciones morfológicas de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a Cu^{2+} por pulso de 24 h, a partir del E. 14 (surco neural). a) larva del CSA en E. 25 (opérculo completo), b) ejemplar severamente malformado, malformación de estructuras cefálicas, subdesarrollo caudal, extrusión de masa vitelina abdominal, c) vista ventral de la región cefálica; nótese malformación de estructuras del disco oral y papilas adhesivas, subdesarrollo de branquias externas, b) ejemplar severamente malformado, con severa

incurvación caudal, e) ejemplar con hidropesía branquial, malformación de estructuras del disco oral y malformación del pliegue opercular, f) ejemplares con hidropesía abdominal y malformación de órganos internos, g) ejemplar severamente malformado con microcefalia y malformación de estructuras cefálicas, malformación del abdomen con persistencia de plaquetas vitelinas y agenesia de órganos internos. Escala: a, d y f: 1 mm, b, c, e y g: 0,5 mm.

Exposición en E. 17 (brote caudal)

A las 24 h de ensayo los embriones del CSA y los expuestos a concentraciones entre 3,5 y 15 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$, alcanzaron el estadio E. 19 (latido cardíaco). Los expuestos a concentraciones de 30 y 45 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$, tuvieron retraso en el desarrollo, descamación celular y presentaron abdomen globoso. Al finalizar el ensayo, los embriones del CSA alcanzaron el E. 24-25 con aspecto normal, mientras que entre el 10 y el 30 % de los sobrevivientes tratados con cobre mostraron malformaciones severas como acefalia, microcefalia, agenesia o reducción de ojos, malformación de estructuras del disco oral, papilas adhesivas y branquias externas, alteraciones en la formación del pliegue opercular, subdesarrollo de la cola y aleta caudal, hidropesía acompañada de malformación del sistema digestivo (Figura 14). El análisis de la varianza no mostró diferencias significativas ($p > 0,01$) en la talla alcanzada por los individuos sobrevivientes a la exposición con Cu^{2+} y el CSA.

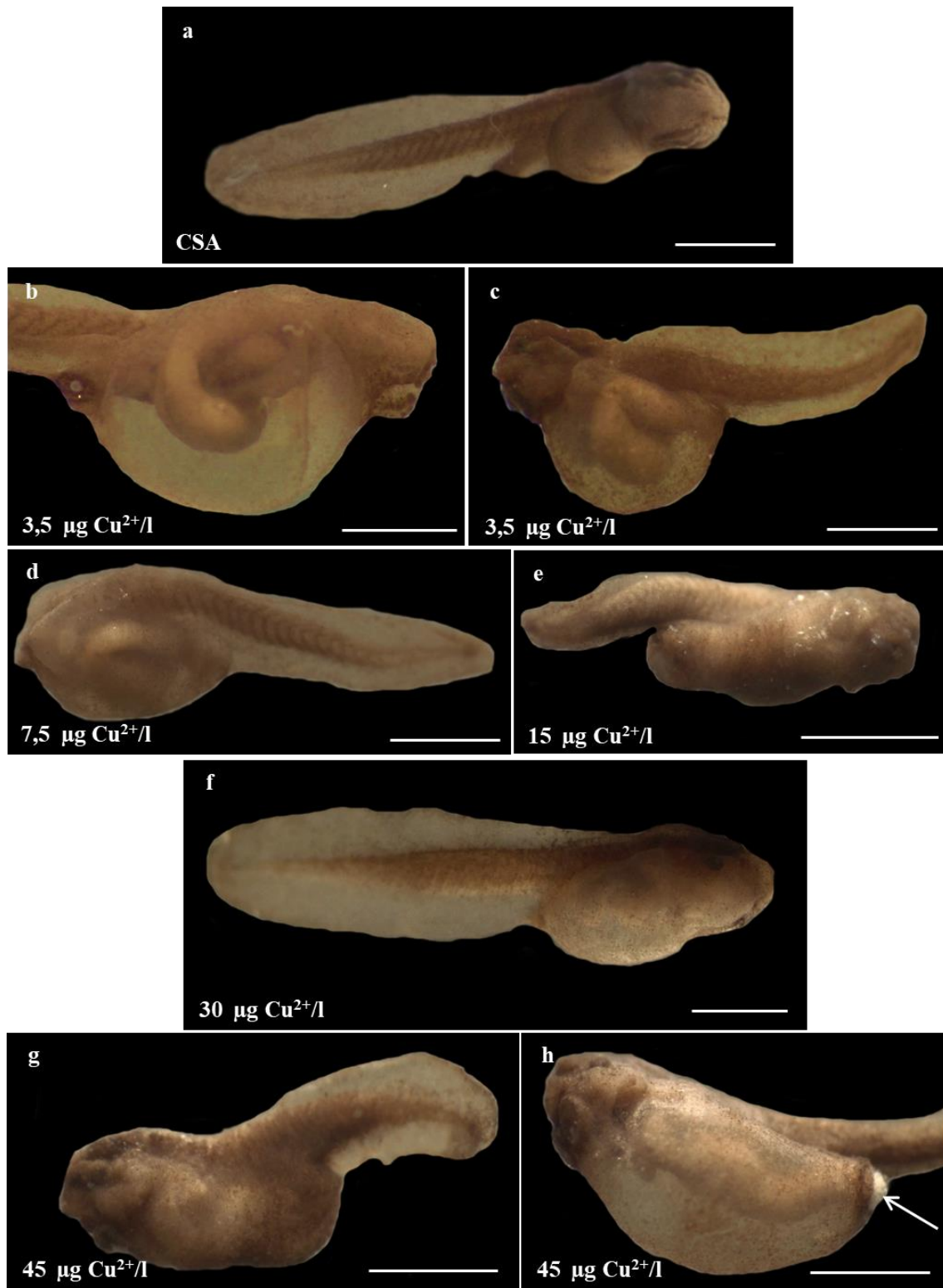


Figura 14. Alteraciones morfológicas de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a Cu^{2+} por pulso de 24 h, a partir del E. 17. a) Larva del CSA en E. 25., b y c) ejemplares severamente malformados con microcefalia y malformación de estructuras cefálicas, subdesarrollo caudal, hidropesía abdominal con malformación de órganos internos, d) larva con acefalia, incurvación caudal e hidropesía abdominal con malformación de órganos internos, e) larva severamente malformada, subdesarrollo general, microcefalia y malformación de estructuras cefálicas, incurvación de la cola, persistencia de masa

vitelina abdominal, e) larva con severa incurvación y subdesarrollo de la cola, microcefalia con malformación de estructuras cefálicas, f) larva con hidropesía abdominal y branquial, g) larva con microcefalia, incurvación y subdesarrollo de la cola, h) larva con microcefalia y severa hidropesía abdominal con malformación de órganos del tubo digestivo y persistencia de plaquetas vitelinas (flecha). Escala: 1mm.

Exposición en E. 18 (respuesta muscular), E. 20 (circulación branquial), E. 21 (boca abierta) y E. 23 (pliegue opercular)

Para dichos estadios la exposición a concentraciones de 3,5 y 7,5 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ no provocaron alteraciones en la morfología de las larvas y al igual que en el CSA, alcanzaron el E. 24-25 al finalizar el ensayo. Concentraciones entre 11,2 y 37,5 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ causaron alteraciones en la morfología de las larvas como acefalia o microcefalia, subdesarrollo de estructuras cefálicas, subdesarrollo de la cola y aleta caudal, hidropesía branquial y abdominal con enrollamiento anómalo de asas intestinales y/o expansión de rebordes cloacales (Figuras 15 y 16). En dichas concentraciones el porcentaje de malformados estuvo comprendido entre el 30 y 60 %. El análisis de la varianza no mostró diferencias significativas ($p > 0,01$) en la talla de los individuos del CSA y los tratados con las distintas concentraciones de Cu^{2+} .

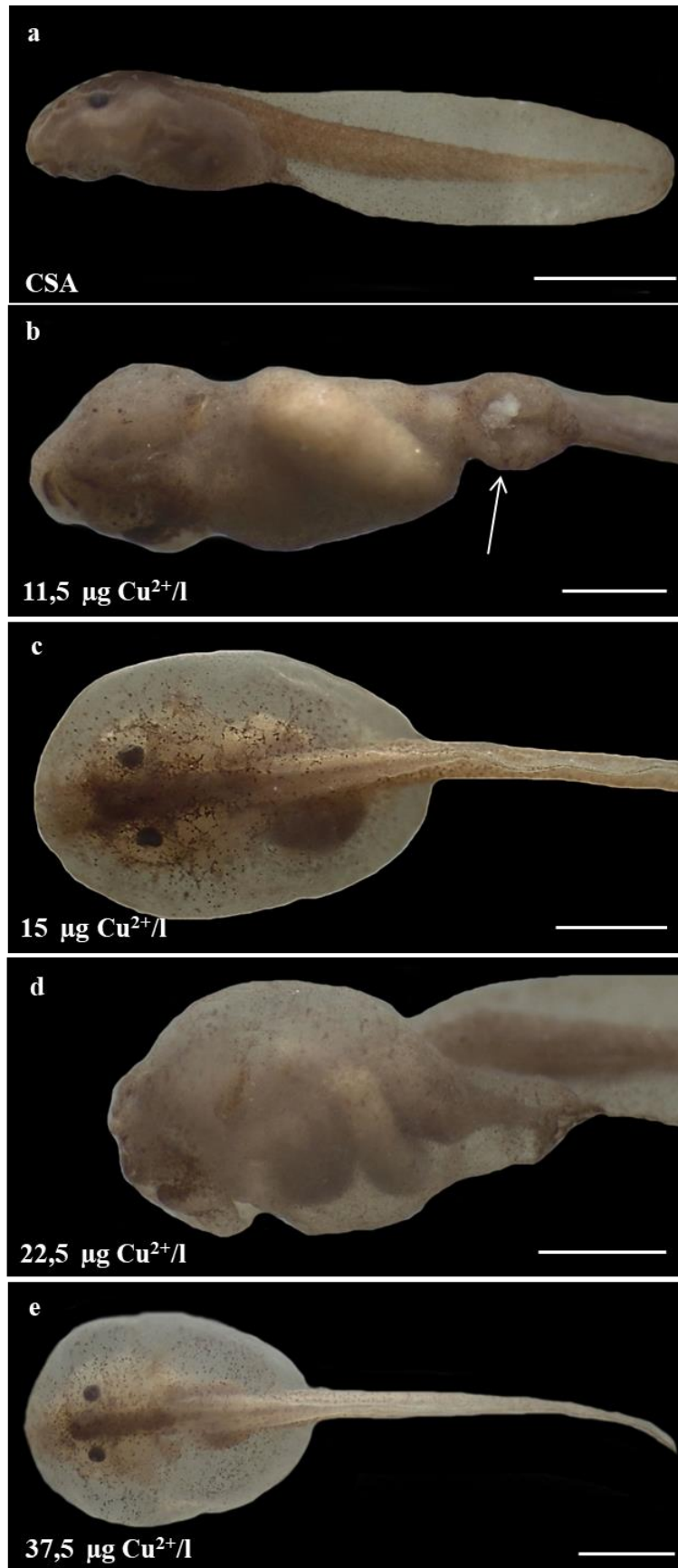


Figura 15. Alteraciones morfológicas de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a Cu²⁺ por pulso de 24 h, a partir del E. 18 (respuesta muscular) (b, c), E. 20 (circulación

branquial) (d) y E. 23 (pliegue opercular) (e). a) larva del CSA en E. 25 (opérculo completo), b) ejemplar con malformación del disco oral, persistencia de plaquetas vitelinas en tubo digestivo y expansión de rebordes cloacales (flecha), c) ejemplar con severa hidropesía abdominal, con malformación de órganos internos e incurvación del eje del cuerpo, d) ejemplar con microcefalia y malformación de estructuras cefálicas, hidropesía abdominal con malformación de órganos internos, e) ejemplar con severa hidropesía general con malformación / subdesarrollo de órganos internos. Escala: 1 mm.

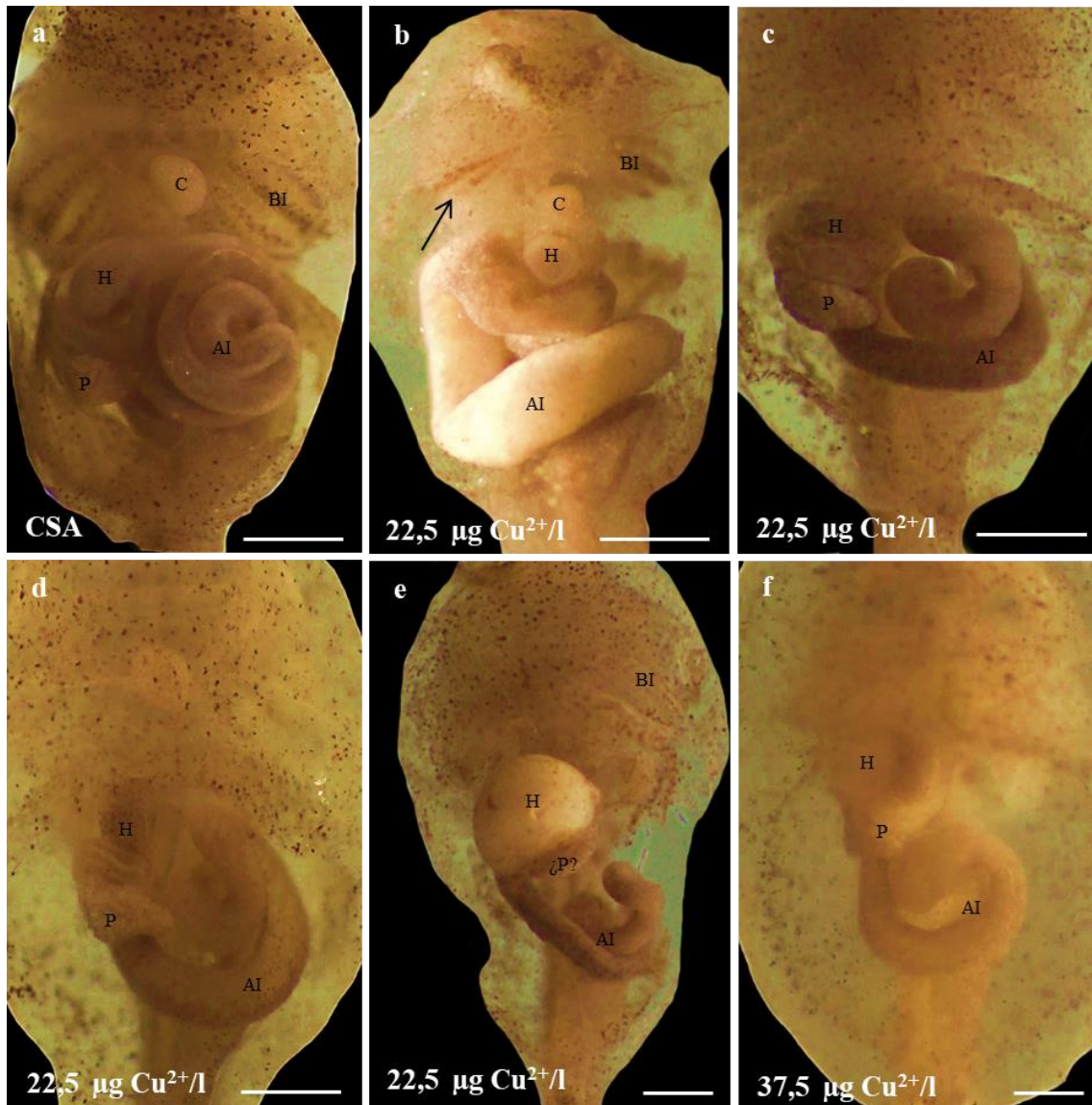


Figura 16. Alteraciones morfológicas de órganos internos de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a Cu^{2+} por pulso de 24 h, a partir del E. 18 (respuesta muscular) (b), E. 21 (boca abierta) (c) y E. 23 (pliegue opercular) (d-f). a) larva del CSA en E. 25 (opérculo completo) con desarrollo normal de branquias internas y glándulas anexas y enrollamiento normal de asas intestinales, b-f) larvas tratadas con Cu^{2+} con subdesarrollo de branquias internas (flecha), desarrollo anormal de glándulas anexas y

enrollamiento anormal de asas intestinales. Referencias: **AI**: asas intestinales, **BI**: branquias internas, **C**: corazón, **H**: hígado, **P**: páncreas. Escala 0,5 mm.

Exposición en E. 25 (opérculo completo)

Las larvas del CSA y las expuestas a concentraciones entre 7,5 y 22,5 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ alcanzaron el estadio 26 al finalizar el ensayo sin presentar anomalías en su morfología externa. Las larvas tratadas con concentraciones de 30 y 45 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{l}$ alcanzaron el mismo estadio aunque alrededor del 20 % presentó incurvaciones del eje (Figura 17). No se observaron diferencias significativas ($p > 0,01$) en la talla de las larvas sobrevivientes tratadas con Cu^{2+} y el CSA.

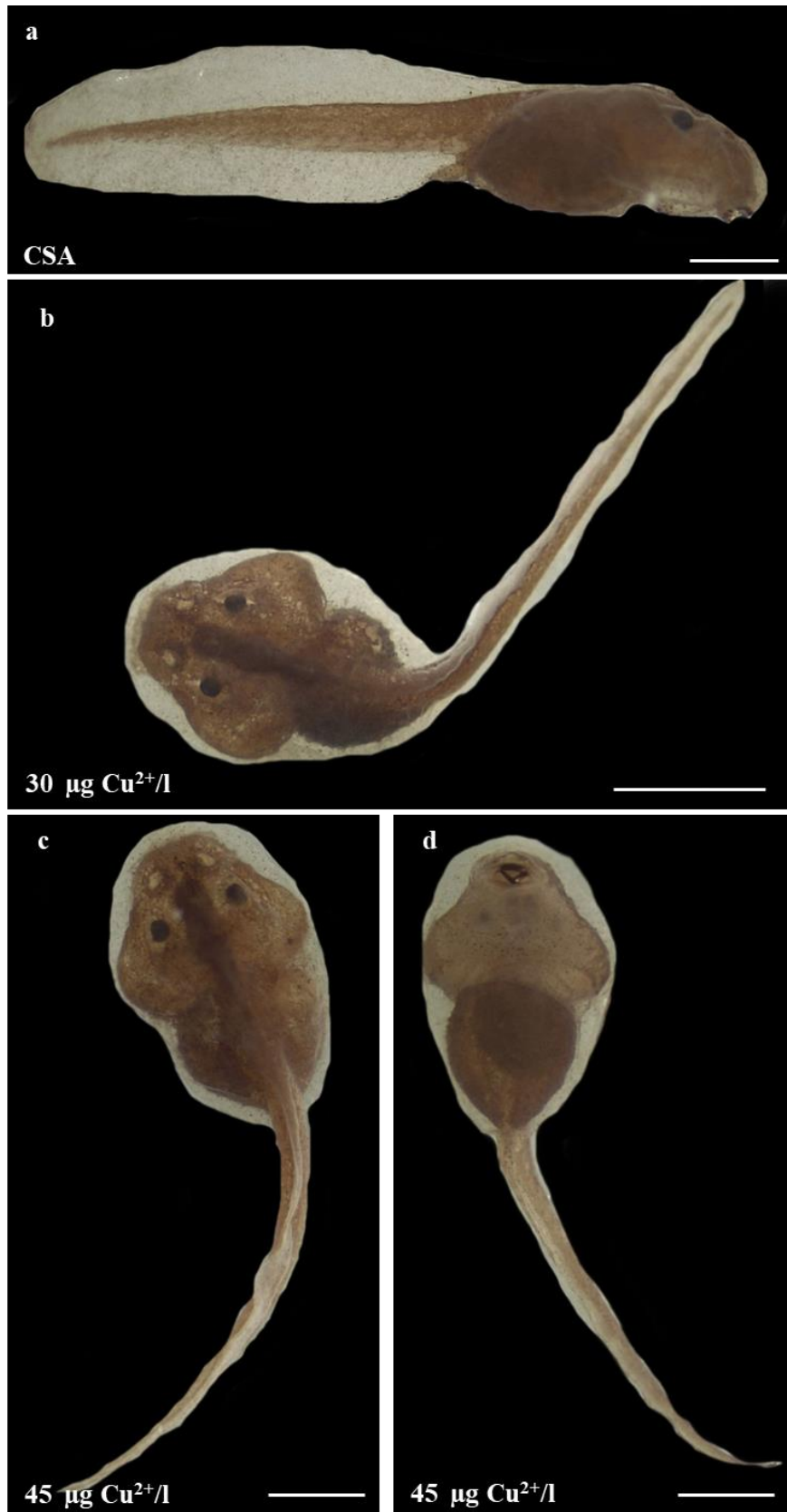


Figura 17. Larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a Cu²⁺ por pulso de 24 h, a partir del E. 25 (opérculo completo). a) larva del CSA en E. 25 (opérculo completo), b-d) larvas tratadas con Cu²⁺ con incurvaciones de la cola. Escala: 1 mm.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo evaluamos el efecto letal y capacidad teratogénica del cloruro de cobre en embriones y larvas de *Rhinella arenarum* demostrándose una susceptibilidad estadio-dependiente y dependiente del tiempo de exposición. En comparación con otras especies analizadas (Tabla 1) *Rhinella arenarum* resultó ser altamente sensible a la acción tóxica del cobre.

Considerando los valores mínimos y máximos de CL50 reportados para larvas de *Rana catesbeiana* (Ferreira et al. 2004) y *Xenopus laevis* (Hamilton 2003, Martini et al. 2012), *Rhinella arenarum* resultó entre 50 y 250 veces más susceptible al efecto letal del cobre. Para larvas en E. 25 expuestas de forma continua, se verificó un importante efecto letal agudo a partir de concentraciones de 22,5 $\mu\text{g Cu}^2/\text{l}$. Para larvas expuestas por pulso de 24 h a similares concentraciones, se registró un valor semejante de CL50. Esto indicaría que para larvas de *Rhinella arenarum*, concentraciones superiores a 20 $\mu\text{g Cu}^2/\text{l}$ ejercen un efecto letal que se manifiesta dentro de las primeras horas de exposición. El efecto letal agudo del cobre fue previamente descrito por Herkovits y Helguero (1998) y Aronzon et al. (2011) quienes reportaron que el umbral de exposición para que se manifiesten los efectos letales, es de 24 h.

No se registraron anomalías severas en la morfología externa de las larvas independientemente de que la exposición haya sido de forma continua o por pulso de 24 h, evidenciándose hidropesía leve, reducción de la aleta caudal e incurvaciones de la cola. Esto apoya la idea de que la acción tóxica del cobre es irreversible incluso en caso del cese de exposición. La exposición continua a partir de los primeros estadios del desarrollo embrionario tuvo un efecto letal semejante a la exposición a partir de estadios larvales, registrándose valores de CL50 semejantes. Sin embargo, a diferencia de lo registrado para estadios larvales, elevadas concentraciones de cobre provocaron severas alteraciones en la morfología de los embriones y las larvas sobrevivientes. La exposición por pulso de 24 h también produjo malformación de los embriones expuestos a partir de los primeros estadios del desarrollo y estadios tempranos de la organogénesis, cuya severidad fue disminuyendo cuando los individuos fueron expuestos a partir de estadios larvales. Para el caso de embriones expuestos en los estadios de segmentación, gastrulación y neurulación dichas alteraciones en la morfología se evidenciaron desde las primeras horas de exposición registrándose

disociación celular, alteración de la gastrulación, persistencia de plaquetas vitelinas, y alteraciones en la neurulación. Muchos casos resultaron en la muerte de los individuos, aunque algunos sobrevivieron con severas alteraciones en su morfología. Fue frecuente la microcefalia con malformación de estructuras cefálicas como estructuras del disco oral, papilas adhesivas y branquias externas. La exposición durante estadios de la organogénesis temprana (E. 17 a E. 20) y primeros estadios larvales (E. 21 a E. 23) provocó, además de dichas malformaciones, alteraciones en el desarrollo de la cola y aleta caudal e hidropesía abdominal con malformación o agenesia de órganos internos, particularmente del sistema digestivo. Sin embargo, la exposición en el E. 25, finalizada la etapa crítica de la organogénesis, no tuvo un efecto teratogénico severo. Luo et al (1993) y Xia et al. (2012) reportaron malformaciones en larvas de *Xenopus laevis* y *Bufo gargarizans*, respectivamente, tratadas con cobre. Semejante a lo observado en este estudio, dichos autores describieron alteraciones cefálicas, anomalías oculares, curvaturas de la cola, edemas, alteraciones cardíacas, diversas anomalías intestinales, escaso desarrollo de la aleta caudal, dilatación de la aleta anal, entre otras.

Los mecanismos de toxicidad del cobre no han sido todavía bien dilucidados. El cobre, aunque normalmente se une a las proteínas, puede quedar libre siendo capaz de catalizar la formación de radicales hidroxilo altamente reactivos capaces de iniciar el daño oxidativo e interferir con eventos celulares importantes (Gaetke y Chow 2003). La toxicidad bioquímica del Cu, cuando excede el control homeostático, se deriva de sus efectos sobre la estructura y función de biomoléculas como el ADN, proteínas y moléculas de membrana o a través de radicales de oxígeno (Gaetke et al. 2014). Herkovits y Helguero (1998) sugirieron que la elevada toxicidad del cobre radica en su capacidad potenciadora de peroxidación lipídica como mecanismo de daño y muerte celular. Estos efectos pueden ser críticos para los estadios tempranos del desarrollo cuando el embrión está constituido por pocas células ya que cualquier tipo de daño celular conllevará a la muerte o degeneración del embrión. Manzl et al. (2004) reportaron que el cobre interfiere con la homeostasis del calcio, provocando su aumento intracelular. Ciertas moléculas de adhesión celular, como las cadherinas, son responsables de la cohesión de las blastómeras en las primeras etapas del desarrollo embrionario y su unión es dependiente de calcio. La disociación celular observada en embriones tempranos podría explicarse como consecuencia de una alteración en el patrón de distribución del calcio por efecto de la exposición al cobre. Esta pérdida de

cohesión celular conllevaría a que los procesos morfogenéticos posteriores (gastrulación, neurulación) se vean también alterados y, consecuentemente, los procesos organogenéticos subsiguientes.

Por otra parte, una alteración frecuentemente observada fue la microcefalia, asociada a la malformación de estructuras cefálicas. La formación de diferentes estructuras de la región cefálica del embrión depende fuertemente de la adecuada especificación, regionalización, migración y diferenciación de las células de la cresta neural. Estas células proporcionan la mayor parte del mesénquima craneofacial y por lo tanto cumplen un rol central en el desarrollo de la cabeza (Santagati y Rijli 2003, Jeong et al. 2004). Un estudio realizado con embriones de *Danio rerio* (Zhang et al. 2015) demostró que la exposición a cobre, durante estadios tempranos del desarrollo, reduce dramáticamente la expresión de *crestin* y *foxd3*, marcadores clave de las crestas neurales, causando defectos en su especificación. Las malformaciones cefálicas (microcefalia/acefalia) observadas en este trabajo podrían estar relacionadas con una alteración de los mecanismos moleculares responsables de la diferenciación de las células de la cresta neural, con la consecuentemente manifestación de anomalías morfológicas de estructuras directamente derivadas o de aquellas cuyo desarrollo es inducido por éstas. Otros tipos de malformaciones observadas podrían deberse a daños celulares provocados por “especies reactivas de oxígeno” (ROS) generadas por el aumento de los niveles de cobre en el organismo o por alteración de mecanismos moleculares, como sistemas de señalización, implicados en la morfogénesis de tejidos y órganos.

Aston et al. (2000) determinaron que el cobre provoca una disminución de la capacidad proliferativa y una pérdida de viabilidad y función celular en cultivos de hepatocitos humanos. Asimismo, estos autores plantearon que la citotoxicidad del cobre incluye la disrupción de vías de señalización involucradas en la proliferación y la muerte celular, así como también la función mitocondrial. Anjos et al., (2014) concluyeron que la generación de ROS por exposición a dosis altas de cobre es un factor esencial para el daño del ADN, y juega un papel crucial en el proceso de degradación del ADN, causando daño directo por oxidación de la molécula de ADN, o indirecto, afectando a los lípidos y proteínas que posteriormente producen daño genotóxico. Sin embargo, no hay estudios que permitan explicar en detalle los mecanismos teratogénicos del cobre y como interfiere en los procesos morfogenéticos.

Por otra parte, es importante destacar que la magnitud y el tipo de anomalías morfológicas observadas estuvieron asociados no sólo a la dosis sino también al momento específico del desarrollo en el cual ocurrió la exposición al tóxico. El tipo de malformaciones registradas en este trabajo varió en función de los procesos morfogenéticos característicos de cada estadio. Mientras que para estadios larvales avanzados (E. 25) la exposición a cobre no tuvo un severo efecto teratogénico, la exposición en estadios tempranos del desarrollo (segmentación, gastrulación y neurulación) y el periodo de organogénesis provocó severas alteraciones de la morfogénesis, afectando el desarrollo de estructuras cefálicas, branquias, cola, aleta caudal y órganos internos (particularmente el intestino).

Durante el desarrollo embrionario, diferentes sustancias químicas pueden interferir la acción de factores de transcripción que regulan la expresión genética y alterar la cascada de respuestas (Venturino et al. 2003). El efecto teratogénico del cobre no se limita a un órgano o sistema específico sino que compromete numerosos procesos morfogenéticos dependientes entre sí. Esto implica que aunque la exposición se limite a un período específico del desarrollo y afecte eventos particulares, también afectará el normal desarrollo de estructuras cuya formación es más tardía. Para el caso de la exposición en estadios larvales tempranos (E. 21-23) los efectos más frecuentes fueron las alteraciones en el desarrollo del sistema digestivo. Durante este periodo del desarrollo se producen importantes eventos del desarrollo del sistema digestivo, como su regionalización, formación de glándulas anexas (hígado y páncreas) y la formación y espiralización de las asas intestinales características de las larvas de anuros (Gómez et al. 2016). La acción tóxica del cobre, a través de un mecanismo no conocido afecta dichos procesos morfogenéticos resultando en severas alteraciones en la morfología del sistema digestivo. Por otra parte este tipo de malformaciones estuvo asociado a la presencia de hidropesía abdominal por lo que podrían ser eventos relacionados. La ausencia de malformaciones severas en estadios larvales más avanzados (E. 25) puede deberse a la presencia de mecanismos de detoxificación o balance de cobre (sistemas transportadores y chaperonas) que disminuyan su toxicidad (Henry 2000, Gaetke et al. 2014) o bien debido a que el periodo crítico donde se esbozan los principales sistemas de órganos haya sido superado. Por otra parte, a pesar de la sobrevida de estos individuos en condiciones artificiales del test de toxicidad, en el ambiente natural serían individuos biológicamente muertos o altamente susceptibles a depredadores.

Finalmente, sería interesante continuar estos estudios analizando estos individuos malformados en etapas larvales más avanzadas, incluso durante la metamorfosis, a fin de evaluar cómo afectan estas alteraciones la adquisición de la forma corporal adulta.

SECCIÓN II - ARSÉNICO

INTRODUCCIÓN

El arsénico es un metaloide que se encuentra en el agua, el suelo y el aire, proveniente de fuentes naturales y antropogénicas. Se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente, siendo un contaminante natural de los cuerpos de agua ubicados en amplias zonas de nuestro país (O'Reilly et al. 2010, Bardach et al. 2015, Litter et al. 2019). Existe en formas inorgánicas y orgánicas y en diferentes estados de oxidación (-3, 0, +3, +5) (Hughes et al. 2011) formando parte de numerosos compuestos como trióxido de arsénico, arsenito de sodio, pentóxido de arsénico y arseniato de plomo (Moreno Grau 2003). Los niveles de As en el ambiente son variables, ya que es un elemento con alta movilidad y capacidad de transformación que puede sorberse o desorberse de partículas, o cambiar de estado de oxidación al reaccionar con oxígeno u otras moléculas del aire, del agua o del suelo o por acción de microorganismos. No solo está presente en las aguas subterráneas, sino también en las aguas superficiales, y su origen varía de acuerdo con la zona que se considere. La fuente del arsénico puede ser natural, pero existen actividades humanas como la minería o la agricultura que también contribuyen a ella. Las concentraciones en cuerpos de agua varían desde menos de 1 µg As/l, en aguas superficiales sin interferencias, hasta más de 400 µg As/l en ríos y lagos afectados por aguas residuales, geotermales o industriales (Litter 2010).

El arsénico puede alcanzar elevadas concentraciones en aguas subterráneas de determinadas zonas del planeta como Taiwan, Bangladesh, India y Tailandia y en América del Sur, especialmente en la Argentina, Chile y Perú (Litter 2010). En nuestro país se han determinado contenidos de arsénico muy elevados en zonas pertenecientes a la llanura Chaco-Pampeana, Puna y Cuyo, en las provincias de Córdoba, Chaco, Salta, Tucumán, Santiago del Estero, Santa Fe, San Luis, Buenos Aires, La Pampa, Río Negro y Neuquén, Mendoza, San Juan, La Rioja, Catamarca y Jujuy. Los valores de arsénico en aguas subterráneas varían ampliamente, entre 4 y 5300 µg As/l. En algunos lugares, el 99 % de las aguas subterráneas excede los 10 µg As/l, límite recomendado para el consumo humano (Litter 2010).

Entre las fuentes antropogénicas, su presencia deriva de los usos de compuestos de arsénico como agentes conservantes de la madera y pesticidas, fundición de metales como cobre, plomo y cinc, fabricación de aleaciones y la combustión del carbón. Sus efectos sobre la salud humana constituyen el síndrome conocido como HACRE (hidroarsenismo crónico regional endémico). Se define como HACRE a la enfermedad producida por el consumo de arsénico en aguas de bebida. Se caracteriza por provocar lesiones dérmicas, así como alteraciones sistémicas cancerosas y no cancerosas, luego de un período variable de exposición a concentraciones mayores de 10 µg/l en agua de consumo diario (Litter 2018). Además, el consumo crónico de agua con arsénico es un factor de alto riesgo en relación con el cáncer de vejiga y pulmón, debido a la gran capacidad mutagénica, teratogénica y carcinogénica del arsénico (Medina-Pizzali et al. 2018). Se han encontrado también patologías vasculares de las extremidades inferiores, diabetes, hipertensión arterial y trastornos reproductivos (Litter 2010). Entre los modos de acción del arsénico, Hughes et al. (2011) señalan carcinogénesis, genotoxicidad, formación de especies reactivas de oxígeno y alteración de la reparación del ADN, de eventos de señalización celular, de la proliferación celular y de los patrones de metilación del ADN.

La exposición al arsénico se produce por inhalación, absorción a través de la piel y, principalmente, por ingestión, por ejemplo, de agua potable contaminada. Cuando es absorbido sufre biometilación hepática para formar compuestos menos tóxicos pero no completamente inocuos. En la ingestión crónica, el arsénico se acumula en el hígado, los riñones, el corazón y los pulmones y cantidades más pequeñas en los músculos, el sistema nervioso, el tracto gastrointestinal y el bazo. Aunque la mayor parte se elimina de estos sitios, quedan cantidades residuales en los tejidos ricos en queratina, las uñas, el cabello y la piel. Desde el punto de vista toxicológico, puede generar multiplicidad de efectos adversos como afecciones pulmonares, hepáticas, cardiovasculares, alteraciones neurológicas y del desarrollo. El arsénico ejerce su toxicidad al inactivar hasta 200 enzimas, especialmente aquellas involucradas en las vías de energía celular y la síntesis y reparación del ADN (Ratnaike 2003).

El metabolismo del arsénico tiene un papel importante en su toxicidad e implica la reducción al estado trivalente y la metilación oxidativa al estado pentavalente. Los arsenicales trivalentes, incluidos los metilados, tienen propiedades tóxicas más potentes que los arsenicales pentavalentes. Se desconoce el mecanismo exacto de acción del

arsénico, pero se han propuesto varias hipótesis. A nivel bioquímico, el arsénico inorgánico en estado pentavalente puede reemplazar al fosfato en varias reacciones. En el estado trivalente, el arsénico inorgánico y orgánico (metilado) puede reaccionar con tioles en proteínas esenciales e inhibir su actividad. Se ha reportado genotoxicidad, mutagenicidad y carcinogénesis por exposición crónica al arsénico, siendo letal a elevadas concentraciones (Singh et al. 2011). En relación a su capacidad carcinogénica, los mecanismos potenciales de este metaloide incluyen metilación del ADN, stress oxidativo, alteración de la proliferación celular y desregulación epigenética entre otros. (Hughes 2002, Bhattacharjee et al. 2013, Sodhi et al. 2019). Estudios realizados con mamíferos de laboratorio (hámster, rata, ratón y conejo) han demostrado que el As inorgánico produce alteraciones del desarrollo que incluyen malformaciones, retraso en el crecimiento y muerte del embrión. Asimismo, su capacidad para acumularse en las redes tróficas de agua dulce ha sido demostrada (Rahman, et al. 2012.)

La tabla 1 muestra los valores de CL 50 reportados para anfibios anuros.

Tabla 1. Valores de CL50 de arsénico para embriones y larvas de distintas especies de anuros. Datos obtenidos de: ECOTOX (Ecotoxicology Knowledgebase) y Linder y Grillitsch (2000).

ESPECIE	COMPUESTO	ESTADIO	CL 50 (mg/l)	REFERENCIA
<i>Adelotus brevis</i>	Arsenito de sodio	Larvas	55	Johnson (1976)
<i>Bufo marinus</i>	Arsenito de sodio	Embriones	0,04	Birge et al. (1979)
<i>Euphlyctis cyanophlyctis</i>	Trióxido de arsénico	Larvas	32,6 - 73,5	Samanta et al. (2020)
<i>Euphlyctis hexadactylus</i>	Óxido de arsénico	Larvas	0,25-0,37	Khangarot et al. (1985)
<i>Limnodynastes peroni</i>	Arsenito de sodio	Larvas	34,6	Johnson (1976)
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Arsenito de sodio	Larvas	25	Birge et al. (1979)
<i>Rhinella arenarum</i>	Arsenito de sodio	Embriones	24,3	Mardirosian et al. (2015)
<i>Rhinella arenarum</i>	Arsenito de sodio	Larvas	37,3	Lajmanovich et al. (2019)
<i>Rhinella arenarum</i>	Arsenito de sodio	Larvas	46 - 50	Brodeur et al. (2009)

Otros estudios han reportado efectos subletales como estrés oxidativo (Mardirosian et al. 2015), inhibición de la actividad de glutatión S-transferasa (GST) (Samanta et al. 2020), inhibición de la acetilcolinesterasa (Lajmanovich et al. 2019), disrupción endocrina (Davey et al. 2008) por efecto de este metaloide.

El presente trabajo tuvo como propósito evaluar el efecto letal y teratogénico del arsénico durante el desarrollo embrionario y larval de *Rhinella arenarum* y determinar la susceptibilidad estadio-dependiente.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Analizar comparativamente la toxicidad del arsénico As (III) durante el desarrollo embrionario y larval temprano de *Rhinella arenarum*.
- 2) Evaluar la susceptibilidad estadio-dependiente a As(III) e identificar los estadios embrionarios y/o larvales más sensibles a su acción tóxica.
- 3) Evaluar los efectos letales y subletales como narcosis, alteraciones del comportamiento, alteraciones morfológicas (teratogénesis), retraso en el desarrollo y alteraciones del crecimiento, por exposición a As(III).

METODOLOGÍA

Metodología empleada para los estudios con arsénico

Se preparó una solución madre de Arsenito de Sodio, NaAsO₂, As(III) de 0,05 mol/L (0,1 N), a partir de la cual se prepararon las distintas soluciones de ensayo.

Se realizaron los siguientes bioensayos:

- 1) Test AMPHISHORT. Ensayo crónico corto semiestático de 168 h de exposición a As(III) con larvas de *Rhinella arenarum* a partir del E. 25 (opérculo completo). Concentraciones de ensayo: 10, 15, 30, 45, 60, 80 y 100 mg As(III)/l, más CSA. Renovación del medio cada 48 h.
- 2) Test AMPHIEMB. Ensayo semiestático con embriones de *Rhinella arenarum* a partir del E. 4 (4 blastómeros) y durante 360 h (15 días) de exposición. Concentraciones de ensayo: 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15; 20 y 25 mg As(III)/l, más CSA. Renovación del medio cada 48 h.
- 3) Test de EXPOSICIÓN POR PULSO. Ensayo de exposición durante 24 h y posterior cambio a SA en diferentes estadios del desarrollo embrionario y

larval de *Rhinella arenarum*. Estadios del desarrollo: E. 4 (4 blastómeros), E. 10 (labio dorsal del blastoporo), E. 12 (gástrula avanzada), E. 18 (respuesta muscular), E. 20 (circulación branquial), E. 21 (boca abierta), E. 23 (pliegue opercular) y E. 25 (opérculo completo). Rango de concentraciones de ensayo: 10-120 mg As(III)/l, más CSA.

Puntos finales

Los parámetros de toxicidad evaluados fueron: letalidad y efectos subletales (narcosis, alteraciones del comportamiento, alteraciones morfológicas (teratogénesis), retraso en el desarrollo y alteraciones del crecimiento).

RESULTADOS

1) Test AMPHISHORT. Exposición crónica corta de larvas en E. 25 (opérculo completo) a As(III)

Letalidad

Al igual que en el CSA, la sobrevida en la concentración de 10 mg As(III)/l fue del 100 %. El efecto letal del arsénico se manifestó a partir de concentraciones de 20 mg As/l dentro de las primeras horas de ensayo, con un efecto acumulativo durante las 168 h de exposición. Concentraciones de 80 y 100 mg As(III)/l disminuyeron la sobrevida al 0 % a las 24 h de ensayo. Al finalizar en ensayo, la sobrevida en las concentraciones de 20, 40 y 60 mg As(III)/l fue del 70, 57 y 0 %, respectivamente (Figura 1). Las CLs 10, 50 y 90, con sus correspondientes límites de confianza (95 %), calculadas a las 168 h de ensayo fueron: 24,7 (17,4-37,2); 48,8 (33,3-76,1) y 98,1(64,8-158,9) mg As(III)/l, respectivamente.

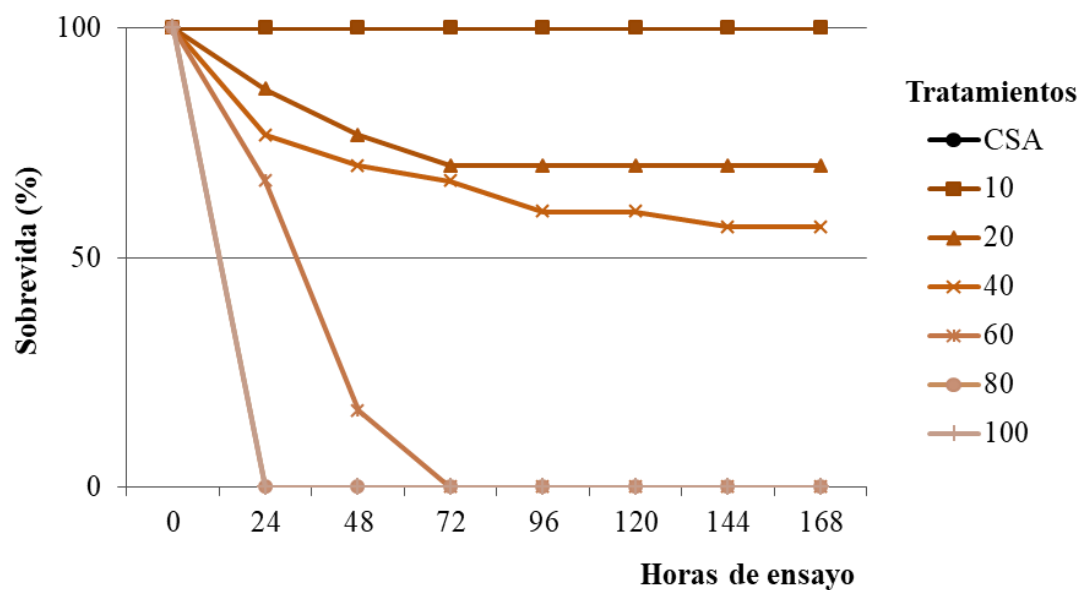


Figura 1. Curvas de sobrevivida de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en E. 25 (opérculo completo) a As (III) durante 168 h. Las concentraciones de los tratamientos se expresan en mg As(III)/l.

Alteraciones de la morfología y el crecimiento

A las 24 h de ensayo, los individuos tratados con 20 y 40 mg As(III)/l mostraron escasa respuesta al estímulo y presentaron movimientos espasmódicos, mientras que los tratados con 60 mg As(III)/l presentaron narcosis. En las horas subsiguientes, los individuos sobrevivientes presentaron escasa reacción al estímulo y natación lenta. Al finalizar el ensayo, los individuos sobrevivientes no presentaron alteraciones morfológicas, no diferenciándose del CSA.

2) Test AMPHIEMB. Exposición a partir del E. 4 (4 blastómeros) a As(III)

Letalidad

La exposición continua a As(III) a partir del E. 4 tuvo un marcado efecto letal a partir de concentraciones de 20 y 25 mg As(III)/l, dentro de las 96 h de ensayo (figura 2). La mortalidad en concentraciones de hasta 5 mg As/l no se diferenció de la del CSA, siendo alrededor del 10 y 15 %, mientras 10 y 15 mg As(III)/l causaron alrededor de un 30 % de letalidad, al finalizar el ensayo. Cabe destacar que el efecto letal se manifestó independiente de la renovación del medio. Como se observa en la figura 2, en la

mayoría de las concentraciones no se registró aumento del número de muertos luego del cambio de solución. Las CLs 10, 50 y 90, con sus correspondientes límites de confianza (95%), calculadas a las 96 h de ensayo fueron: 0,8 (0,33-2,3), 16,1 (6-42) y 289 (108,5-774,5) mg As(III)/l respectivamente, mientras que para las 360 h de ensayo fueron de 0,6 (0,3-1,3), 10,8 (5,4-21,5) y 173 (87-345) mg As(III)/l respectivamente.

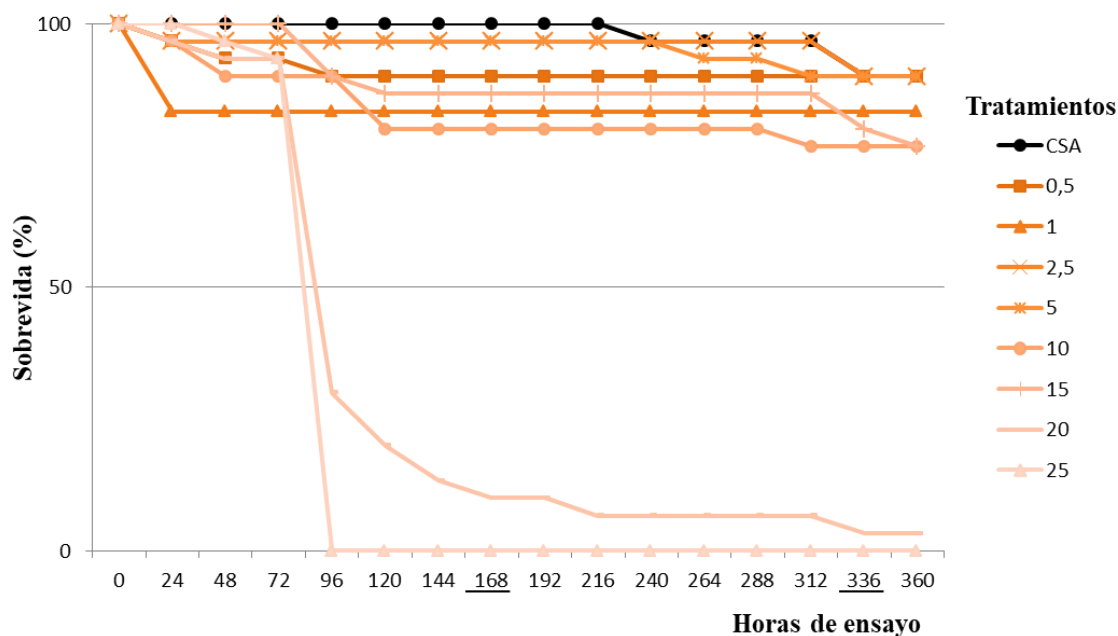


Figura 2. Curvas de supervivencia de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en E. 4 (4 blastómeros) a As(III) durante 360 h (15 días). Las concentraciones de los tratamientos se expresan en mg As(III)/l.

Alteraciones de la morfología y el crecimiento

A las 24 h de ensayo, no se observaron alteraciones en la morfología de los embriones tratados con As(III), ni en los controles; ambos grupos alcanzaron el estadio de gástrula avanzada. A partir de las 48 h de exposición, los individuos del CSA y los tratados con hasta 5 mg As(III)/l alcanzaron el estadio de tubo neural y mostraron morfología normal. Alrededor del 10 % de los tratados con concentraciones de 10, 15, 20 y 25 mg As(III)/l presentó persistencia de plaquetas vitelinas, fallas en el cierre del blastoporo y falla en la fusión de los pliegues neurales (Figura 3). A las 72 h de ensayo, los individuos del CSA y tratados con hasta 5 mg As(III)/l alcanzaron el estadio de respuesta muscular observándose, respuesta normal al estímulo táctil. Los tratados con concentraciones superiores presentaron retraso en el desarrollo, persistencia de

plaquetas vitelinas, fallas en el cierre del blastoporo, anomalías cefálicas, agenesia o subdesarrollo de la cola, agenesia de branquias externas, incurvaciones del eje, descamación celular y abdomen globoso (Figura 3). Estas alteraciones se registraron en aproximadamente en 10 % de los expuestos a 10 y 15 mg As(III)/l y en el 100 % de los tratados con 20 y 25 mg As(III)/l. A las 96 h de ensayo, la sobrevida en estas últimas concentraciones fue del 30 y 0 %, respectivamente. Alrededor de las 144 h de ensayo, los individuos del CSA y los tratados con arsénico alcanzaron el estadio de boca abierta, aunque los expuestos a concentraciones de 10, 15 y 20 mg As(III)/l presentaron hidropesía, subdesarrollo de filamentos branquiales externos, subdesarrollo general, hidropesía, y/o incurvaciones del eje. El índice teratogénico calculado fue: 1,3.

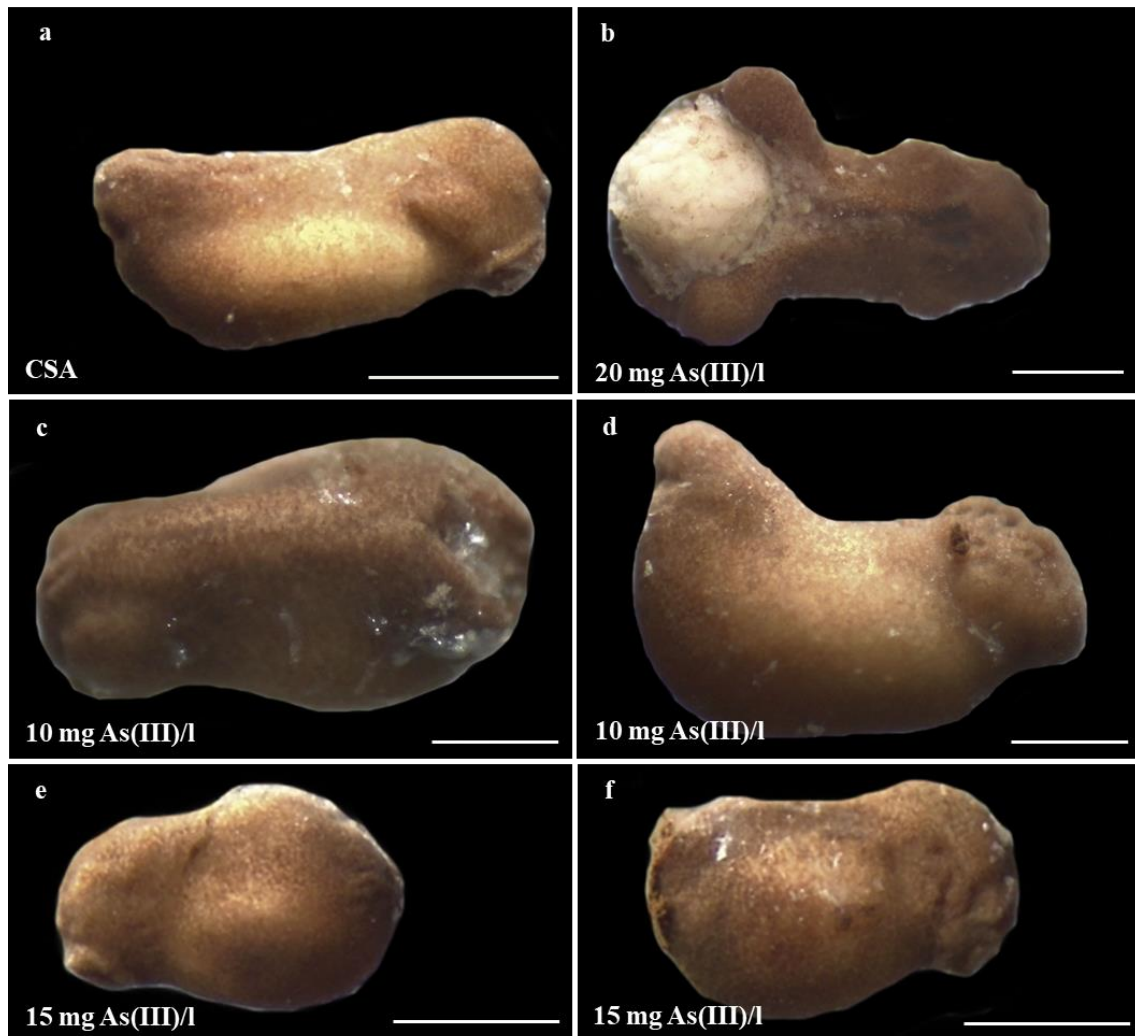


Figura 3. Alteraciones morfológicas de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos de forma continua a As(III) a partir del E. 4 (4 blástómeros). a) Embrión en E. 17 (brote caudal), b) Embrión con persistencia de plaquetas vitelinas y falla en el cierre del blastoporo y en la fusión de pliegues neurales. c) Embrión con microcefalia, persistencia de blastoporo y desprendimiento de plaquetas vitelinas. d) Embrión con anomalías morfológicas. e) Embrión con anomalías morfológicas. f) Embrión con anomalías morfológicas.

cefálicas, agenesia de branquias externas e incurvación del eje. e y f) Embriones con microcefalia, abdomen globoso, agenesia de estructuras cefálicas y agenesia de cola. Escala: a: 1 mm, b-f) 0,5 mm.

3) Test de EXPOSICIÓN POR PULSO. Exposición de embriones y larvas en distintos estadios del desarrollo a As(III) por 24 h

Letalidad

Si bien se registraron diferencias en las CL 50 calculadas para los distintos estadios del desarrollo ensayados (Figura 4), su comparación no mostró diferencias estadísticamente significativas ($F_{6,26} = 1,26$, $P = 0,3094$) en la sensibilidad al arsénico. Esto desataca que el arsénico tiene un efecto tóxico semejante en cualquier etapa del desarrollo, siendo embriones y larvas susceptibles a su efecto letal.

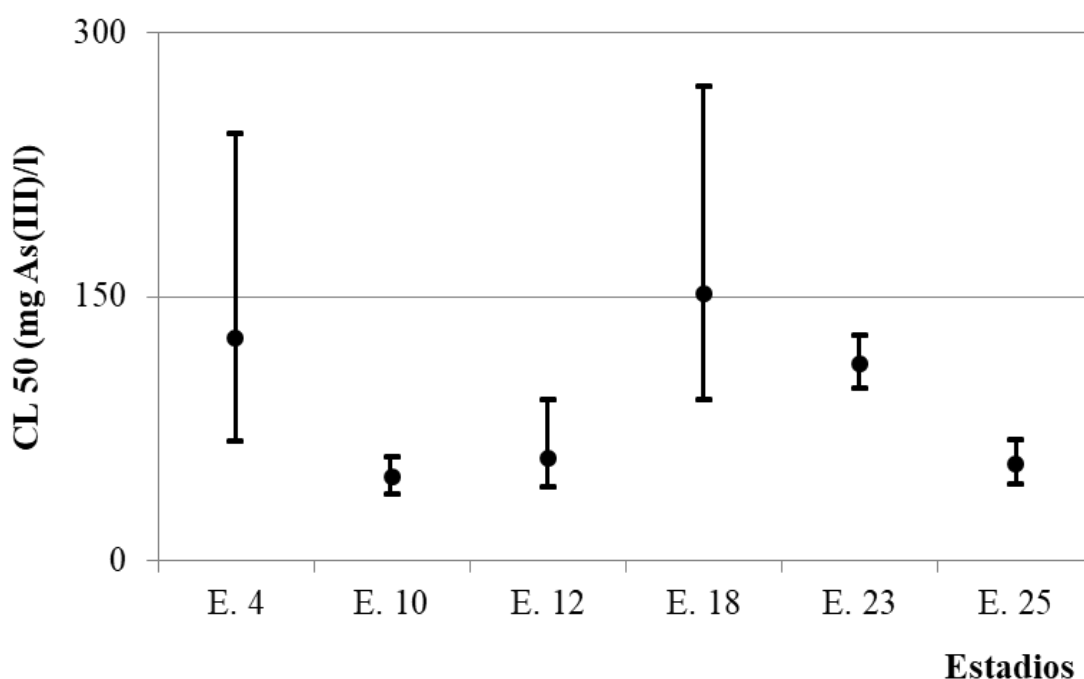


Figura 4. Comparación de los valores de CL 50 calculados para distintos estadios embrionarios y larvales de *Rhinella arenarum* expuestos a Arsénico (III) por pulso de 24 h.

Alteraciones de la morfología y el crecimiento

Las malformaciones variaron en función de la concentración y del estadio en el cual se realizó la exposición y se describen a continuación.

Exposición en E. 4 (4 blastómeros)

El 90 % de los individuos del CSA y los expuestos a concentraciones de hasta 20 mg As(III)/l tuvieron un desarrollo normal durante las 144 h de exposición alcanzando el E. 24 (opérculo cerrado en la derecha) al finalizar el ensayo. La exposición a concentraciones de 40, 60 y 80 mg As(III)/l produjo anomalías del desarrollo desde las primeras horas de exposición. En dichas concentraciones se registraron retraso en el desarrollo, anomalías en la gastrulación, embriones con persistencia a plaquetas vitelinas y fallas en la fusión de los pliegues neurales.

Al avanzar el desarrollo, estos embriones presentaron forma anómala con abdomen globoso, incurvaciones del eje, espina bífida, subdesarrollo o agenesia de la cola y/o microcefalia con malformación de estructuras del disco oral y agenesia o subdesarrollo de branquias externas, hidropesía y anomalías en la formación del pliegue opercular (Figura 5). Dichas anomalías se registraron en aproximadamente el 20 % de los embriones tratados con 10, 20 y 40 mg As(III)/l, en el 80 % de los tratados con 60 mg As(III)/l y en el 100 % de los tratados con 80 mg As(III)/l. La exposición a 100 mg As(III)/l causó el detenimiento del desarrollo en el 100 % de los embriones, dentro de las primeras 24 h.

Al finalizar el ensayo, los sobrevivientes tratados con As(III) alcanzaron el E. 23 (pliegue opercular), igual que los controles. Sin embargo, los expuestos a As(III) presentaron incurvaciones del eje, microcefalia, malformación del pliegue opercular, hidropesía con agenesia o malformación de órganos internos, rugosidades del epitelio, agenesia o subdesarrollo de branquias y/o malformación de las estructuras del disco oral (Figura 5). El análisis de la varianza no mostró diferencias significativas ($P = 0,0416$) en la talla alcanzada por las larvas del CSA y la de los tratamientos.

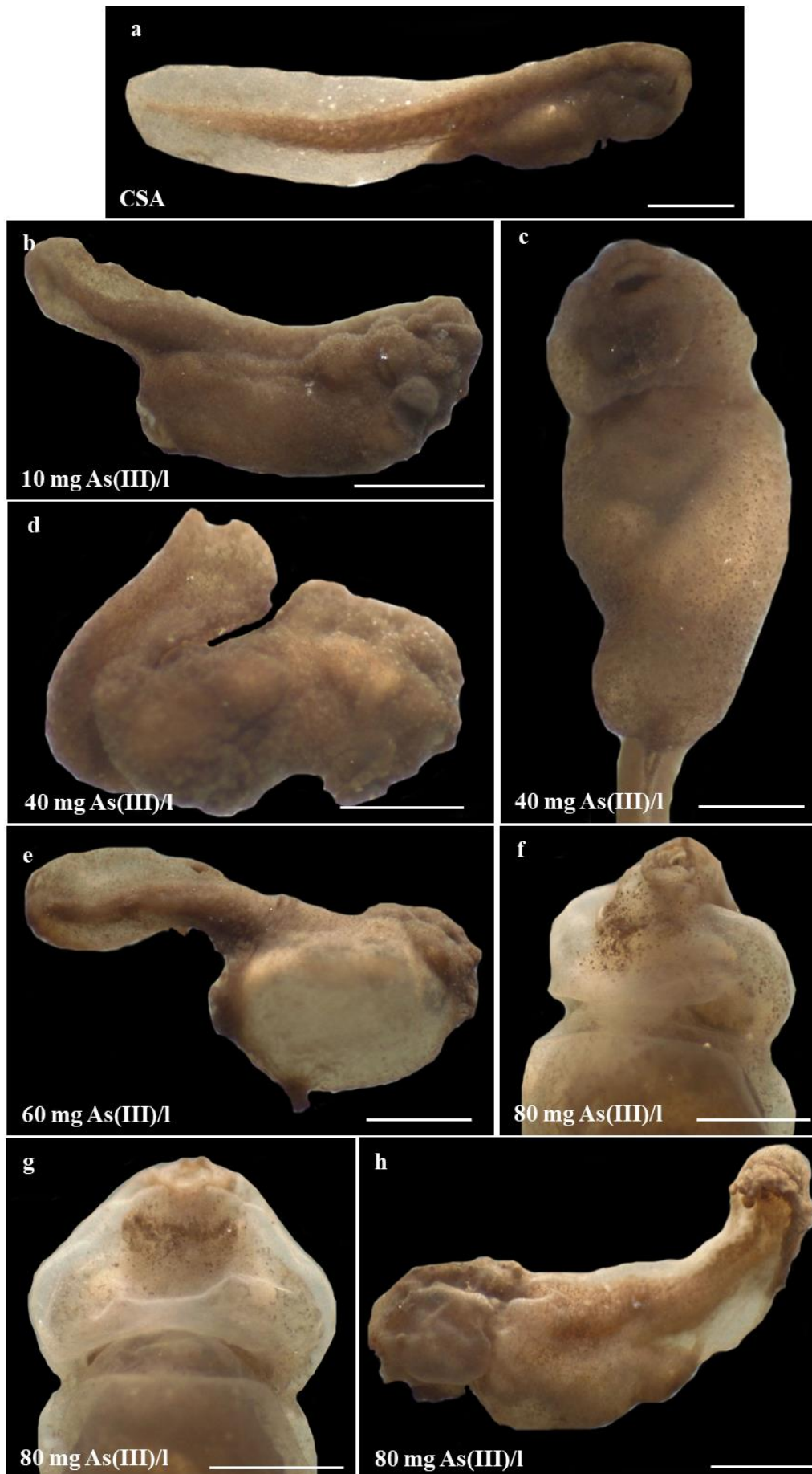


Figura 5. Alteraciones morfológicas de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a As(III) por pulso de 24 h, a partir del E. 4 (4 blastómeros). a) Larva en E. 24 (opérculo cerrado a la derecha), b) Embrión con anomalías cefálicas, agenesia de branquias externas, subdesarrollo caudal, malformación de estructuras del disco oral, c) Larva con incurvación del eje, malformación de estructuras del disco oral y papilas adhesivas, d) Larva con severas malformaciones cefálicas, severa incurvación de la cola, subdesarrollo caudal, repliegues tegumentarios, e) Larva severamente malformada, con microcefalia, malformación/agenesia de branquias externas y estructuras del disco oral y papilas adhesivas, severa hidropesía con agenesia de órganos internos, y subdesarrollo caudal, f y g) Larvas con severa hidropesía, malformación de estructuras del disco oral, agenesia de branquias externas y malformación del pliegue opercular, h) larva con hidropesía branquial, subdesarrollo de la cola y repliegues tegumentarios en el extremo de la cola e incurvación. Escala: a-c, e-h: 1 mm, d: 0,5 mm.

Exposición en E. 10 (labio dorsal del blastoporo)

A las 24 h de ensayo, los individuos del CSA y los tratados con 10 mg As(III)/l alcanzaron el E. 15 (rotación) presentando aspecto normal. El 10 % de los tratados con 20 y los tratados con 20 mg As(III)/l presentaron retraso en el desarrollo y anomalías para completar la gastrulación e iniciar la neurulación, mostrando persistencia de plaquetas vitelinas. Más del 50 % de los embriones expuestos a 60, 80, y 100 mg As(III)/l presentaron descamación celular, persistencia de plaquetas vitelinas, fallas en la formación de la placa neural o fallas en la fusión de los pliegues neurales, mostrando una morfología general muy alterada. A las 48 h de ensayo, estos embriones presentaron incurvaciones de la cola, abdomen globoso, microcefalia, subdesarrollo de la cola y anomalías en la formación del tubo neural. El 100 % de los embriones tratados con 80 y 100 mg As(III)/l presentó severas malformaciones no pudiendo reconocerse estructuras larvales características.

Al finalizar el ensayo, los individuos del CSA y los tratados con hasta 20 mg As(III)/l alcanzaron el E. 23 (pliegue opercular), mientras que entre el 30 y el 100 % de los sobrevivientes tratados con 40 mg As(III)/l y superiores presentaron severas incurvaciones de la cola, anomalías cefálicas, malformación de estructuras del disco oral, anomalías en la formación del pliegue opercular, subdesarrollo de la cola y aleta caudal, hidropesía con agenesia o malformación de órganos internos y/o crecimiento anómalo del tegumento (repliegues, excrescencias, tumoraciones) (Figura 6). El análisis de la varianza no mostró diferencias significativas ($p > 0,01$) en la talla de los individuos sobrevivientes tratados con As(III) y los del CSA.

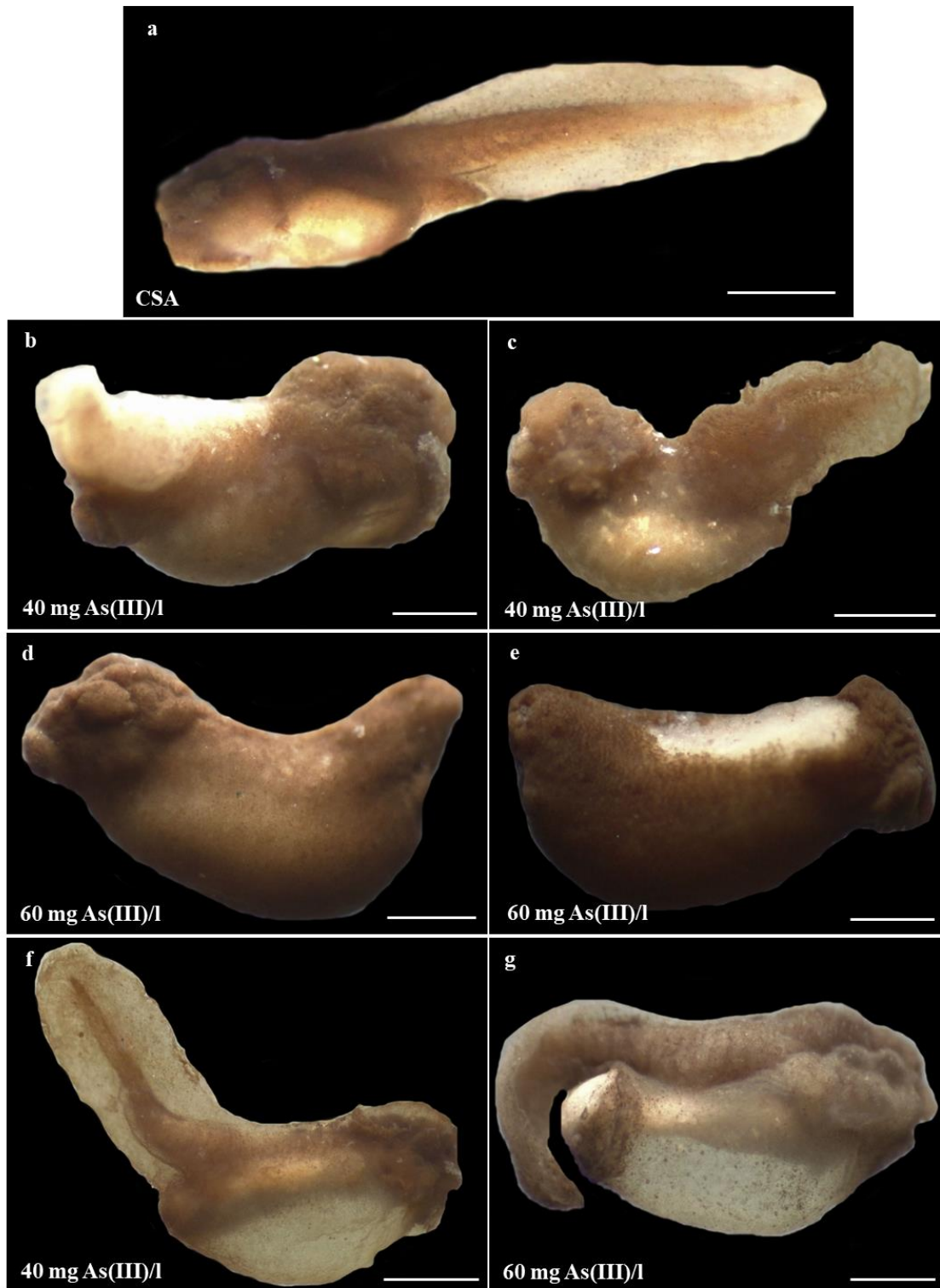


Figura 6. Alteraciones morfológicas de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a As(III) por pulso de 24 h, a partir del E. 10 (labio dorsal del blastoporo). a) Larva en E. 24 (opérculo cerrado en la derecha), b) Embrión con anomalías cefálicas, agenesia de branquias externas, persistencia de plaquetas vitelinas y falla en el cierre del blastoporo y fusión de pliegues neurales post cefálicos, c) Embrión con microcefalia, agenesia de branquias externas, severa incurvación del eje, subdesarrollo de la cola y aleta caudal, d)

Embrión con anomalías cefálicas, agenesia de branquias externas, tumoraciones cefálicas, e incurvación del eje, e) Embrión con persistencia del blastoporo, falla en la fusión de los pliegues neurales, persistencia de plaquetas vitelinas, anomalías cefálicas, f y g) Larvas con microcefalia, agenesia de branquias externas, severa hidropesía abdominal con agenesia de órganos internos, incurvaciones de la cola y persistencia de plaquetas vitelinas. Escala: a, f: 1 mm, b-e, g) 0,5 mm.

Exposición en E. 12 (gástrula tardía)

A las 24 h de ensayo, los individuos del CSA y los tratados con 10 mg As(III)/l alcanzaron el E. 17 (brote caudal) mientras que los tratados con 20, 40, 60, 80 y 100 mg As(III)/l presentaron retraso en el desarrollo. Asimismo, los expuestos a 60, 80 y 100 mg As(III)/l mostraron fallas en la fusión de los pliegues neurales, agenesia del brote caudal, subdesarrollo general, incurvaciones del eje y/o abdomen globoso.

A las 48 h de ensayo, el 100 % de los tratados con 100 mg As(III)/l detuvo su desarrollo, mientras que los embriones de CSA alcanzaron el E. 19 (latido cardiaco). Los expuestos a 60 y 80 mg As(III)/l presentaron subdesarrollo general y severas malformaciones como agenesia o subdesarrollo de la cola, hidropesía, microcefalia con malformación de estructuras del disco oral y branquias externas y descamación de células del epitelio tegumentario.

Al finalizar el ensayo, los individuos del CSA alcanzaron el E. 24 (opérculo cerrado a la derecha). El 100 % de los sobrevivientes tratados con 60 y 80 mg As(III)/l presentaron anomalías morfológicas como incurvaciones del eje, microcefalia, malformación de estructuras del disco oral y branquias externas, hidropesía con malformación de órganos internos, subdesarrollo de la cola y aleta caudal, repliegues y tumoraciones del tegumento, persistencia de plaquetas vitelinas (Figura 7).

Asimismo, en embriones tratados con 80 mg As(III)/l se observó agenesia de branquias internas y anomalías morfológicas del corazón evidenciándose la persistencia de un corazón en etapa de torsión, sin regionalización de cámaras. Entre las anomalías de sistema digestivo se evidenció persistencia de esbozos de hígado y páncreas y tubo digestivo simple tubular con persistencia de vitelo (Figura 8).

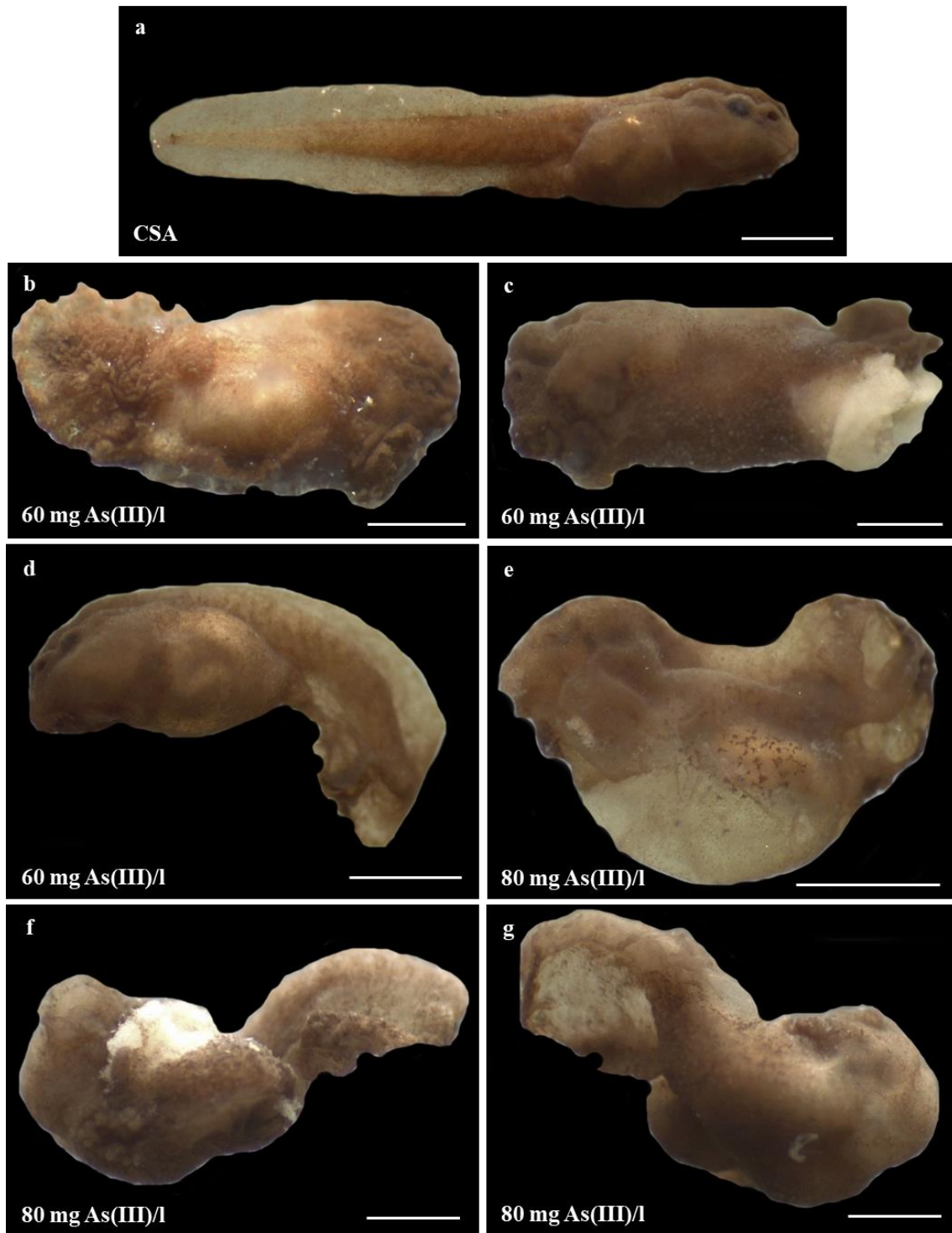


Figura 7. Alteraciones morfológicas de embriones y larvas de *Rhinella arenarum* expuestos a As(III) por pulso de 24 h, a partir del E. 12 (gástrula tardía). a) Larva en E. 25 (opérculo completo), b) Embrión severamente malformado con subdesarrollo general, anomalías cefálicas, agenesia de cola, repliegues del tegumento, c) Embrión severamente malformado con microcefalia, agenesia de cola, persistencia de plaquetas vitelinas, persistencia de blastoporo, d) Larva con severa incurvación de la cola, aleta caudal con repliegues tegumentarios, e) Embrión con malformación cefálica, agenesia de cola, repliegues tegumentarios, severa hidropesía con malformación de órganos

internos, f y g) Larvas severamente malformadas, agenesia cefálica, incurvación axial, persistencia de plaquetas vitelinas Escala: a: 1 mm, b-g) 0,5 mm.

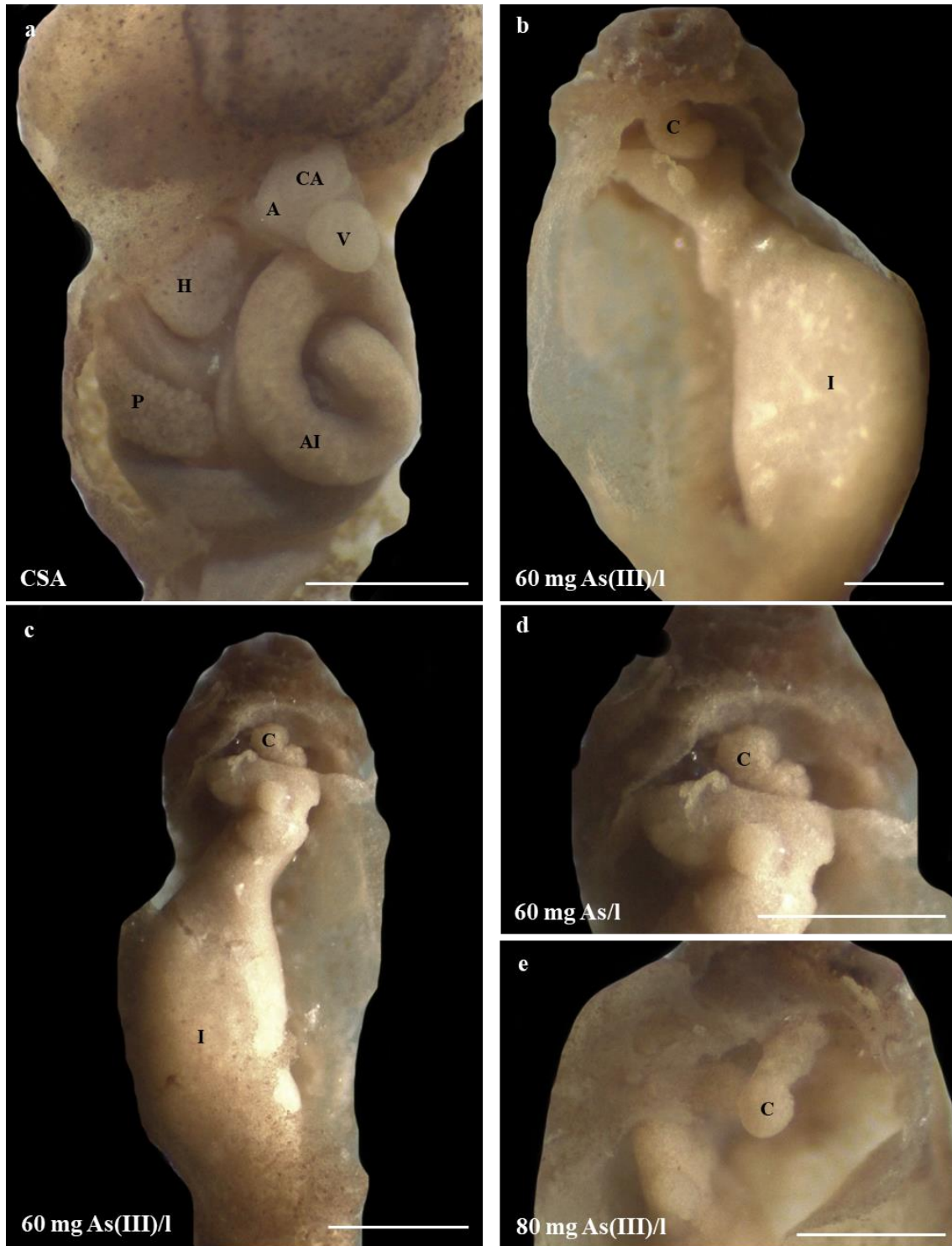


Figura 8. Alteraciones morfológicas de órganos internos de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a As(III) por pulso de 24 h, a partir del E. 12 (gástrula tardía). a) Larva en E. 25 (opérculo completo), b y c) Larvas con anomalías en la regionalización del tubo digestivo y glándulas anexas. Nótese que el tubo digestivo permanece como un tubo lineal (con acumulación de plaquetas vitelinas, d y e) Detalle de la región cardíaca

donde se observa que el corazón permanece en etapa de looping sin regionalización evidente. Referencias: **A**: aurícula, **AI**: asas intestinales, **C**: corazón, **CA**: cono arterial, **H**: hígado, **I**: intestino, **P**: páncreas, **V**: Ventrículo. Escala: 0,5 mm.

El análisis de la varianza mostró diferencias significativas ($F_{5,47} = 39,9$, $P = < 0,0001$) en la talla de los individuos tratados con 40, 60 y 80 mg As(III)/l con respecto al CSA, siendo menor en los tratados con el metaloide (Figura 9).

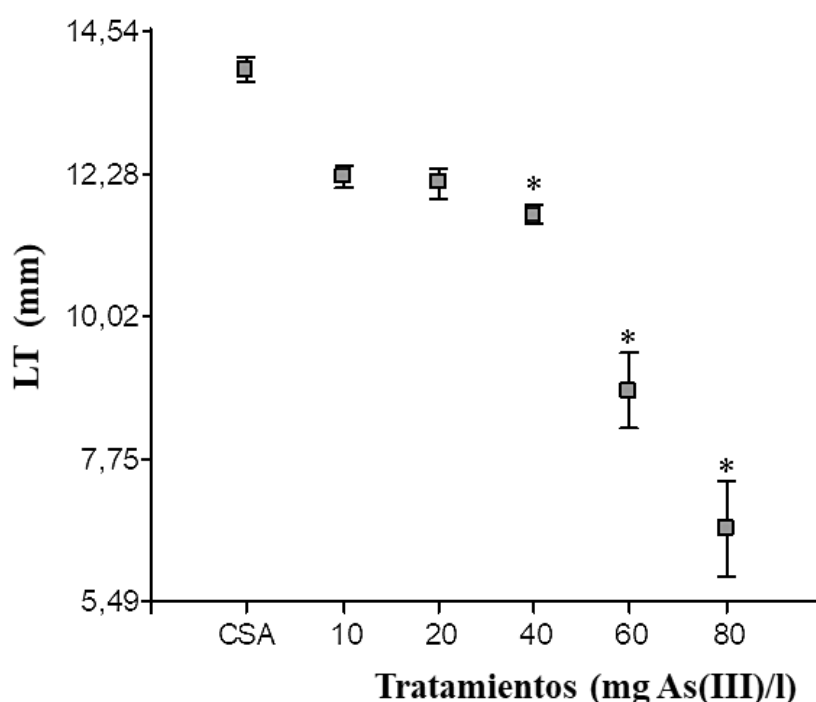


Figura 9. Comparación de la Longitud Total (LT) alcanzada por las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a As(III) a partir del E. 12 (gástrula tardía), por pulso de 24 h. Los asteriscos indican diferencia significativa con el CSA ($p < 0,01$).

Exposición en E. 18 (respuesta muscular)

A las 24 h de exposición, los individuos del CSA alcanzaron el E. 20 (circulación branquial) observándose un buen desarrollo de los filamentos branquiales externos. Los embriones expuestos a un rango de concentraciones de entre 10 y 80 mg As(III)/l mostraron agenesia o subdesarrollo de filamentos branquiales externos y una circulación sanguínea incipiente de las mismas. Asimismo, los expuestos a 80 mg As(III)/l presentaron descamación de células del tegumento, malformación de papilas adhesivas e incurvaciones. Estos embriones mostraron escasa reacción al estímulo táctil,

con contracciones laterales de la cola pero sin desplazamiento. En las horas subsiguientes presentaron subdesarrollo general, malformación de estructuras del disco oral y discos adhesivos, hidropesía branquial y de la aleta caudal y escasa reacción con contracciones espasmódicas. Los embriones expuestos a 90 y 100 mg As(III)/l detuvieron su desarrollo a las 48 y 24 h, respectivamente.

Al finalizar el ensayo, los individuos del CSA y los tratados con arsénico alcanzaron el E. 25. El 10 % sobrevivientes expuestos a 60 mg As(III)/l presentó incurvaciones de la cola y el 35 % de los sobrevivientes a 80 mg As(III)/l presentaron hidropesía, malformación de estructuras del disco oral y del pliegue opercular (Figura 10). El análisis de la varianza no mostró diferencias significativa ($P > 0,01$) en la talla de los individuos tratados con arsénico en comparación con el CSA.

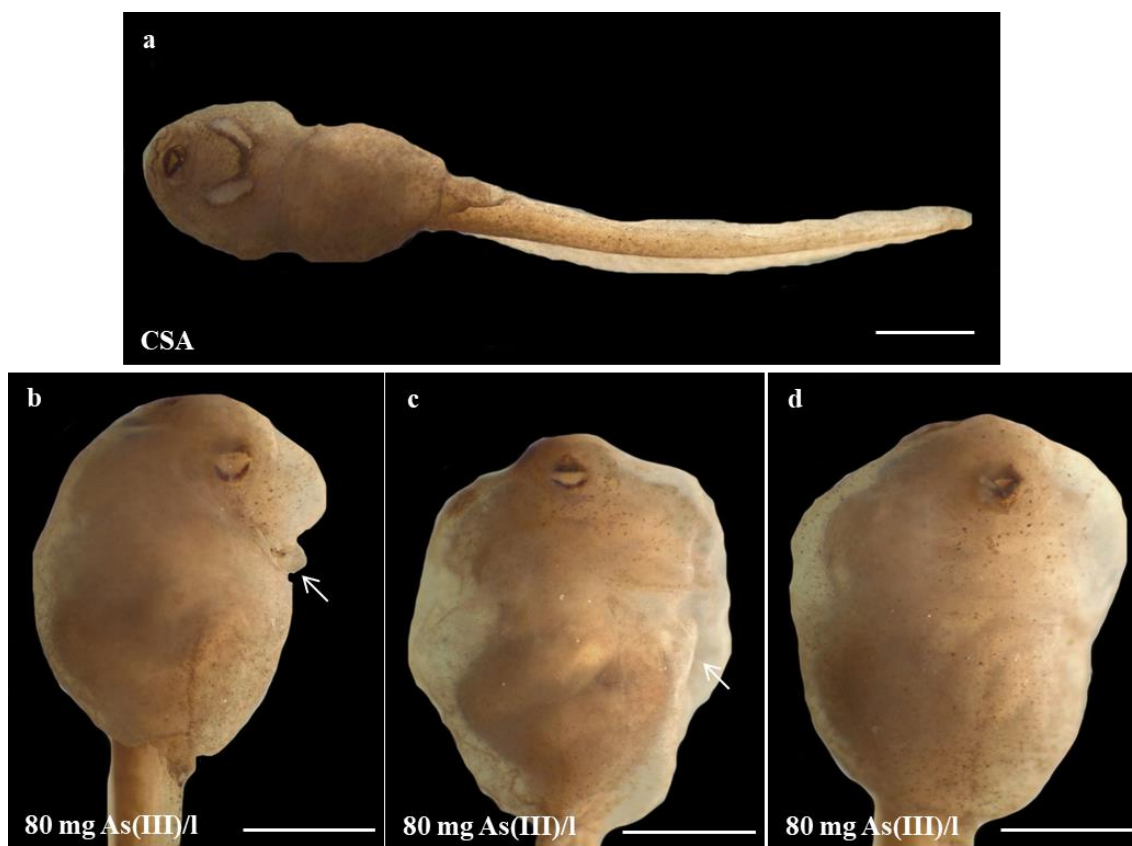


Figura 10. Alteraciones morfológicas de órganos internos de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a As(III) por pulso de 24 h, a partir del E. 18 (respuesta muscular). a) Larva control en E. 25 (opérculo completo). b-d) Larvas expuestas a As(III) con hidropesía severa, malformación de estructuras del disco oral (ausencia de dentículos córneos, agenesia de papilas marginales) y malformación del pliegue opercular. Escala: 1 mm.

Exposición en E. 20 (circulación branquial)

A las 24 h de exposición los individuos del CSA y los tratados con 10, 20, 30, 40, 60 y 80 mg As(III)/l alcanzaron el E. 22 (circulación en la aleta de la cola), llegando al E. 25 a las 96 h de ensayo. Al finalizar el ensayo, el 15 % de los tratados con concentraciones de 10 a 70 mg As(III)/l presentó hidropesía e incurvaciones de la cola. El 100 % de los tratados con 80 mg As(III)/l presentó hidropesía de los cuales el 15 % mostró malformación de asas intestinales y subdesarrollo o agenesia de hígado y páncreas (Figura 11). El análisis de la varianza no mostró diferencias significativas ($P > 0,01$) en la talla alcanzada por las larvas tratadas con arsénico en comparación con las del CSA.



Figura 11. Alteraciones morfológicas de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a As(III) por pulso de 24 h, a partir del E. 20 (circulación branquial). a) Larva control en E. 25 (opérculo completo), b) Larva tratada con As(III) con severa hidropesía e incurvación de la cola. c) Larva tratada con severa incurvación, d y e) Larvas tratadas con anomalías intestinales y subdesarrollo de glándulas anexas. Escala: 1 mm.

Exposición en E. 23 (pliegue opercular)

A las 24 h de ensayo, los individuos del CSA alcanzaron el E. 25, completando la formación del pliegue opercular y del espiráculo. La exposición a concentraciones de

hasta 60 mg As(III)/l no causaron alteraciones en la morfología de las larvas. Al finalizar el ensayo, los individuos expuestos a concentraciones de 80, 100, 120 y 140 mg As(III)/l presentaron severa hidropesía, ondulaciones de la aleta caudal, incurvaciones de la cola y malformación del pliegue opercular y estructuras del disco oral. Asimismo, en las concentraciones de 120 y 140 mg As(III)/l se observó, además, individuos con severas anomalías cefálicas, marcada incurvación caudal y repliegues y tumoraciones tegumentarias (Figura 12).

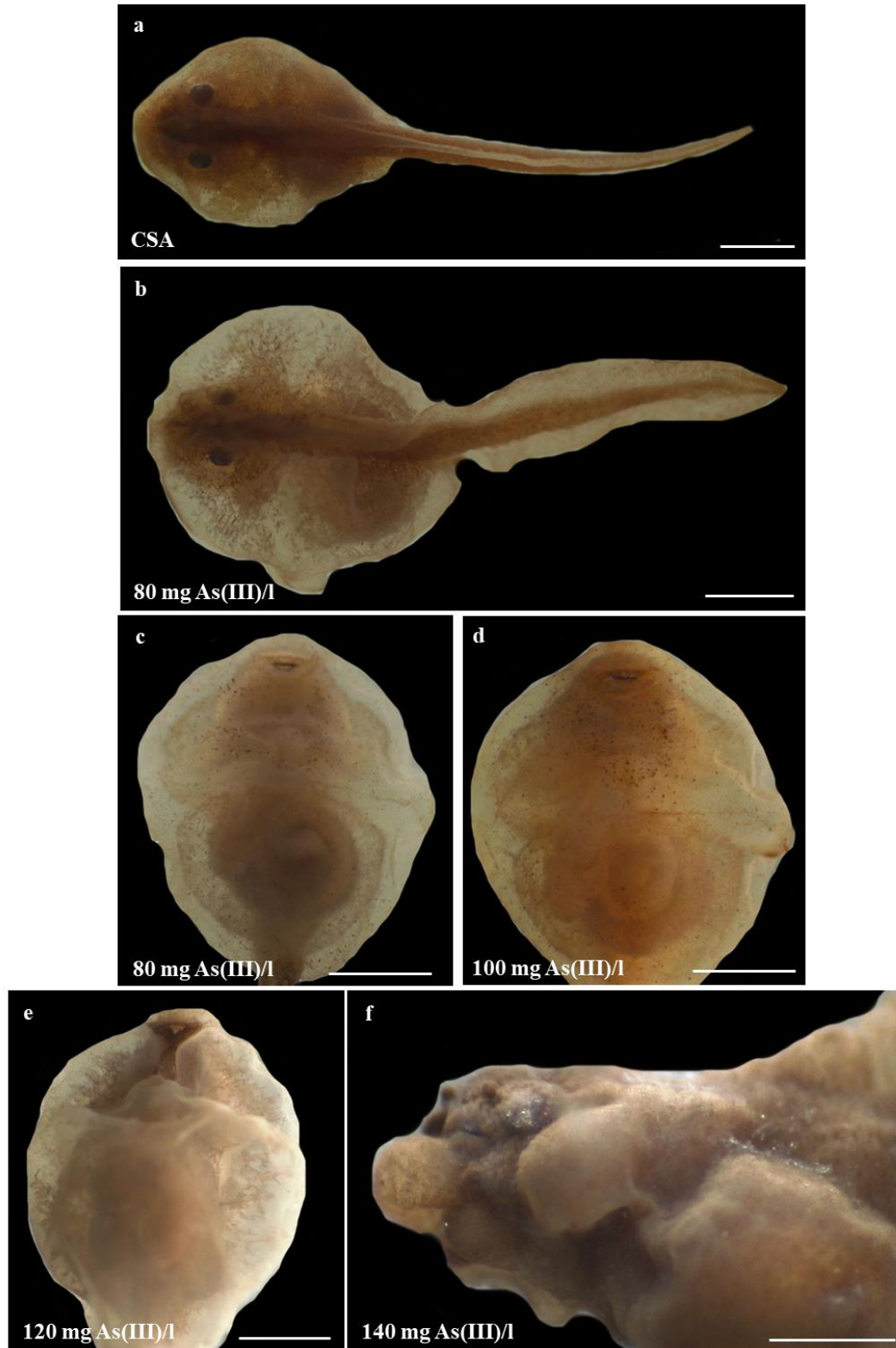


Figura 12. Alteraciones morfológicas de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a As(III) por pulso de 24 h, a partir del E. 23 (pliegue opercular). a) Larva control en E. 25 (opérculo completo), b-d) Larvas tratadas con severa hidropesía branquial y abdominal, e) Larva tratada con severa hidropesía branquial y abdominal y malformación de estructuras del disco oral, f) Larva con severas anomalías cefálicas. Escala: a-e:1 mm. f: 0,5 mm.

Se observaron diferencias significativas ($F_{7,103} = 103,5$, $P = < 0,0001$) en la talla de los individuos expuestos a 120 y 140 mg As(III)/l en comparación con el CSA y los restantes tratamientos (Figura 13).

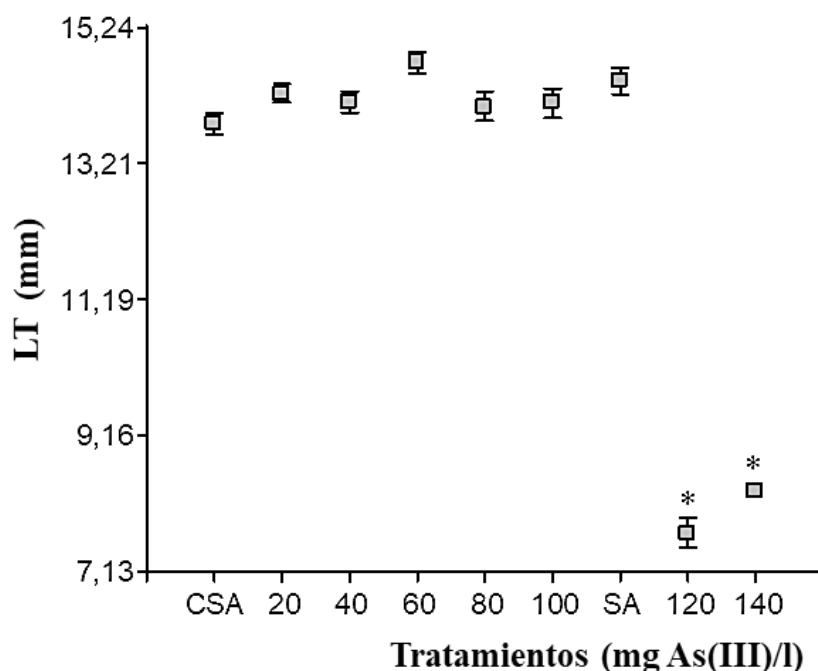


Figura 13. Comparación de la Longitud Total (LT) alcanzada por las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a As(III) a partir del E. 23 (pliegue opercular), por pulso de 24 h. Los asteriscos indican diferencias significativas con el CSA ($p < 0,01$).

Exposición en E. 25 (opérculo completo)

La exposición a partir del E. 25 (opérculo completo) no causó alteraciones en la morfología de las larvas expuestas a arsénico. Sin embargo, a diferencia de lo registrado en el CSA, las larvas tratadas con concentraciones de 40 mg As(III)/l mostraron alteraciones en la natación desde las primeras horas de exposición, reaccionando al estímulo táctil con contracciones espasmódicas, y breves desplazamientos. Las larvas tratadas con 60 mg As(III)/l presentaron narcosis desde las primeras horas de exposición muriendo en las horas subsiguientes. Concentraciones de 80 y 100 mg As(III)/l tuvieron efecto letal en el 100 % de las larvas expuestas, desde las primeras horas de ensayo. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,01$) en la talla de los individuos del CSA y los sobrevivientes tratados con As(III).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Es este estudio, se caracterizó el efecto letal y teratogénico del arsénico en forma de arsenito de sodio sobre embriones y larvas de *Rhinella arenarum*, quedando demostrada su susceptibilidad a dicho metal. Los valores de CL 50 calculados para larvas de *Rhinella arenarum* en E. 25 se encuentran dentro del rango calculado por otros autores (Brodeur et al. 2009, Lajmanovich et al. 2019), así como también el calculado para otras especies como *Adelotus brevis* y *Limnodynastes peroni* (Johnson 1976), *Lithobates catesbeianus* (Birge et al. 1979) (Tabla 1). Según estos trabajos, valores entre 35 y 55 mg As(III)/l supondrían un riesgo para las poblaciones silvestres de estas especies. Para el caso de los estadios embrionarios de *Rhinella arenarum*, los valores de CL 50 reportados en este trabajo son, incluso, dos veces menores que lo reportados por Mardirosian et al. (2015) (ver tabla 1), lo que demuestra la sensibilidad de los estadios tempranos del desarrollo al efecto letal del arsénico.

El arsénico también resultó ser altamente teratogénico, ya que afectó el desarrollo embrionario y larval temprano de *Rhinella arenarum*, provocando severas alteraciones en la morfología de los órganos externos e internos de embriones y larvas. Los resultados obtenidos muestran que la exposición a altas dosis de arsénico altera procesos tempranos de desarrollo (segmentación, gastrulación, neurulación y organogénesis temprana) y conduce a la malformación de órganos y sistemas o provocan el detenimiento del desarrollo. Gornati et al. (2002) observaron, en *Xenopus laevis*, edema ventral, agenesia de cola y/o severo acortamiento de la cola por exposición a As(III). Los efectos teratogénicos del arsénico sobre embriones de *Rhinella arenarum* también han sido reportados por Pérez-Coll et al. (2018), quienes destacaron la relevancia de evaluar este tipo de efectos subletales, ya que representan un riesgo para las poblaciones de anfibios anuros.

Se han propuesto varias hipótesis acerca del mecanismo de acción del arsénico. A nivel bioquímico, el arsénico inorgánico en estado pentavalente puede reemplazar al fosfato en varias reacciones. En el estado trivalente, el arsénico inorgánico y orgánico (metilado) puede reaccionar con tioles críticos en proteínas e inhibir su actividad interfiriendo con procesos bioquímicos importantes. La inhibición de estas enzimas puede alterar el estado redox celular y, eventualmente, conducir a la citotoxicidad. El estrés oxidativo, puede dañar el ADN o bien afectar la transcripción

del ADN conduciendo a una cascada de efectos adversos. Asimismo, el arsénico parece ser responsable de la secreción de factores de crecimiento que inducen la proliferación celular (Hughes 2002).

Con respecto al cáncer, los mecanismos potenciales incluyen genotoxicidad, metilación alterada del ADN, estrés oxidativo, proliferación celular alterada, cocarcinogénesis y promoción de tumores (Hughes 2002). Singha et al. (2014) evaluaron la toxicidad del arsenito de sodio en *Rana limnocharis* y, si bien no observaron letalidad a concentraciones ambientalmente relevantes, reportaron genotoxicidad como efecto subletal. Estos mecanismos de toxicidad podrían también ser responsables de las alteraciones de los procesos del desarrollo observadas en este trabajo, cuya manifestación se observa en severas anomalías morfológicas.

Por otra parte, cabe destacar que las concentraciones de arsénico reportadas para aguas naturales están muy por debajo de los valores de CL 50, e incluso de los de CL 10, calculados en los ensayos de toxicidad. El rango de concentraciones de arsénico que se encuentra en las aguas superficiales es amplio, desde menos de 0,005 mg As/l hasta más de 5 mg As/l. Las concentraciones típicas en agua dulce son inferiores a 0,01 mg As/l y, con frecuencia, inferiores a 0,001 mg As/l (Smedley y Kinniburgh 2002). En Argentina, en el área Chaco-Pampeana, los valores máximos se encuentran entre 0,07 y 5,3 mg As/l (Smedley et al. 2008). Esto significaría un bajo o nulo riesgo toxicológico para las poblaciones de las especies de anuros estudiados, al menos en periodos de tiempo similares a los de estos ensayos. En suelos contaminados, estos valores pueden ascender hasta 408 mg/l (Kuhlmeier 1997 a, b) y 1570 mg As/l (Wang y Mulligan 2006). Estos casos de contaminación son resultado de la movilización del arsénico en condiciones naturales o por acción antropogénica principalmente a través de minería, la quema de combustibles fósiles, el uso de pesticidas arsénicos, herbicidas, desecantes de cultivos y la conservación de la madera (Singh et al. 2015).

Los bioensayos de exposición por pulsos, simulan emergencias ambientales donde los individuos pueden estar expuestos a altas concentraciones de arsénico, a veces por cortos periodos de tiempo. El arsénico es un químico ambiental de preocupación toxicológica en la actualidad por lo que todos los estudios referentes a sus efectos tóxicos cobran relevancia a la hora de interpretar su mecanismo de toxicidad. Es necesario comprender los efectos del arsénico sobre un sistema biológico como los

anuros ya que constituye información de base para estimar su impacto en áreas afectadas por contaminación.

CAPÍTULO IV - CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES



Plaguicidas

Los datos recopilados en el sitio web de la Lista Roja de Especies en Peligro de la UICN indican que, después de la fragmentación del hábitat, la contaminación representa la mayor amenaza para las poblaciones de anfibios (Mann et al. 2009). La introducción de plaguicidas agrícolas en los ambientes naturales constituye una de las mayores problemáticas de origen antropogénico. Los herbicidas e insecticidas tienen la capacidad de causar alteraciones en las comunidades naturales, particularmente las comunidades acuáticas. Sin embargo, el conocimiento de los efectos de los pesticidas sobre la biota, se limita en gran medida a casos en los que se han aplicado pesticidas de forma intencional o accidental en sitios naturales con estudios posteriores de su impacto (Relyea 2005). La mayoría de los datos de toxicidad de pesticidas provienen de ensayos de laboratorio con organismos modelo.

Las formulaciones comerciales de los plaguicidas son cócteles de productos químicos, compuestos por un principio activo y otros ingredientes también llamados compuestos inertes o adyuvantes, que no son de público conocimiento debido al secreto comercial. Estos favorecen la absorción y estabilidad del principio activo y así potencian su acción pesticida. Los principales adyuvantes son los tensioactivos o surfactantes que aumentan la solubilidad del ingrediente activo y lo protegen de la degradación, incrementando la vida media del ingrediente activo y potenciando su actividad pesticida (Mesnage y Antoniou 2018).

Numerosos trabajos dan cuenta de la mayor toxicidad de las formulaciones comerciales frente a los ingredientes activos de diversos pesticidas y atribuyen este hecho a la presencia de adyuvantes en las formulaciones (Mann y Bidwell 2001, Pereira et al. 2009, Puglis y Boone 2011, Nagy et al. 2020). Sin embargo, las pruebas realizadas con fines de establecer parámetros para la regulación se realizan únicamente con el principio activo establecido por la industria. Este puede ser un enfoque válido para establecer una referencia para los principios activos, pero no representa las propiedades toxicológicas de los productos comerciales que se aplican en entornos agrícolas, urbanos o domésticos (Mesnage y Antoniou 2018).

Los resultados de este trabajo aportan evidencia a dichas conclusiones, demostrando la mayor toxicidad de las formulaciones comerciales frente al ingrediente activo. Asimismo, destacan la necesidad de profundizar el estudio de la toxicidad de los

productos comerciales, y particularmente de los aditivos que estos incluyen, ya que son, en última instancia, los compuestos liberados al ambiente y a los cuales están expuestos los organismos no blanco.

Finalmente, y en concordancia con Mesnage y Antoniou (2018), es necesario que los organismos de control de los pesticidas comercializados incluyan, durante el proceso de autorización, la evaluación de la toxicidad de los compuestos incluidos en las formulaciones comerciales. No hacerlo, representa omitir posibles riesgos derivados de la interacción entre el ingrediente activo y otros compuestos y, como se ha demostrado en numerosos estudios, subestimar su toxicidad.

Metales pesados

Entre los efectos tóxicos agudos y crónicos provocados por metales pesados, se incluyen disfunción gastrointestinal y renal, neurodegeneración y trastornos funcionales del sistema nervioso, lesiones cutáneas, alteraciones cardiovasculares, disfunción del sistema inmunitario, defectos de nacimiento y cáncer (Balali-Mood et al. 2021). La toxicidad de los metales pesados ha sido explicada por su interacción con biomoléculas celulares, sin embargo no se ha dilucidado aún cómo estos interactúan con los componentes extracelulares y proteínas intracelulares (Bridges y Zalups 2005).

La actividad inicial de los metales pesados con cualquier organismo vivo implica la interacción con la superficie exterior de la membrana celular (Hall 2002). Se sabe poco acerca de los mecanismos por los cuales ciertos metales y compuestos, que contienen metales, logran ingresar a las células. Dado que no parece haber transportadores diseñados específicamente para la entrada de la mayoría de las especies de metales tóxicos, se ha postulado que algunos de estos metales ingresan a las células a través de mecanismos de mimetismo iónico y/o molecular, de transportadores de elementos esenciales y/o moléculas. A través de este mecanismo un ion metálico se une a una molécula orgánica endógena y forma una molécula de metal orgánico que actúa como un imitador funcional o estructural de moléculas esenciales. Estos imitadores de moléculas endógenas inhiben o interfieren con múltiples procesos celulares (Bridges y Zalups 2005).

Asimismo, dentro de la célula, los metales generan especies reactivas de oxígeno (ROS) en alta concentración (Rahman y Singh 2019). Bajo estrés oxidativo, ocurre oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos que provocan daños en la membrana, disfunción de las proteínas y deterioro de los mecanismos de reparación del ADN (Valko et al. 2005). Estas alteraciones a nivel celular podrían explicar las alteraciones del desarrollo y malformaciones de embriones y larvas de *Rhinella arenarum* registradas en este trabajo, sin embargo, no hay información que permita establecer una relación directa entre causa y efecto.

Teratogénesis

Las malformaciones representan el resultado de procesos del desarrollo que han incorporado errores, y por lo tanto, la causa que las provocan, en este caso la exposición a contaminantes, es temporalmente distante a la morfología final de una estructura. En este sentido, para definir los errores que ocurren en el desarrollo, es necesario comprender los principios normales que lo rigen. El desarrollo de un organismo comienza al momento de la fecundación con el inicio de una cascada de eventos moleculares e intrincadas interrelaciones entre células y capas celulares, que dan como resultado tejidos muy organizados y altamente especializados. El desarrollo de los tejidos y órganos se denomina morfogénesis y ocurre a través distintos procesos, donde las células siguen mapas de destino bien definidos y genéticamente predeterminados (Gilbert y Barresi 2016).

Teratogénesis es el nombre que se le da al desarrollo anormal y puede ser causada por factores genéticos o ambientales. El desarrollo anormal puede ocurrir en cualquier nivel de la morfogénesis y resulta en la malformación de una estructura. Un teratógeno es un agente exógeno que causa errores del desarrollo que se manifiestan como: muerte del individuo, malformación, retardo en el crecimiento o disfunción metabólica (Alwan y Chambers 2015). La mayoría de los teratógenos ejercen su acción durante un periodo crítico del desarrollo donde se forman los principales sistemas de órganos (Branch 2004, Gilbert-Barness 2010, Sadler 2017).

El desarrollo de un organismo puede interpretarse como una red compuesta por nodos interconectados que representan procesos morfogenéticos. Un teratógeno puede afectar la red, interrumpiendo o modificando las interacciones entre los nodos e

interfiriendo la morfogénesis normal (Kowalski et al. 2019). Dado que cualquier sustancia química tiene es potencialmente teratogénica, en algún nivel de dosis, es importante comprender el mecanismo por el cual estos agentes alteran el desarrollo embrionario normal. Los teratógenos provocan malformaciones no hereditarias al alterar procesos embriológicos fundamentales (Finnell et al. 2002). Esto puede estar relacionado con alteraciones en la función de los genes o alteraciones de los sistemas de señalización que ocurren durante el desarrollo, lo que podría interferir en la producción o el reconocimiento de señales celulares o producir señales aberrantes (Rogers et al. 1997). La interferencia con estos procesos puede alterar los componentes moleculares y los mecanismos ontogenéticos clave del desarrollo

Los efectos de un agente teratógeno dependen de varios factores como la constitución genética del individuo, el momento del desarrollo en el que ocurre la exposición, la dosis, la vía de incorporación, el modo de acción del agente y el tiempo de exposición (Ortiz-Santaliestra et al. 2006), así como también de los mecanismos embrionarios de bioactivación, detoxificación, eliminación y de reparación de daño celular (Wells et al. 1997). Un teratógeno puede afectar distintos procesos del desarrollo como los mecanismos de señalización celular, la proliferación y muerte celular, la morfogénesis, las funciones metabólicas y/o el crecimiento (Kowalski et al. 2019).

En este sentido el concepto de “periodo crítico” es de fundamental importancia para la comprensión de los efectos deletéreos de un teratógeno. Un compuesto incorporado en una dosis elevada en las primeras etapas del desarrollo, provocará la muerte del embrión y no una anomalía del desarrollo. Sin embargo, dosis más bajas podrían no ser insuficientes para detener el desarrollo, pero podrían provocar malformación del embrión. Los efectos podrían ser una alteración macroscópica como la malformación de algún tejido u órgano o bien una disfunción molecular que se manifieste en una falla funcional o metabólica. Por otra parte, si la acción del teratógeno se produce más tardíamente en el desarrollo, luego del periodo organogenético, los efectos deletéreos se manifestarán en alteraciones metabólicas y/o fisiológicas como retardo en la maduración de sistemas enzimáticos, retraso o disminución del crecimiento, alteración del comportamiento, entre otros (Gilbert y Epel 2009).

El desarrollo es un proceso altamente complejo, y las acciones de los teratógenos también lo son. Existe una “jerarquía” de los mecanismos intrínsecos que incluyen el compartimiento intracelular, el dominio de la superficie celular y el compartimento

extracelular y que están íntimamente asociados con el mecanismo de acción del agente teratogénico (Saxén 1976). Un teratógeno que actúe en diferentes etapas de desarrollo puede desencadenar diferentes tipos de malformaciones, mientras que diferentes teratógenos actuando en la misma etapa de desarrollo pueden provocar errores similares que conducen a la misma malformación (Meteyer et al. 2000).

El efecto teratogénico está determinado por el sitio de acción del agente teratogénico y el estado del desarrollo de la estructura blanco, al momento de la exposición. Interrumpe procesos de desarrollo que, probablemente, estén controlados por múltiples genes que utilizan una estructura reguladora compleja. El desarrollo de las estructuras embrionarias es el resultado de una serie compleja de eventos moleculares, bioquímicos y físicos que conducen la formación de un individuo. La ontogenia incluye procesos como proliferación, señalización, migración, crecimiento y muerte celular. La interrupción de proliferación celular podría detener el desarrollo de un órgano o estructura específica, mientras que la alteración de un mecanismo de señalización podría causar ausencia de una estructura determinada. Asimismo, la alteración de los procesos de diferenciación pueden derivan en la construcción anormal de tejidos y órganos (Finnell et al. 2002).

Se ha demostrado que existe un estrecho vínculo entre el estrés oxidativo y los efectos teratogénicos (Figura 1). A niveles altos, el estrés oxidativo promueven la apoptosis o necrosis, aunque a niveles bajos interfieren con ciertas vías de señalización que dirigen la morfogénesis. Muchos eventos de la morfogénesis, como la proliferación, diferenciación y muerte celular, están regulados por los estados redox de la célula y pueden verse alterados en situaciones de estrés oxidativo o desequilibrio redox. El estrés oxidativo inducido por teratógenos resulta en períodos prolongados de desequilibrio redox que alteran procesos del desarrollo claves, como por ejemplo, la transición de un evento de proliferación a diferenciación. Esto puede alterar el programa de desarrollo de tejidos y órganos y conducir a malformaciones (Hansen et al. 2018).

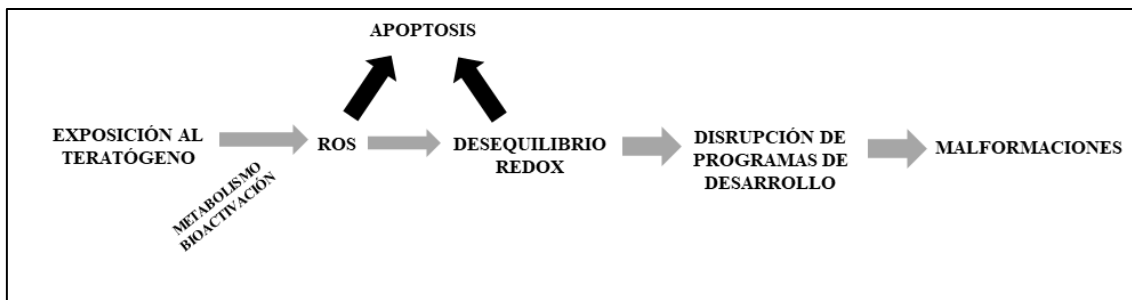


Figura 1. Efectos del estrés oxidativo durante el desarrollo. Después de la exposición al teratógeno, los cambios en el metabolismo celular pueden promover un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y cambiar los estados redox intracelulares. Los niveles excesivamente altos de generación de ROS y/o los estados redox altamente oxidados pueden promover la apoptosis (flechas negras), pero en condiciones más moderadas, los cambios en el estado redox pueden promover la interrupción de la señalización celular sensible a redox (flechas grises), y provocar malformaciones estructurales. Modificado de Hansen et al. (2018).

Los teratógenos interfieren distintas vías y mecanismos de desarrollo, y alteran la embriogénesis normal. Sin embargo, aún se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares implicados en el proceso teratogénico. A partir de experimentos realizados en este trabajo, se pudo constatar que el periodo de segmentación y gastrulación, y la etapa de organogénesis temprana, son altamente susceptibles a los efectos teratogénicos de pesticidas y metales pesados. Dependiendo del periodo de exposición y la concentración del tóxico, se vieron afectados órganos específicos característicos de cada estadio del desarrollo. Asimismo, es importante destacar que la magnitud y el tipo de anomalías morfológicas observadas estuvieron asociados no solo a la dosis del compuesto, sino también al momento específico del desarrollo en el cual ocurrió de exposición al tóxico. Durante las etapas ontogénicas tempranas, y particularmente durante la segmentación y gastrulación, ocurren importantes procesos que incluyen la multiplicación celular y la asociación de grupos celulares, eventos que requieren de una adecuada coordinación de los sistemas de señalización y adhesión celular (Wolpert et al. 2015, Gilbert y Barresi 2016).

En este trabajo, se observó que la exposición a dosis elevadas de los compuestos teratogénicos durante la etapa de segmentación y gastrulación temprana, provocó el detenimiento del desarrollo dentro de las primeras horas de ensayo. El detenimiento del desarrollo registrado posiblemente ocurrió como consecuencia de un detenimiento de proliferación celular, pérdida de adhesividad celular, interferencia

eventos de señalización celular o de muerte celular que resultaron en un bloqueo completo de la embriogénesis o inviabilidad de embrionaria. Por otra parte los embriones expuestos en el periodo de gastrulación inicial presentaron microcefalia o acefalia, hecho que podría relacionarse con fallas o alteraciones en los procesos inductivos propios de esta etapa, como la señalización de la notocorda y la consecuente diferenciación de las células de la placa neural y formación del tubo neural. Otro ejemplo a mencionar corresponde a los ejemplares que estuvieron expuestos durante la etapa de neurulación, y que mostraron mayor cantidad y severidad de malformaciones cefálicas (acefalia, microcefalia, reducción de ojos). Durante este periodo ocurre la formación de la placa neural, la fusión de los pliegues neurales y la organización del tubo neural y se esbozan las principales estructuras de la cabeza como el encéfalo y los órganos de los sentidos. Por ello, es de esperar que éstas sean las estructuras más sensibles y vulnerables a presentar alteraciones en su morfogénesis.

Con respecto a otras estructuras cuya morfogénesis se vio severamente afectada, es importante destacar el caso de los filamentos branquiales externos. Estos órganos comienzan a esbozarse durante la etapa embrionaria final y culminan su desarrollo y crecimiento en las etapas larvales premetamórficas. La anomalía más frecuente de los embriones afectados fue la ausencia de filamentos branquiales, lo que hace pensar en un bloqueo completo de los mecanismos de formación. Sin embargo, en larvas que estuvieron expuestas a los tóxicos más tardíamente presentaron filamentos branquiales poco desarrollados o con una morfología anómala. Esto podría indicar que, si bien no se vieron alterados los eventos iniciales de formación, sí se alteraron los procesos de crecimiento. Situaciones semejantes se observaron para otras estructuras como los órganos adhesivos, los labios bucales y correspondientes queratodontes, la cola y aleta caudal. Cabe destacar que la mayoría de las estructuras afectadas presentaron la particularidad de tener un menor desarrollo en relación a los controles. Este menor desarrollo podría estar relacionado con alteraciones en los procesos de proliferación celular que afectarían el crecimiento de los órganos durante su morfogénesis. Sin embargo, debido a que el metabolismo intracelular de los compuestos analizados en este trabajo no son bien conocidos, no se posee datos suficientes que permitan explicar de forma causal las malformaciones observadas. A este respecto, es necesario profundizar los estudios que permitan conocer la dinámica extra y/o intracelular de los teratógenos e

interpretar los mecanismos de teratogénesis que interfieren con los procesos normales del desarrollo.

Finalmente, en base a los resultados obtenidos, se puede decir que el mecanismo teratogénico de los compuestos aquí estudiados no ejerce su acción sobre un órgano específico sino que la disrupción ocurre a nivel de procesos morfogenéticos y en consecuencia cualquier estructura u órgano que esté en desarrollo al momento o luego de la exposición, será susceptible de sufrir alguna alteración morfológica (Figura 2). Esto destaca la importancia de considerar, en los estudios de toxicidad, a los estadios embrionarios tempranos, medios y tardíos ya que brindan abundante información de las alteraciones del desarrollo normal y permiten identificar los estadios críticos susceptibles a la acción teratogénica de distintos compuestos.

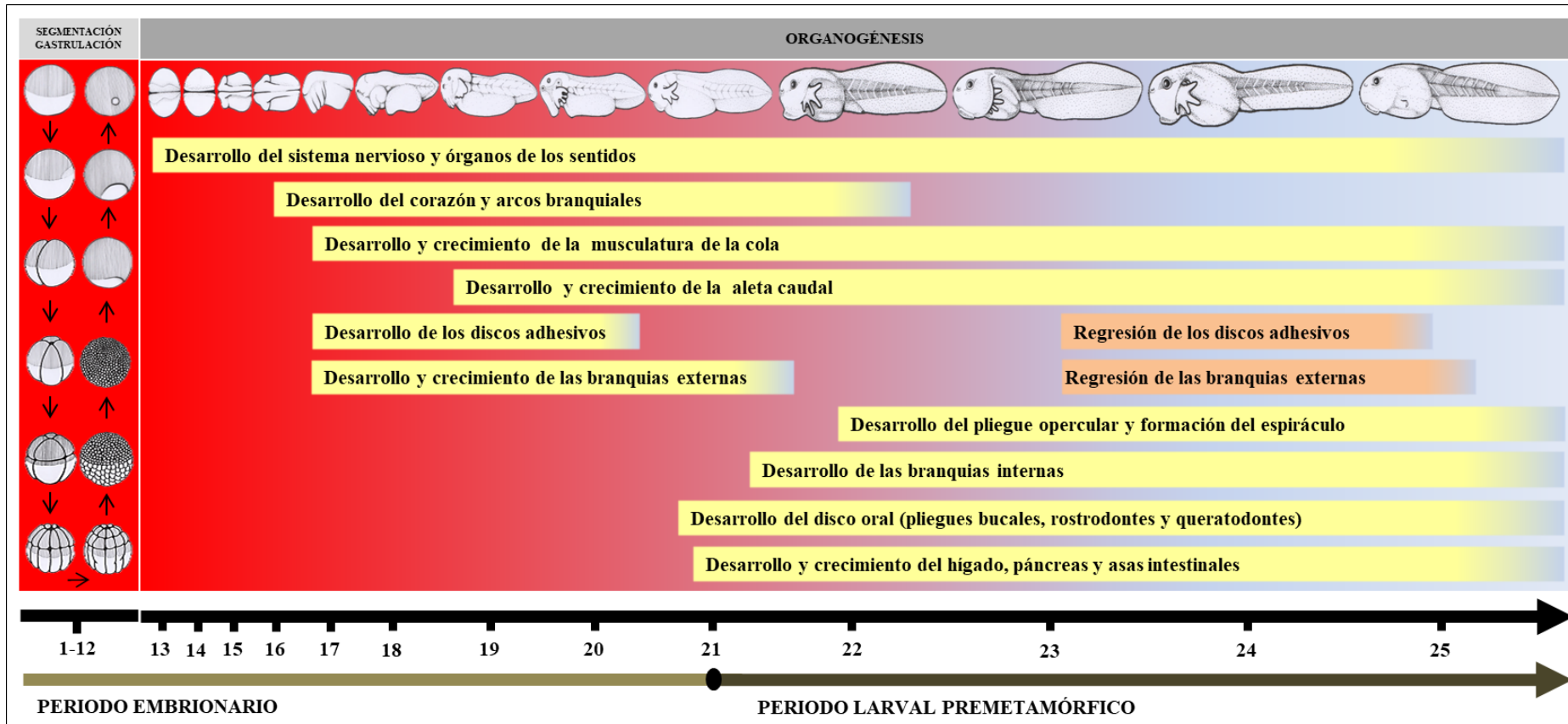


Figura 2: Representación de los estadios del desarrollo embrionario y larval premetamórfico de *Rhinella arenarum* susceptibles a teratógenos. Las barras amarillas representan los principales eventos morfológicos que ocurren durante la organogénesis. El fondo en degradé representa, de izquierda a derecha, la susceptibilidad de sufrir malformaciones por efecto de sustancias teratogénicas. La exposición a teratógenos durante el periodo de segmentación y gastrulación (E. 1-12) generalmente provoca malformaciones que conducen a la muerte de embrión. La exposición a teratógenos durante el periodo de organogénesis temprana (E. 13-19) y organogénesis media (E. 20-22) provoca severas malformaciones de órganos y estructuras como: encéfalo, corazón, branquias externas e internas, estructuras del disco oral, órganos del sistema digestivo. El periodo de organogénesis tardía (E. 23-25) es el menos sensible a la acción de teratógenos. Los números indican los estadios del desarrollo según Gosner (1960). Imágenes: Ayelén Vaca.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo ha permitido demostrar que:

- El insecticida malatión (i.a.) tiene un efecto narcótico y letal, altera el comportamiento de las larvas y el desarrollo y crecimiento de embriones y larvas de *Rhinella arenarum*.
- El formulado comercial Glacoxan 50M® es varias veces más tóxico que el i.a.
- La susceptibilidad de *Rhinella arenarum* a estos insecticidas muestra una relación estadio-dependiente siendo, el E. 25 el más sensible al efecto letal.
- El herbicida 2,4-D (i.a.) y su formulado comercial, Esterón Ultra®, tienen efecto letal sobre larvas de *Rhinella arenarum*, siendo el formulado comercial más tóxico que el i.a. para todos los estadios analizados.
- Esterón Ultra® tiene capacidad teratogénica y altera la morfogénesis y el crecimiento de los embriones y larvas de *Rhinella arenarum*.
- Los estadios embrionarios tempranos (E 3-11) fueron los más susceptibles al efecto tóxico del 2,4-D, mientras que estadios más avanzados (E. 18 y E. 21) fueron más susceptibles al efecto tóxico de Esterón Ultra®.
- La mayor toxicidad de las formulaciones comerciales en comparación con el i.a. del insecticida malatión y el herbicida 2,4-D se interpreta por la presencia de adyuvantes en su composición.
- El cloruro de cobre y el arsenito de sodio tienen un efecto letal y capacidad teratogénica, sobre embriones y larvas de *Rhinella arenarum*.
- El mecanismo teratogénico de los compuestos estudiados no ejerce su acción sobre un órgano específico, sino que altera los procesos morfogenéticos embrionarios. En consecuencia cualquier estructura u órgano que en desarrollo, al momento o luego de la exposición, es susceptible de sufrir una alteración morfológica.

Finalmente, a partir de este trabajo se destaca la importancia de considerar, en los bioensayos de toxicidad con anuros, a los estadios embrionarios del desarrollo, ya que aportan información relevante de efectos subletales que se subestiman cuando se evalúan únicamente estadios larvales. Asimismo, incluir en las evaluaciones de toxicidad, a las formulaciones comerciales en comparación con ingrediente activo, permitirá tener un panorama más abarcativo de la toxicidad de un compuesto, y disponer de información útil para proponer acciones de protección de la biota acuática.

BIBLIOGRAFÍA

Capítulo I –Introducción general

- Agostini MG, Natale GS, Ronco AE. 2010. Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. *Ecotoxicology*, 19(8):1545-1550.
- Alloway B, Ayres DC. 1997. *Chemical principles of environmental pollution*. CRC press.
- Anguiano O, Caballero De Castro A, Rosenbaum E, Venturino A, Pechen D´Angelo AM. 1998. ¿Afectan los plaguicidas la supervivencia de las poblaciones de anfibio? Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” e Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales, 149:1-10.
- Anguiano OL, Ferrari A. 2019. Riesgo ecotoxicológico de plaguicidas utilizados en Argentina. Facultad de Ingeniería y Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional del Comahue PROBIEN (CONICET – UNCo).
- Aronzon C, Marino DJG, Ronco AE, Pérez-Coll CS. 2014. Differential toxicity and uptake of Diazinon on embryo-larval development of *Rhinella arenarum*. *Chemosphere*, 100:50-56.
- Aronzon CM, Peluso J, Pérez-Coll CS. 2020. Mixture toxicity of copper and nonylphenol on the embryo-larval development of *Rhinella arenarum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(12):13985-13994.
- Aronzon CM, Sandoval MT, Herkovits J, Pérez-Coll CS. 2011a. Stage-dependent toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environmental toxicology*, 26(4):373-381.
- Aronzon CM, Sandoval MT, Herkovits J, Pérez-Coll CS. 2011b. Stage-dependent susceptibility to copper in *Rhinella arenarum* embryos and larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(12):2771-2777.
- Artiola JF, Brusseau ML. 2019. The role of environmental monitoring in pollution science. En: Pepper IL, Gerba CP, Brusseau ML. *Environmental and Pollution Science* (pp. 149-162). Academic Press.
- Asif N, Malik M., Chaudhry FN. 2018. A review of on environmental pollution bioindicators. *Pollution*, 4(1):111-118.
- ASTM E1439-91. 1994. Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (Fetax). En: Annual Book of ASTM Standards, vol 11.04. (pp. 1286-1296) Philadelphia, PA: American Society of ASTM for testing and materials .
- Barreto E, Salgado Costa C, Demetrio P, Lascano C, Venturino A, Natale GS. 2020. Sensitivity of *Boana pulchella* (Anura: Hylidae) tadpoles to environmentally relevant concentrations of Chlorpyrifos: effects at the individual and biochemical levels. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(4): 834-841.
- Beebee TJ, Griffiths RA. 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biological Conservation*, 125(3):271-285.

- Blaustein AR, Wake DB. 1990. Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trends in Ecology and Evolution*, 5(7):203-204.
- Blaustein AR, Kiesecker JM. 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters*, 5(4):597-608.
- Blaustein AR, Han BA, Relyea RA, Johnson PT, Buck JC, Gervasi SS, Kats LB. 2011. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1223(1):108-119.
- Boccioni AP, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Attademo AM, Martinuzzi CS. 2021. Toxicity assessment at different experimental scenarios with glyphosate, chlorpyrifos and antibiotics in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Chemosphere*, 273:128475.
- Brodeur JC, Svartz G, Pérez-Coll CS, Marino DJ, Herkovits J. 2009. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquatic Toxicology*, 91(2):161-170
- Brodeur JC, Suarez RP, Natale GS, Ronco AE, Zaccagnini ME. 2011. Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(5):1370-1380.
- Brühl CA, Pieper S, Weber B. 2011. Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(11):2465-2472.
- Brusseau ML, Artiola JF. 2019. Chemical contaminants. En: *Environmental and Pollution Science* (pp. 175-190). Academic Press.
- Burkhart JG, Helgen JC, Fort DJ, Gallagher K, Bowers D, Propst TL, Gernes M, Magner J, Shelby MD, Lucier G. 1998. Induction of mortality and malformation in *Xenopus laevis* embryos by water sources associated with field frog deformities. *Environmental Health Perspectives*, 106 (12):141-148.
- Carey C, Bryant CJ. 1995. Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. *Environmental Health Perspectives*, 103(suppl 4):13-17.
- Chapman PM. 2007. Determining when contamination is pollution—weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environment International*, 33(4):492-501.
- Collins JP. 2010. Amphibian decline and extinction: what we know and what we need to learn. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92(2-3):93-99.
- Connell D, Lam P, Richardson B, Wu R. 1999. *Introduction to Ecotoxicology*. Ed. Blackwell Science..
- Corn PS. 2000. Amphibian Declines: Review of some current hypotheses. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA. (Eds). *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Pensacola, FL: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).
- Costa CS, Ronco AE, Trudeau VL, Marino D, Natale GS. 2018. Tadpoles of the horned frog *Ceratophrys ornata* exhibit high sensitivity to chlorpyrifos for conventional

- ecotoxicological and novel bioacoustic variables. *Environmental Pollution*, 235:938-947.
- Curi LM, Peltzer PM, Martinuzzi C, Attademo MA, Seib S, Simoniello MF, Lajmanovich RC. 2017. Altered development, oxidative stress and DNA damage in *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) larvae exposed to poultry litter. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143: 62-71.
- Curi LM, Peltzer PM, Sandoval MT, Lajmanovich RC. 2019. Acute toxicity and sublethal effects caused by a commercial herbicide formulated with 2,4-D on *Physalaemus albonotatus* tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230(1):22.
- Curi LM, Peltzer PM, Attademo MA, Lajmanovich RC. 2021. Alterations in gonads and liver tissue in two Neotropical Anuran species commonly occurring in rice fields crops. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232(5):1-18.
- Del Conte E, Sirlin L. 1951. The first stages of *Bufo arenarum* development. *Acta Zoologica Lilloana*, 12:495-499.
- Duffus JH. 1983. *Toxicología Ambiental*. Ediciones Omega, Barcelona, España.
- Dumont JN, Schultz TW, Buchanan MV, Kao GL. 1983. Frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX) - a short-term assay applicable to complex environmental mixtures. En: *Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures III* (pp. 393-405). Springer, Boston, MA.
- Echeverría DD, Fiorito de López LE. 1981. Estadios de la metamorfosis en *Bufo arenarum* (Anura). *Physis Sección B*, 40:15-23.
- Ferrari L, García ME, De la Torre FR, Demichelis SO. 1998. Evaluación toxicológica del agua de un río urbano mediante bioensayos con especies nativas. Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” e Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales, 148:1-16.
- Fitzgerald KT. 2017. Using amphibians as sentinels for environmental toxins: if we save the frogs, maybe we can save ourselves. *Clinical Theriogenology*, 9(3):255-258.
- Fleeger JW, Carman KR, Nisbet RM. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 317(1-3):207-233.
- Green DM, Lannoo MJ, Lesbarrères D, Muths E. 2020. Amphibian population declines: 30 years of progress in confronting a complex problem. *Herpetologica*, 76(2): 97-100.
- Halstead BJ, Ray AM, Muths E, Grant EHC, Grasso R, Adams MJ, Hossack BR. 2022. Looking ahead, guided by the past: The role of US national parks in amphibian research and conservation. *Ecological Indicators*, 136:108631.
- Herkovits J, Olguin O, Salinas H, Herkovits FD. 1993. Toxicological profiles (TOP) as concentration–response relationship for risk assessment. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, 14th Annual Meeting, Abstract Book. Pag. 425.
- Herkovits J, Herkovits FD, Pérez-Coll CS. 1996a. Lead toxicity TOP and time dependent lead–zinc antagonism in *Bufo arenarum* embryos. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, 17th Annual Meeting, Abstract Book. Pag.141

- Herkovits J, Pérez-Coll CS, Herkovits FD. 1996b. Ecotoxicity in Reconquista River (Province of Buenos Aires): A preliminary study. *Environmental Health Perspectives*, 104(2):186-189.
- Herkovits J, Cardellini P, Pavanati C, Pérez-Coll CS. 1997. Susceptibility of early life stages of *Xenopus laevis* to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 312-316.
- Herkovits J, Pérez-Coll CS. 1999a. Bioensayos de Toxicidad con embriones de anfibio (Antitox). Parte I. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, 42:24-30.
- Herkovits J, Pérez-Coll CS. 1999b. Bioensayos de Toxicidad con embriones de anfibio (Antitox). Parte II. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, 43:50-54.
- Herkovits J, Pérez-Coll CS, Herkovits FD. 2002. Ecotoxicological studies of environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Environmental Pollution*, 116(1): 177-183.
- Herkovits J, Pérez-Coll CS. 2003. AMPHITOX: a customized set of toxicity tests employing amphibian embryos. En: Linder G, Krest S, Sparling D, Little E. (Eds). *Multiple Stressor Effects in Relation to Declining Amphibian Populations*. Ed. ASTM SPECIAL TECHNICAL PUBLICATION, 1443, 46-62.
- Holdgate MW. 1979. *A perspective of environmental pollution*. Cambridge University Press.
- Hopkins WA. 2007. Amphibians as models for studying environmental change. *ILAR Journal*, 48(3):270-277.
- Houlahan JE, Findlay CS, Schmidt BR, Meyer AH, Kuzmin SL. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, 404(6779):752-755.
- Hursthouse A, Kowalczyk G. 2009. Transport and dynamics of toxic pollutants in the natural environment and their effect on human health: research gaps and challenge. *Environmental Geochemistry and Health*, 31(2):165-187.
- Infostat. <https://www.infostat.com.ar/index.php>
- Johnson MS, Aubee C, Salice CJ, Leigh KB, Liu E, Pott U, Pillard D. 2017. A review of ecological risk assessment methods for amphibians: comparative assessment of testing methodologies and available data. *Integrated environmental assessment and management*, 13(4):601-613.
- Johnson AC, Jin X, Nakada N, Sumpter JP. 2020. Learning from the past and considering the future of chemicals in the environment. *Science*, 367(6476):384-387.
- Johnson MA, Steenland K, Piedrahita R, Clark ML, Pillarisetti A, Balakrishnan K, Peel JL., Naeher LP, Liao J, Wilson D, Sarnat J, Underhill L, Burrowes V, McCracken JP, Rosa G, Rosenthal J, Sambandam S, de Leon O, Kirby MA, Kearns K, Checkley W, Clasen Ts, HAPIN Investigator. 2020. Air pollutant exposure and stove use assessment methods for the household air pollution intervention network (HAPIN) trial. *Environmental Health Perspectives*, 128(4):047009.
- Lajmanovich RC, Izaguirre MF, Casco VH. 1998. Paraquat tolerance and alteration of internal gill structure of *Scinax nasica* tadpoles (Anura: Hylidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34:364-369.

- Lajmanovich RC, Sandoval MT, Peltzer PM. 2003. Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed by Glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70:612-618.
- Lajmanovich RC, Attademo AM, Lener G, Boccioni APC, Peltzer PM, Martinuzzi CS, Demonte LD, Repetti MR. 2022. Glyphosate and glufosinate ammonium, herbicides commonly used on genetically modified crops, and their interaction with microplastics: Ecotoxicity in anuran tadpoles. *Science of The Total Environment*, 804:150177.
- Landis WG, Sofield RM, Yu MH. 2017. *Introduction to Environmental Toxicology: Molecular Substructures to Ecological Landscapes* (5th ed.). CRC Press. Boca Raton.
- Langlois VS. 2021. Amphibian Toxicology: A rich but underappreciated model for ecotoxicology research. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 80:661-662.
- Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, Greenacre C, Gwaltney-Brant S, McCrackin MA, Meyer R, Shearer DM, Yanong R. 2013. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals 2013 Edition*.
- Mahaney PA. 1994. Effects of fresh water petroleum contamination on amphibian hatching and metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(2):259-265.
- Mann RM, Bidwell JR, 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.
- Mann RM, Bidwell JR, 2001. The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frog. *Environmental Pollution*, 114:195-205.
- Mann RM, Hyne RV, Choung CB, Wilson SP. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*, 157(11):2903-2927.
- McCallum ML. 2007. Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. *Journal of Herpetology*, 41(3):483-491.
- Moreno Grau MD. 2003. *Toxicología Ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana*. Ed. Mc Graw-Hill, Madrid, España.
- Moriarty F. 1988. *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems*. 2da edición. Ed. Academic Press, London.
- Natale GS, Ammassari LL, Basso NG, Ronco AE. 2006. Acute and chronic effects of Cr (VI) on *Hypsiboas pulchellus* embryos and tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 72(3):261-267.
- Newman MC. 2009. *Fundamentals of ecotoxicology*. Ed. CRC press, Boca Raton.
- Nyström P, Hansson J, Månsson J, Sundstedt M, Reslow C, Broström A. 2007. A documented amphibian decline over 40 years: possible causes and implications for species recovery. *Biological Conservation*, 138(3-4):399-411.
- Peltzer PM, Lajmanovich RC, Attademo AM, Beltzer AH 2006. Diversity of anurans across agricultural ponds in Argentina. En: Hawksworth D.L., Bull A.T. (Eds)

- Marine, Freshwater, and Wetlands Biodiversity Conservation. Topics in Biodiversity and Conservation, vol 4. Springer, Dordrecht.
- Peltzer PM, Lajmanovich RC, Attademo AM, Junges CM, Teglia CM, Martinuzzi C, Curi LM, Culzoni MJ, Goicoechea HC. 2017. Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 51:114-123.
- Peltzer PM, Lajmanovich RC, Martinuzzi C, Attademo AM, Curi LM, Sandoval MT. 2019. Biototoxicity of diclofenac on two larval amphibians: assessment of development, growth, cardiac function and rhythm, behavior and antioxidant system. *Science of The Total Environment*, 683:624-637.
- Peluso J, Aronzon CM, Acquaroni M, Pérez Coll CS. 2020. Biomarkers of genotoxicity and health status in *Rhinella fernandezae* populations from the lower basin of the Paraná River. *Ecological Indicators*, 117:106588.
- Peluso J, Pérez Coll CS, Aronzon CM. 2021 In situ exposure of amphibian larvae (*Rhinella fernandezae*) to assess water quality by means of oxidative stress biomarkers in water bodies with different anthropic influences. *Chemosphere*, 271:129598.
- Pérez-Coll CS, Herkovits J, Salibian A. 1985. Efectos del cadmio sobre el desarrollo de un anfibio. *Archivos de Biología y Medicina Experimental*, 18:33-39.
- Pérez-Coll CS, Herkovits J, Salibián A. 1986. Teratogenic effects of cadmium on *Bufo arenarum* during gastrulation. *Experientia*, 42(10):1174-1176.
- Pérez-Coll CS, Herkovits J. 1990. Stage dependent susceptibility to lead in *Bufo arenarum* embryos. *Environmental Pollution*, 63(3):239-245.
- Pérez-Coll CS, Herkovits J, Fridman O, Daniel P, D'Eramo JL. 1999. Metallothionein induction and cadmium uptake in *Bufo arenarum* embryos following an acclimation protocol. *Environmental Pollution* 106:443-448.
- Pérez Coll CS, Herkovits J. 2004. Lethal and teratogenic effects of naringenin evaluated by means of an amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Food and Chemical Toxicology*, 42(2):299-306.
- Pérez-Coll CS, Aronzon CM, Svartz GV. 2017. Developmental stages of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) in toxicity studies: AMPHITOX, a customized laboratory assay. En: Larramendy ML. (Ed). *Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Aquatic Models*.(pp. 407-424). Ed. Royal Society of Chemistry.
- Pérez-Iglesias JM, Franco-Belussi L, Moreno L, Tripole S, de Oliveira C, Natale GS. 2016. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 9852-9861.
- Pérez-Iglesias JM, Fanali LZ, Franco-Belussi L, Natale GS., de Oliveira C, Brodeur JC, Larramendy M L. 2021. Multiple Level Effects of Imazethapyr on *Leptodactylus latinasus* (Anura) Adult Frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(3):492-506.
- Pisanó A. 1956. Método para mantener la hipófisis de anfibio fisiológicamente "in vitro". *Archivos de Bioquímica, Química y Farmacia-Tucumán*, 7:387-392.

- Roy D. 2002. Amphibians as environmental sentinels. *Journal of Biosciences*, 27(3):187.
- Salibián A. 1992. Effects of Deltamethrin on the South American toad, *Bufo arenarum*, tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 48:616-621.
- Salibian A, Marazzo JL. 1995. Studies on the effects of Deltamethrin on sodium net transport through the in vivo amphibian skin. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 8(2) 164-168.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7):671-675.
- Schweitzer L, Noblet J. 2018. Water contamination and pollution. En: *Green chemistry* (pp. 261-290). Ed. Elsevier.
- Sorrivas de Lozano VS, Morales J. 1986. *Introducción a la Microscopía Electrónica*. CRIBABB. Bahía Blanca. Argentina.
- Sparling DW, Linder G, Bishop CA. (Eds.) 2000. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). Pensacola.
- Sparling DW, Linder G, Bishop CA, Krest S. (Eds.). 2010. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. CRC Press. Boca Raton.
- Storfer A. 2003. Amphibian declines: future directions. *Diversity and distributions*, 9(2):151-163.
- Svartz GV, Wolkowicz IRH, Coll CS 2014. Toxicity of endosulfan on embryo-larval development of the South American toad *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(4):875-881.
- Svartz G, Marino, D, Ronco A, Pérez-Coll CS. 2015. Differential uptake of endosulfan in the South American toad under sublethal exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(1):104-111.
- Svartz GV, Aronzon CM, Pérez Coll CS. 2016. Combined endosulfan and cypermethrin-induced toxicity to embryo-larval development of *Rhinella arenarum*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 79(5):197-209.
- Tavera-Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, Fournier M, Cyr D, Marcogliese D. 2002. Reponse of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(3):527-531.
- Ukaogo PO, Ewuzie U, Onwuka CV. 2020. Environmental pollution: causes, effects, and the remedies. En: *Microorganisms for Sustainable Environment and Health* (pp. 419-429). Ed. Elsevier.
- US EPA, 1988. Users guide for a computer program for Probit analysis of data from acute and short-term chronic toxicity test with aquatic organisms. *Biological Methods*, Environmental Monitoring and Support Lab.
- Vismara C, Bernardini G, Bonfanti P, Colombo A, Camanti M. 1993. The use of in vitro fertilization in the frog embryo teratogenesis assay in *Xenopus* (Fetax) and its application to ecotoxicology. *The Science of the Total Environment*, 134(1):787-790.

- Wezel APV, Opperhuizen A. 1995. Narcosis due to environmental pollutants in aquatic organisms: residue-based toxicity, mechanisms, and membrane burdens. *Critical Reviews in Toxicology*, 25(3):255-279.
- Whitfield SM, Lips KR, Donnelly MA. 2016. Amphibian decline and conservation in Central America. *Copeia*, 104(2): 351-379.

Capítulo II – Plaguicidas

- Abubakar Y, Tijjani H, Egbun, C, Adetunji CO, Kala S, Kryeziu TL, Ifemeje JC, Kingsley Patrick-Iwuanyanwu, KC. 2020. Pesticides, history, and classification. En: Egbuna y Sawicka (Eds). *Natural remedies for pest, disease and weed control*. Academic Press.
- Akashé MM, Pawade UV, Nikam AV. 2018. Classification of pesticides: a review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 9(4):144-150.
- Alavanja MC. 2009. Introduction: Pesticides use and exposure, extensive worldwide. *Reviews on Environmental Health*, 24(4):303-310.
- Alonso LL, Demetrio PM, Etchegoyen MA, Marino DJ. 2018. Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Science of the Total Environment*, 645:89-96.
- Anguiano OL, Ferrari A. 2019. Riesgo ecotoxicológico de plaguicidas utilizados en Argentina. Facultad de Ingeniería y Facultad de Ciencias Médicas-Universidad Nacional del Comahue PROBIEN (CONICET -UNCo).
- Bernasconi C, Demetrio PM, Alonso LL, Mac Loughlin TM, Cerdá E, Sarandón SJ, Marino DJ 2021. Evidence for soil pesticide contamination of an agroecological farm from a neighboring chemical-based production system. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 313:107341.
- Beauvais SL, Jones SB, Brewer SK, Little EE. 2000. Physiological measures of neurotoxicity of diazinon and malathion to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their correlation with behavioral measures. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(7): 875-1880.
- Bonin J, DesGranges JL, Rodriguez J, Ouellet M. 1997. Anuran species richness in agricultural landscapes of Quebec: foreseeing long-term results of road call surveys. *Amphibians in decline: Canadian studies of a global problem*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, St. Louis, Missouri, USA.
- Brühl CA, Pieper S, Weber B. 2011. Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(11):2465-2472.
- Carvalho FP. 2017. Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2):48-60.
- Castellarini F, Dellafiore C, Polop J. 2003. Feeding habits of small mammals in agroecosystems of central Argentina. *Mammalian Biology*, 68(2):91-101.
- Castrejón Godínez ML, Sánchez-Salinas E, Ortiz Hernández ML. 2014. Plaguicidas: Generalidades, usos e impactos sobre el ambiente y la salud. En: Ortiz ML, Sánchez

- E, Folch JL, Olvera A, Datan E. (Eds). Los plaguicidas en México. Aspectos generales, toxicológicos y ambientales.
- Chávez-Suárez L, Rodríguez-García I, Estrada-Prado W, Herrera-Villafranca M, Medina-Mesa Y. 2021. Composición funcional de la macrofauna edáfica en cinco agroecosistemas de pastizales en la provincia Granma, Cuba. *Pastos y Forrajes*, 44.
- Ciarlo TJ, Mullin CA, Frazier JL, Schmehl DR 2012. Learning impairment in honey bees caused by agricultural spray adjuvants. *PLoS ONE* 7 (7):e40848.
- Connell D.W. 2022. Ecotoxicology. In Watters D., Pearn J., Maguire D., Lavin M (Eds.) *Toxins and Targets*. Routledge.
- Cothran RD, Brown JM, Relyea RA. 2013. Proximity to agriculture is correlated with pesticide tolerance: evidence for the evolution of amphibian resistance to modern pesticides. *Evolutionary Applications*, 6(5):832-841.
- Cox C, Sorgan M. 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health. *Environmental Health Perspectives*, 114 (12):1803-1806.
- Damalas CA, Eleftherohorinos IG. 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5):1402-1419.
- Díaz Báez MC, Bustos López MC, Espinosa Ramírez AJ. 2009. Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. *Ingeniería e Investigación*, 29(1):142-142.
- El-Nahhal Y. 2004. Contamination and safety status of plant food in Arab countries. *Journal of Applied Sciences*, 4(3):411-417.
- El-Nahhal Y. 2020. Pesticide residues in honey and their potential reproductive toxicity. *Science of the Total Environment*, 741:139953.
- El-Nahhal I, El-Nahhal Y. 2021. Pesticide residues in drinking water, their potential risk to human health and removal options. *Journal of Environmental Management*, 299:113611.
- Garbach K, Milder JC, Montenegro M, Karp DS, DeClerck FAJ. 2014. Biodiversity and ecosystem services in agroecosystems. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 2:21-40.
- Gheler-Costa C, Vettorazzi CA, Pardini R, Verdade LM. 2012. The distribution and abundance of small mammals in agroecosystems of southeastern Brazil. *Mammalia*, 76(2):185-191.
- Hanson M.L., Wolff B.A., Green J.W., Kivi M., Panter G H., Warne M.S.J., Ågerstrand M., Sumpter J.P. 2017. How we can make ecotoxicology more valuable to environmental protection. *Science of the Total Environment*, 578:228-235.
- Herrera J, Cadena P, Sanclemente A. 2005. Diversidad de la artropofauna en monocultivo y policultivo de maíz (*Zea mays*) y habichuela (*Phaseolus vulgaris*). *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*, 6(1):23-31.
- Jayakumar AM, Nameer PO. 2018. Species composition and abundance estimates of reptiles in selected agro-ecosystems in southern Western Ghats, India. *Journal of Threatened Taxa*, 10(10):12328-12336.

- Kasprzak K. 1982. Review of enchytraeid (Oligochaeta, Enchytraeidae) community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia*, 23(3/4):217-232.
- Kaur R, Mavi GK, Raghav S, Khan I. 2019. Pesticides classification and its impact on environment. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(3):1889-1897.
- Kazemi H, Klug H, Kamkar B. 2018. New services and roles of biodiversity in modern agroecosystems: A review. *Ecological indicators*, 93:1126-1135.
- Li Z, Jennings A. 2017. Worldwide regulations of standard values of pesticides for human health risk control: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(7):826.
- Llorent-Martínez EJ, Ortega-Barrales P, Fernández-de Córdova ML, Ruiz-Medina A. 2011. Trends in flow-based analytical methods applied to pesticide detection: a review. *Analytica Chimica Acta*, 684(1-2):30-39.
- Mahmood I, Imadi SR, Shazadi K, Gul A, Hakeem KR. 2016. Effects of pesticides on environment. En: Hakeem KR, Akhtar MS, Abdullah SNA (Eds.). *Plant, Soil and Microbes*. (pp. 253-269). Springer, Cham.
- Mesnager R, Antoniou MN. 2018. Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides. *Frontiers in Public Health*, 5: 361.
- Mikó Z, Ujszegi J, Gál Z, Hettyey A. 2017. Standardize or diversify experimental conditions in ecotoxicology? A case study on herbicide toxicity to larvae of two anuran amphibians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(4):562-569.
- Mohammed S, Lamoree M, Ansa-Asare OD, de Boer J. 2019. Review of the analysis of insecticide residues and their levels in different matrices in Ghana. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171:361-372.
- Nguyen LT, Janssen C R. 2001. Comparative sensitivity of embryo–larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 16(6):566-571.
- Nguyen LT, Janssen CR. 2002. Embryo-larval toxicity tests with the African catfish (*Clarias gariepinus*): comparative sensitivity of endpoints. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42:256-262.
- Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P, Hens L. 2016. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in Public Health*, 4:148.
- Olisah C, Okoh OO, Okoh AI. 2020. Occurrence of organochlorine pesticide residues in biological and environmental matrices in Africa: A two-decade review. *Heliyon*, 6(3):e03518.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2003. Código internacional de conducta para el manejo de plaguicidas. Roma.
- Organización Mundial de la Salud & Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. 2020. Clasificación recomendada por la OMS de los plaguicidas por el peligro que presentan y directrices para la clasificación 2019. Organización Mundial de la Salud.

- Paoletti MG, Pimentel D, Stinner BR, Stinner D. 1992. Agroecosystem biodiversity: matching production and conservation biology. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 40(1-4):3-23.
- Parmelee RW, Beare MH, Cheng W, Hendrix PF, Rider SJ, Crossley DA, Coleman DC. 1990. Earthworms and enchytraeids in conventional and no-tillage agroecosystems: A biocide approach to assess their role in organic matter breakdown. *Biology and Fertility of Soils*, 10(1):1-10.
- Pašková V, Hilscherová K, Bláha L. 2011. Teratogenicity and embryotoxicity in aquatic organisms after pesticide exposure and the role of oxidative stress. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 211:25-61.
- Peltzer PM, Lajmanovich RC, Attademo AM, Cejas W. 2005. Diversidad y conservación de anuros en ecosistemas agrícolas de Argentina: implicancias en el control biológico de plagas. *Temas de la Biodiversidad del Litoral fluvial argentino II INSUGEO, Miscelánea*, 14:399-416.
- Peltzer PM, Lajmanovich RC, Attademo AM, Beltzer AH. 2006. Diversity of anurans across agricultural ponds in Argentina. En: Hawksworth D, Bull AT. (Eds) *Marine, Freshwater, and Wetlands Biodiversity Conservation. Topics in Biodiversity and Conservation*. Springer, Dordrecht.
- Piña JI. 2012. Clasificación toxicológica y etiquetado de productos fitosanitarios. *Criterios Regulatorios Locales e Internacionales*. ILSI Argentina.
- Rajmohan KS, Chandrasekaran R, Varjani S. 2020. A Review on occurrence of pesticides in environment and current technologies for their remediation and management. *Indian Journal of Microbiology*, 60: 125-138.
- Richmonds C, Dutta HM. 1989. Histopathological changes induced by malathion in the gills of bluegill *Lepomis macrochirus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*; (USA), 43(1).
- Stenersen J. 2004. *Chemical pesticides mode of action and toxicology*. CRC press.
- Suarez RP, Gojman AP, Cappelletti S, Solari LM, Cristos D, Rojas D, Babbitt KJ, Gavier-Pizarro, G I. 2021. Combined effects of agrochemical contamination and forest loss on anuran diversity in agroecosystems of east-central Argentina. *Science of The Total Environment*, 759:143435.
- Taylor SK, Williams ES, Mills KW. 1999. Effects of malathion on disease susceptibility in Woodhouse's toads. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(3):536-541.
- Tscharntke T, Sekercioglu CH, Dietsch TV, Sodhi NS, Hoehn P, Tylianakis JM. 2008. Landscape constraints on functional diversity of birds and insects in tropical agroecosystems. *Ecology*, 89(4):944-951.
- Valderrama JFN, Baena JA P, Pérez FJ M. 2012. Persistencia de plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad: Una revisión de los procesos de degradación natural. *Gestión y Ambiente*, 15(3):27-38.
- Velásquez Trujillo V, Grisales Muñoz LD. 2021. Diversidad funcional de aves en agroecosistemas en el departamento de Caldas.
- Yeates GW, Bongers T. 1999. Nematode diversity in agroecosystems. En: *Invertebrate Biodiversity as Bioindicators of Sustainable Landscapes* (pp. 113-135). Elsevier.

Zhu W, Schmehl DR, Mullin CA, Frazier JL. 2014. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PloS one*, 9(1):e77547.

Sección I – Insecticidas organofosforados

Acquaroni M, Peluso J, Svartz G, Aronzon C, Pérez-Coll C. 2021. Characterization of acute toxicity, genotoxicity, and oxidative stress of dimethoate in *Rhinella arenarum* larvae. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(31):41772-41779.

Acquaroni M, Svartz G, Pérez-Coll C. 2022. Acute, chronic and neurotoxic effects of dimethoate pesticide on *Rhinella arenarum* throughout the development. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 57(2):142-152.

Agarwal A, Prajapati R, Singh OP, Raza SK, Thakur LK. 2015. Pesticide residue in water-a challenging task in India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(2):1-21.

Agostini MG, Natale GS, Ronco AE. 2010. Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. *Ecotoxicology*, 19(8):1545-1550.

Ando C, Gallavan R, Wofford P, Bradley A, Kim D, Lee P, Troiano J. 1996. Environmental monitoring results of the mediterranean fruit fly eradication program, Riverside County 1994. EH95-02.

Anguiano OL, de Castro AC, de D'Angelo AMP. 2001. The role of glutathion conjugation in the regulation of early toad embryos' tolerance to pesticides. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 128(1): 35-43.

Aronzon C, Svartz G. 2017. Comparative toxicity of endosulfan and diazinon on the embryo-larval development of the South American toad: *Rhinella arenarum*. *International Journal of Environment and Health*, 8(3):225-234.

Aronzon CM, Babay PA, Pérez-Coll CS. 2014. Developmental toxicity and risk assessment of nonylphenol to the South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38(2):634-642.

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

Aronzon CM, Svartz GV, Coll CSP. 2016. Synergy between diazinon and nonylphenol in toxicity during the early development of the *Rhinella arenarum* toad. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(5):1-10.

Babalola OO, Truter JC, van Wyk JH. 2019. Mortality, teratogenicity and growth inhibition of three glyphosate formulations using Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*. *Journal of Applied Toxicology*, 39(9):1257-1266.

Bernabò I, Sperone E, Tripep, S, Brunell, E. 2011. Toxicity of chlorpyrifos to larval *Rana dalmatina*: acute and chronic effects on survival, development, growth and gill apparatus. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(4):704-718.

- Betrosian A, Balla M, Kafiri G, Kofinas G, Makri R, Kakouri A. 1995. Multiple systems organ failure from organophosphate poisoning. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 33(3):257-260.
- Bonfanti P, Colombo A, Orsi F, Nizzetto I, Andrioletti M, Bacchetta, R, Mantecca P, Fascio U, Vailati G, Vismara, C. 2004. Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development. *Aquatic Toxicology*, 70(3):189-200.
- Budischak SA, Belden LK, Hopkins WA. 2008. Effects of malathion on embryonic development and latent susceptibility to trematode parasites in ranid tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(12):2496-2500.
- Buratti FM, D'aniello A, Volpe MT, Meneguz A, Testai E. 2005. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome P450 isoforms. *Drug Metabolism and Disposition*, 33(3):295-302.
- Caballero de Castro AC, Rosenbaum EA, de D'Angelo AMP. 1991. Effect of malathion on *Bufo arenarum* Hensel development-I: Esterase inhibition and recovery. *Biochemical Pharmacology*, 41(4):491-495.
- Cervantes GL, Rodríguez CAR, Rochin EF, Gallardo ALI. 2000. Hidropesía fetal no inmune. Presentación de siete casos. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 43(4):133-137.
- Chambers JE, Meek EC, Chambers HW. 2010. The metabolism of organophosphorus insecticides. En: *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 1399-1407). Academic Press.
- Chemotti DC, Davis SN, Cook LW., Willoughby IR, Paradise CJ, Lom B. 2006. The Pesticide Malathion Disrupts. *Bioscene: Journal of College Biology Teaching*, 32(3):4-18.
- Chowdhury MAZ, Banik S, Uddin B, Moniruzzaman M, Karim N, Gan SH. 2012. Organophosphorus and carbamate pesticide residues detected in water samples collected from paddy and vegetable fields of the Savar and Dhamrai Upazilas in Bangladesh. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(9):3318-3329.
- Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM. 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3):315-335.
- David M, Kartheek RM. 2015. Malathion acute toxicity in tadpoles of *Duttaphrynus melanostictus*, morphological and behavioural study. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 72:1-7.
- de Llamas MC, de Castro AC, de D'Angelo AMP. 1985. Cholinesterase activities in developing amphibian embryos following exposure to the insecticides dieldrin and malathion. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 14(2):161-166.
- De Silva HJ, Samarawickrema NA, Wickremasinghe AR. 2006. Toxicity due to organophosphorus compounds: what about chronic exposure? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(9):803-806.

- Deka S, Mahanta R. 2016. Malathion toxicity on fish-a review. *International Journal of Current Research*, 8(12):44120-44128.
- Drews U. 1975. Cholinesterase in embryonic development. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 7(3):1-52.
- ECOTOX (Ecotoxicology Knowledgebase). <https://cfpub.epa.gov/ecotox/> Fecha de consulta: 25/03/2022
- EPA (Environmental Protection Agency), 2006. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Malathion. Debra Edwards, Ph.D., Special Review and Reregistration Division.
- Ibarra F.E.J., Linares F.T.M. 2012. La inhibición de la actividad colinesterásica sanguínea como biomarcador de exposición a compuestos organofosforados y carbamatos. Una revisión crítica. *Revista Cubana de Salud y Trabajo*, 13(3):59-65.
- Fordham CL, J. Tessari D, Ramsdell HS, Keefe TJ. 2001. Effect of Malation on survival, growth, development and equilibrium posture of bullfrog tadpoles (*Rana catesbiana*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(21):179-184.
- Gallego EM, Sotelo EM, Martínez AV, Vicens JML. 2009. Hidropesía fetal. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*, 52(12):686-695.
- Gindi T, Knowland J. 1979. The activity of cholinesterases during the development of *Xenopus laevis*. *Journal of Embryological and Experimental Morphology*, 51:209-215.
- Giri A, Yadav SS, Giri S, Sharma GD. 2012. Effect of predator stress and malathion on tadpoles of Indian skittering frog. *Aquatic Toxicology*, 106:157-163.
- Gupta RC, Mukherjee IRM, Malik JK, Doss RB, Dettbarn WD, Milatovic D. 2019. Insecticides. En: *Biomarkers in Toxicology* (pp. 455-475). Academic Press.
- Gurushankara HP, Krishnamurthy SV, Vasudev V. 2007a. Effect of malathion on survival, growth, and food consumption of Indian cricket frog (*Limnonectes limnocharis*) tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52(2):251-256.
- Gurushankara HP, Meenakumari D, Krishnamurthy SV, Vasudev V. 2007b. Impact of malathion stress on lipid metabolism in *Limnonectes limnocharis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(1):50-56.
- Gutiérrez PJ, Vásquez UP, Sepúlveda LW. 2008. Hidrops fetal: diagnóstico etiológico y manejo. *Revista Médica Clínica. Condes*, 19(3):185-195 .
- Herek J S, Vargas L, Trindade SAR, Rutkoski CF, Macagnan N, Hartmann PA, Hartmann M T. 2020. Can environmental concentrations of glyphosate affect survival and cause malformation in amphibians? Effects from a glyphosate-based herbicide on *Physalaemus cuvieri* and *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(18):22619-22630.
- Herkovits J, Pérez Coll CS. 2003. AMPHITOX: a customized set of toxicity tests employing amphibian embryos. En: Linder G, Krest S, Sparling D, Little E. (Eds). *Multiple Stressor Effects in Relation to Declining Amphibian Populations*. STP 1443 (pp46-62). ASTM International.

- Herkovits J, Pérez Coll CS, Herkovits FD. 2002. Ecotoxicological studies on environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Environmental Pollution*, 116:177-183.
- Hussain R, Mahmood F, Khan A. 2015. Genotoxic and pathological effects of malathion in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 52(4):1149-1156.
- Hutler Wolkowicz I, Herkovits J, Pérez Coll CS. 2014. Stage-dependent toxicity of bisphenol a on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) embryos and larvae. *Environmental Toxicology*, 29(2):146-154.
- Hutler Wolkowicz I, Svartz GV, Aronzon CM, Pérez Coll C. 2016. Developmental toxicity of bisphenol A diglycidyl ether (epoxide resin badge) during the early life cycle of a native amphibian species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(12):3031-3038.
- Karyab H, Mahvi AH, Nazmara S, Bahobj A. 2013. Determination of water sources contamination to diazinon and malathion and spatial pollution patterns in Qazvin, Iran. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(1):126-131.
- Khangarot BS, Sehga, A, Bhasin MK. 1985. "Man and Biosphere"—Studies on the Sikkim Himalayas. Part 6: Toxicity of Selected Pesticides to Frog Tadpole *Rana hexadactyla* (LESSON). *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 13(3):391-394.
- Kousba AA, Sultatos LG, Poet TS, & Timchalk C. 2004. Comparison of chlorpyrifos-oxon and paraoxon acetylcholinesterase inhibition dynamics: potential role of a peripheral binding site. *Toxicological Sciences*, 80(2):239-248.
- Kralj JG, Sahoo HR, Jensen KF. 2007a. Integrated continuous microfluidic liquid-liquid extraction. *Lab on a Chip*, 7(2):256-263.
- Kralj MB, Černigoj U, Franko M, Trebše P. 2007b. Comparison of photocatalysis and photolysis of malathion, isomalathion, malaaxon, and commercial malathion—Products and toxicity studies. *Water Research*, 41(19):4504-4514.
- Lascano CI, Ferrari A, Gauna LE, Cocca C, Cochón AC, Verrengia N, Venturino A. 2011. Organophosphorus insecticides affect normal polyamine metabolism in amphibian embryogenesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101(3):240-247.
- Lenkowski JR, Sanchez-Bravo G, McLaughlin KA. 2010. Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. *Journal of Environmental Sciences*, 22(9):1305-1308.
- Lipnick RL (Ed.) 2013. *Studies of narcosis: Charles Ernest Overton*. Springer Science & Business Media.
- Mahmoud HM, Haggag AMH, El-Gebaly HS. 2012. Toxicological studies of malathion on Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Life Science Journal*, 9(3):1725-1732.
- Mann RM, Bidwell JR. 2001. The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frog. *Environmental Pollution*, 114:195-205.
- Mann RM, Hyne RV, Choung CB, Wilson SP. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*, 157(11):2903-2927.

- Mussi MA, Calcaterra NB. 2010. Paraquat-induced oxidative stress response during amphibian early embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(2):240-247.
- Newhart K. 2006. Environmental fate of malathion. California Environmental Protection Agency, 11:1-20.
- Nostrandt AC, Padilla S, Moser VC. 1997. The relationship of oral chlorpyrifos effects on behavior, cholinesterase inhibition, and muscarinic receptor density in rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58(1):15-23.
- O'Brien RD. 2014. *Insecticides: action and metabolism*. Academic Press Inc. USA.
- Pašková V, Hilscherová K, Bláha L. 2011. Teratogenicity and embryotoxicity in aquatic organisms after pesticide exposure and the role of oxidative stress. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 211:25-61.
- Patil V. K., & David, M. (2008). Behaviour and respiratory dysfunction as an index of malathion toxicity in the freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). *Turkish Journal of fisheries and aquatic sciences*, 8(2): 01.04.2008
- Pérez Coll CS, Aronzon CM, Svartz GV. 2017. Developmental stages of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) in toxicity studies: AMPHITOX, a customized laboratory assay. En: Larramendy ML. (Ed). *Ecotoxicology and genotoxicology: Non-traditional aquatic models* (pp. 407-424). The Royal Society of Chemistry.
- Pérez Coll CS, Herkovits J. 2004. Lethal and teratogenic effects of naringenin evaluated by means of an amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Food and Chemical Toxicology*, 42(2):299-306.
- Pérez Coll CS, Pabón-Reyes C, Meichtry JM, Litter MI. 2018. Monitoring of toxicity of As (V) solutions by AMPHITOX test without and with treatment with zerovalent iron nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 60:138-145.
- Pope CN. 1999. Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity? *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, 2(2):161-181.
- Pundir CS, Chauhan N. 2012. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Analytical Biochemistry*, 429(1):19-31.
- Ramadani S, Marhendra APW, Wiadnya DGR, Kurniawan N. 2022. Effect of acute toxicity of commercial organophosphate insecticide based on chlorpyrifos on *Fejervarya limnocharis* tadpoles (Anura: Dicroglossidae): Acute toxicity of commercial chlorpyrifos on *Fejervarya limnocharis* tadpole. *Journal of Tropical Life Science*, 12(2):231-240.
- Relyea RA. 2004. Synergistic impacts of malathion and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(4):1080-1084.
- Richards SM, Kendall RJ. 2002. Biochemical effects of chlorpyrifos on two developmental stages of *Xenopus laevis*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(9):826-1835.
- Richardson JR, Chambers HW, Chambers JE. 2001. Analysis of the additivity of in vitro inhibition of cholinesterase by mixtures of chlorpyrifos-oxon and azinphos-methyl-oxon. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 172(2):128-139.

- Rimoldi F., Salgado Costa C., Pantucci Saralegui M.J., Bahl M.F, Natale G.S. 2023. Recovery of *Ceratophrys ornata* tadpoles exposed to environmental concentrations of chlorpyrifos: evaluation of biomarkers of exposure. *Ecotoxicology* 32:638–645
- Rosenbaum EA, Caballero de Castro A, Gauna L, Pechen de D'Angelo AM. 1988. Early biochemical changes produced by malathion on toad embryos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 17(6):831-835.
- Ruiz-Cano D, Pérez-Llamas F, Zamora S. 2012. Implicaciones de las poliaminas en la salud infantil. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 110(3):244-250.
- Sankararamkrishnan N, Sharma AK, Sanghi R. 2005. Organochlorine and organophosphorous pesticide residues in ground water and surface waters of Kanpur, Uttar Pradesh, India. *Environment International*, 31(1):113-120.
- Sayim F. 2008. Acute Toxic Effects of Malathion on the 21st Stage Larvae of the Marsh Frog. *Turkish Journal of Zoology*, 32(1):99-106.
- Segawa RT, Sitts JA, White JH, Marade SJ, Powell SJ. 1991. Environmental monitoring of malathion aerial applications used to eradicate Mediterranean fruit flies in Southern California, (1990). California Department of Food and Agriculture. Report 91-3.
- Snawder JE, Chambers JE. 1990. Critical time periods and the effect of tryptophan in malathion-induced developmental defects in *Xenopus* embryos. *Life sciences*, 46(23):1635-1642.
- Snawder JE, Chambers JE. 1993. Osteolathyrogenic effects of malathion in *Xenopus* embryos. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 121(2):210-216.
- Sparling DW, Fellers G. 2007. Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylei*. *Environmental Pollution*, 147(3):535-539.
- Svartz GV, Aronzon CM, Pérez Coll CS. 2016. Combined endosulfan and cypermethrin-induced toxicity to embryo–larval development of *Rhinella arenarum*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 79(5):197-209.
- Svartz GV, Herkovits J, Pérez-Coll CS. 2012. Sublethal effects of atrazine on embryo-larval development of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology*, 21(4):1251-1259.
- Svartz GV, Wolkowicz IRH, Coll CSP. 2014. Toxicity of endosulfan on embryo-larval development of the South American toad *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(4):875-881.
- Taylor SK, Williams ES, Mills KW. 1999. Effects of malathion on disease susceptibility in Woodhouse's toads. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(3):536-541.
- Tchounwou PB, Patlolla AK, Yedjou CG, Moore PD. 2015. Environmental exposure and health effects associated with malathion toxicity. *Toxicity and Hazard of Agrochemicals*, 51: 2145-2149.
- Tsiaoussis J, Hatzidaki E, Docea AO, Nikolouzakis TK, Petrakis D, Burykina T, Mamoulakis C, Makrigiannakis A, Tsatsakis, A. 2018. Molecular and clinical aspects of embryotoxicity induced by acetylcholinesterase inhibitors. *Toxicology*, 409:137-143.

- Turhan DO, Güngördü A. 2022. Developmental, toxicological effects and recovery patterns in *Xenopus laevis* after exposure to penconazole-based fungicide during the metamorphosis process. *Chemosphere*:135302.
- Vasseghian Y, Dragoi EN, Almoman, F, Golzadeh N, Vo, DVN. 2021. A global systematic review of the concentrations of malathion in water matrices: Meta-analysis, and probabilistic risk assessment. *Chemosphere*:132789.
- Venturino A, Gauna LE, Bergoc RM, Pechen de D'Angelo, A M. 1992. Effect of exogenously applied polyamines on malathion toxicity in the toad *Bufo arenarum* Hensel. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 22(1), 135-139.
- Vera Candioti J, Natale GS, Solonesk, S, Ronco AE, Larramendy M L. 2010. Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®. *Chemosphere*, 78(3):249-255.
- Wagner N, Lötters S, Veith M, Vierte, B. 2015. Acute toxic effects of the herbicide formulation Focus® Ultra on embryos and larvae of the Moroccan painted frog, *Discoglossus scovazzi*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(4):535-544.
- Ware GW, Whitacre DM. 2004. An introduction to insecticides. *The pesticide book*, 6.
- Webb CM, Crain DA. 2006. Effects of ecologically relevant doses of malathion on developing *Xenopus laevis* tadpoles. *Bios*, 77(1):1-6.
- Wezel APV, Opperhuizen A. 1995. Narcosis due to environmental pollutants in aquatic organisms: residue-based toxicity, mechanisms, and membrane burdens. *Critical Reviews in Toxicology*, 25(3):255-279.
- Williman C, Munitz MS, Montti MI, Medina MB, Navarro AF, Ronco AE. 2017. Pesticide survey in water and suspended solids from the Uruguay River Basin, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(6):1-17.
- Yu S, Wages MR, Cai Q, Maul JD, Cobb GP. 2013. Lethal and sublethal effects of three insecticides on two developmental stages of *Xenopus laevis* and comparison with other amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(9):2056-2064.

Sección II – Herbicidas

- Aronzon CM, Sandoval MT, Herkovits J, Pérez-Coll CS. 2011. Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology*, 26(4):373-381.
- Atanasov K. 1992. Effect of the herbicide schpritsormit Na salt of 2, 4-D chlorphenoxyacetic acid) on the karyotype of the domesticated rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Animal Science*. 29(1-2):54-61.
- Bukowska B. 2006. Toxicity of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *Molecular Mechanisms*. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(3):365-374.
- Buslovich S, Borushko N. 1976. Chloroderivatives of phenoxyacetic acid as antagonists of thyroid hormones. *Farmakol Toksikol* 39:481-483.

- Candela L, Fabregat S, Solé M, Rodríguez-Pacheco RL. 2003. Estudios Cinéticos de transporte del herbicida 2,4-D en columnas de laboratorio. Estudios de la Zona no saturada del suelo. VI:106-110.
- Carvalho WF, Ruiz de Arcaute C, Torres L, de Melo e Silva D, Soloneski S, Larramendy ML. 2020. Genotoxicity of mixtures of glyphosate with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid chemical forms towards *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). Environmental Science and Pollution Research, 27(6):6515-6525.
- Charles JM, Hanley Jr TR, Wilson RD, Van Ravenzwaay B, Bus JS. 2001. Developmental toxicity studies in rats and rabbits on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its forms. Toxicological Sciences, 60(1):121-131.
- Curi LM, Peltzer PM, Sandoval MT, Lajmanovich RC. 2019. Acute toxicity and sublethal effects caused by a commercial herbicide formulated with 2,4-D on *Physalaemus albonotatus* tadpoles. Water, Air, & Soil Pollution, 230(1):1-15.
- De Arcaute CR, Larramendy ML, Soloneski S. 2018. Genotoxicity by long-term exposure to the auxinic herbicides 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and dicamba on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). Environmental Pollution, 243:670-678.
- De Arcaute CR, Soloneski S, Larramendy ML. 2016. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 128:222-229.
- de Castro Marcato AC, de Souza CP, Fontanetti CS. 2017. Herbicide 2, 4-D: a review of toxicity on non-target organisms. Water, Air, & Soil Pollution, 228(3):1-12.
- Disner GR, Falcão MAP, Andrade-Barros AI, Leite dos Santos NV, Soares ABS, Marcolino-Souza M, Souza Gomes K, Lopes-Ferreira M. 2021. The toxic effects of glyphosate, chlorpyrifos, abamectin, and 2,4-D on animal models: a systematic review of Brazilian studies. Integrated Environmental Assessment and Management, 17(3):507-520.
- ECOTOX (Ecotoxicology Knowledgebase). <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>. Fecha de consulta: 15 de marzo de 2022.
- Fedtke CARL, Duke SO. 2005. Herbicides. En: Hock B, Elstner EF. (Eds.) *Plant Toxicology*. (pp. 247-330). Marcel Dekker.
- Freitas JS, Giroto L, Goulart BV, Alho LDOG, Gebara RC, Montagner CC, Espíndola, ELG. 2019. Effects of 2,4-D based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. Ecotoxicology and Environmental Safety, 182:109446.
- Gaaied S, Oliveira M, Domingues I, Banni M. 2020. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide effects on zebrafish larvae: development, neurotransmission and behavior as sensitive endpoints. Environmental Science and Pollution Research, 27(4):3686-3696.
- Gervais G, Brosillon S, Laplanche A, Helen C. 2008. Ultra-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water. Journal of Chromatography A, 1202(2):163-172.

- Green J, Wheeler JR. 2013. The use of carrier solvents in regulatory aquatic toxicology testing: Practical, statistical and regulatory considerations. *Aquatic Toxicology*, 144:242-249.
- Gupta PK. 2018. Toxicity of herbicides. En: Gupta RC (Ed.) *Veterinary toxicology: basic and clinical principles*. (pp. 553-567). Academic Press.
- Herkovits J, Pérez-Coll CS. 1999. Bioensayos de Toxicidad con embriones de anfibio (Anfitox). Parte I. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, 42:24-30.
- Jacobi H, Witte I. 1991. Synergistic effects of U46 D fluid (dimethylammonium salt of 2,4-D) and CuCl₂ on cytotoxicity and DNA repair in human fibroblasts. *Toxicology Letters*, 58(2):159-167.
- Lajmanovich RC, Attademo AM, Simoniello MF, Poletta GL, Junges CM, Peltzer PM, Grenón P, Cabagna-Zenklusen MC. 2015. Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2,4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(12):1-12.
- Lenkowski JR, Sanchez-Bravo G, McLaughlin KA. 2010. Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. *Journal of Environmental Sciences*, 22(9):1305-1308.
- Li K, Wu JQ, Jiang LL, Shen LZ, Li JY, He ZH, He MF. 2017. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. *Chemosphere*, 171:40-48.
- Losthe J, Roth P. 1946. Sur l'action des solutions aqueuses de 2,4-Dichphényxycétate de sodium sur l'évolution des oeufs de *Rana temporaria*. *Journal de la Société de Biologie*, 140: 272-273
- Mesak C, de Oliveira Mendes B, de Oliveira Ferreira R, Malafaia G. 2018. Mutagenic assessment of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the 2, 4-D herbicide in a simulated realistic scenario. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(15): 15235-15244.
- Morgan M K. 1996. Teratogenic potential of atrazine and 2, 4-D using FETAX. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 48(2):151-168.
- Morgan MK, Scheuerman PR, Bishop CS, Pyles RA. 1996. Teratogenic potential of antrazine and 2,4-D using FETAX. *Journal of Toxicological and Environmental Health* 48:151-168.
- Mustonen R, Kangas J, Vuojolahti P, Linnainmaa K. 1986. Effects of phenoxyacetic acids on the induction of chromosome aberrations in vitro and in vivo. *Mutagenesis*, 1(4):241-245.
- Nagy K, Duca RC, Lovas S, Creta M, Scheepers PT, Godderis L, Ádám B. 2020. Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. *Environmental Research*, 181:108926.
- Oliveira GH, Palermo-Neto J. 1993. Effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) on open-field behaviour and neurochemical parameters of rats. *Pharmacology & Toxicology*, 73(2):79-85.
- Peterson MA, McMaster SA, Riechers DE, Skelton J, Stahlman PW. 2016. 2, 4-D past, present, and future: a review. *Weed Technology*, 30(2):303-345.

- Rosso SB, Di Paolo OA, de Duffard AME, Duffard R. 1997. Effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on central nervous system of developmental rats. Associated changes in ganglioside pattern. *Brain Research*, 769(1):163-167.
- Rosso SB, Cáceres AO, de Duffard AME, Duffard RO, Quiroga S. 2000. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid disrupts the cytoskeleton and disorganizes the Golgi apparatus of cultured neurons. *Toxicological sciences*, 56(1):133-140.
- Stebbins-Boaz B, Fortner K, Frazier J, Piluso S, Pullen S, Rasar M, Reid W, Sinclair K, Winger, E. 2004. Oocyte maturation in *Xenopus laevis* is blocked by the hormonal herbicide, 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 67(2):233-242.
- Suwalsky M, Benites M, Villena F, Aguilar F, Sotomayor CP. 1996. Interaction of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) with cell and model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1285(2):267-276.
- USEPA-United States Environmental Protection Agency. 2005. Reregistration eligibility decision for 2,4-D. Washington, DC: United States Environmental Protections Agency.
- Vardia HK, Sambasiva Rao P, Durve VS. 1984. Sensitivity of toad larvae to 2,4-D and endosulfan pesticides. *Archives fuer Hydrobiologie*, 200(3):395-400.
- Venkov P, Topashka-Ancheva M, Georgieva M, Alexieva V, Karanov E. 2000. Genotoxic effect of substituted phenoxyacetic acids. *Archives of Toxicology*, 74(9):560-566.
- Viriato C, França FM, Santos DS, Marcantonio AS, Badaró-Pedroso C, Ferreira CM. 2021. Evaluation of the potential teratogenic and toxic effect of the herbicide 2,4-D (DMA® 806) in bullfrog embryos and tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Chemosphere*, 266:129018.
- Young SD, Gavel MJ, Gutierrez-Villagomez JM, Forbes MR, Robinson SA. 2020. Assessment of sublethal ecotoxicity of solvents on larvae of a model native amphibian (*Lithobates pipiens*). *Journal of Applied Toxicology*, 40(4):483-492.
- Zafra-Lemos L, Cusiol, LF, Bergamasco R, Borin-Carvalho LA, de Brito Portela-Castro AL. 2021. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of exposure to the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in *Astyanax lacustris* (Pisces, Characidae) and the potential for its removal from contaminated water using a biosorbent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 865:503335.

Capítulo III – Metales pesados

- Ali H, Khan E, Ilahi I. 2019. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of Chemistry*, 2019: ID 6730305.
- Ali H, Khan E. 2019. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs-Concepts and implications for wildlife and human health. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 25(6):1353-1376.

- Cuillet M. 2009. The dual personality of ionic copper in biology. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 65(1-2):165-170.
- Finkelstein J. 2009. Metalloproteins. *Nature*, 460(7257):813-813.
- Linder G, Grillitsch B. 2000. Ecotoxicology of Metals. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA. (Eds). *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. (pp. 325-459) Pensacola, FL: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).
- Rahman Z, Singh VP. 2019. The relative impact of toxic heavy metals (THMs)(arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(7):1-21.
- Rodríguez HR. 2005. Contaminación de sedimentos del río Anoia por metales pesados (Barcelona-España). *Revista Investigación & Desarrollo*, 1(5).
- Tchounwou P.B., Yedjou CG., Patlolla A.K., Sutton D.J. 2012. Heavy metal toxicity and the environment. En: Andreas Luch A. (Ed) *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology Vol 3 Environmental Toxicology* (pp 133-164). Springer.

Sección I – Cobre

- Anjos VA, da Silva-Júnior FM, Souza MM. 2014. Cell damage induced by copper: an explant model to study anemone cells. *Toxicology in Vitro*, 28(3):365-372.
- Araújo CV, Shinn C, Moreira-Santos M, Lopes I, Espíndola EL, Ribeiro R. 2014. Copper-driven avoidance and mortality in temperate and tropical tadpoles. *Aquatic Toxicology*, 146:70-75.
- Aronzon CM, Sandoval MT, Herkovits J, PérezColl CS. 2011. Stage-dependent susceptibility to copper in *Rhinella arenarum* embryos and larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(12):2771-2777.
- Aston NS, Watt N, Morton IE, Tanner MS, Evans GS. 2000. Copper toxicity affects proliferation and viability of human hepatoma cells (HepG2 line). *Human & Experimental Toxicology*, 19(6):367-376.
- Brown MG, Dobbs EK, Snodgrass JW, Ownby DR. 2012. Ameliorative effects of sodium chloride on acute copper toxicity among Cope's gray tree frog (*Hyla chrysoscelis*) and green frog (*Rana clamitans*) embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(4):836-842.
- Cuillet M. 2009. The dual personality of ionic copper in biology. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 65(1-2):165-170.
- Dwyer FJ, Mayer FL, Sappington LC, Buckler DR, Bridges CM, Greer IE, Hardesty DK, Henke CE, Ingersoll CG, Kunz JL, Whites DW, Augspurger T, Mount DR, Hattala K, Neuderfer GN. 2005. Assessing contaminant sensitivity of endangered and threatened aquatic species: Part I. Acute toxicity of five chemicals. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 48:143-154.
- ECOTOX (Ecotoxicology Knowledgebase). <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>. Fecha de consulta: 23 de mayo 2022.
- Ferreira CM, Lombardi JV, Machado-Neto JG, Bueno-Guimaraes HM, Soares SRC, Saldiva PHN. 2004. Effects of copper oxychloride in *Rana catesbeiana* tadpoles:

- toxicological and bioaccumulative aspects. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(3):465-470.
- Fleming CA, Trevors JT. 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: A review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 44:143–158.
- Flynn RW, Scott DE, Kuhne W, Soteropoulos D, Lance SL. 2015. Lethal and sublethal measures of chronic copper toxicity in the eastern narrowmouth toad, *Gastrophryne carolinensis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(3):575-582.
- Fort DJ, Rogers RL, Thomas JH, Buzzard BO, Noll AM, Spaulding CD. 2004. Comparative sensitivity of *Xenopus tropicalis* and *Xenopus laevis* as test species for the FETAX model. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 24(6):443-457.
- Franco-de-Sá JFO, Val AL. 2014. Copper toxicity for *Scinax ruber* and *Rhinella granulosa* (Amphibia: Anura) of the Amazon: Potential of Biotic Ligand Model to predict toxicity in urban streams. *Acta Amazonica*, 44(4):491-498.
- Gaetke LM, Chow CK. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2):147-163.
- Gaetke LM, Chow-Johnson HS, Chow CK. 2014. Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Archives of Toxicology*, 88(11):1929-1938.
- García-Muñoz E, Guerrero F, Parra G. 2009. Effects of copper sulfate on growth, development, and escape behavior in *Epidalea calamita* embryos and larvae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(3):557-565.
- Gómez ML, Zaracho VH, Sandoval MT. 2016. Desarrollo embrionario-larval y metamorfosis de *Physalaemus albonotatus* (Anura: Leptodactylidae). *Revista Veterinaria*, 27(1):21-27.
- Grosell M. 2011. Copper. En: Wood C, Farrel A, Brauner C. (Eds). *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. Vol. 31-Fish Physiology. Academic, San Diego, CA, USA, pp 54–110.
- Hamilton MD. 2003. Developmental toxicity of atrazine and copper sulfate using the frog embryo teratogenesis assay-xenopus (FETAX)" *Morehead State Theses and Dissertations*. 714.
- Henry PFP. 2000. Aspects of amphibian anatomy and physiology. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA. (Eds). 2000. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. Pensacola, FL: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). 904 p.
- Herkovits J, Helguero LA. 1998. Copper toxicity and copper–zinc interactions in amphibian embryos. *Science of the Total Environment*, 221(1):1-10.
- Herkovits J, Pérez Coll CS. 2007. Acclimation to low level exposure of copper in *Bufo arenarum* embryos: linkage of effects to tissue residues. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 4(2):166-172.
- IPCS. 1998. *Environmental Health Criteria 200. Copper*. WHO: Geneva.
- Jeong J, Mao J, Tenzen T, Kottmann AH, McMahon AP. 2004. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes & development*, 18(8):937-951.

- Khargarot BS, Sehgal A, Bhasin MK. 1985. "Man and Biosphere"-Studies on the Sikkim Himalayas. Part 5: Acute toxicity of selected heavy metals on the tadpoles of *Rana hexadactyla*. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 13(2):259-263.
- Linder MC, Hazegh-Azam M. 1996. Copper biochemistry and molecular biology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 63(5):797S-811S.
- Lombardi JV, Perpetuo TR, Ferreira CM, Machado-Neto JG, Marques HLA. 2002. Acute toxicity of the fungicide copper oxochloride to tadpoles of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(3):415-420.
- Luo SQ, Plowman MC, Hopfer SM, Sunderman FW. 1993. Embryotoxicity and teratogenicity of Cu²⁺ and Zn²⁺ for *Xenopus laevis*, assayed by the FETAX procedure. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 23(2):111-120.
- Manzl C, Enrich J, Ebner H, Dallinger R, Krumschnabel G. 2004. Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. *Toxicology*, 196(1-2):57-64.
- Martini F, Tarazona JV, Pablos M. 2012. Are fish and standardized FETAX assays protective enough for amphibians? A case study on *Xenopus laevis* larvae assay with biologically active substances present in livestock wastes. *The Scientific World Journal*, 2012: ID 605804.
- Moreno Grau MD. 2003. *Toxicología Ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana*. Mc Graw-Hill, Madrid, España.
- New Jersey Department of Health and Senior Services, 2007. <https://nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/0532sp.pdf>
- Ossana NA, Castañé PM, Poletta GL, Mudry MD, Salibián A. 2010. Toxicity of waterborne copper in premetamorphic tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84(6):712-715.
- Peña MM, Lee J, Thiele DJ. 1999. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *The Journal of Nutrition*, 129(7):1251-1260.
- Pérez Coll CS, Herkovits J. 2006. Synergistic effects of copper and butyric ester of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (Esternon Ultra) on amphibian embryos. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 3(4):343-347.
- Redick MS, La Point TW. 2004. Effects of sublethal copper exposure on behavior and growth of *Rana pipiens* tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(4):706-710.
- Royer A, Sharman T. 2021. Copper Toxicity. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). PMID:32491388.
- Santagati F, Rijl, FM. 2003. Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(10):806-818.
- Santos B, Ribeiro R, Domingues I, Pereira R, Soares AM, Lopes I. 2013. Salinity and copper interactive effects on Perez's frog *Pelophylax perezi*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(8):1864-1872.

- Shuhaimi-Othman M, Nadzifah Y, Umirah NS, Ahmad AK. 2012. Toxicity of metals to tadpoles of the common Sunda toad, *Duttaphrynus melanostictus*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94(2):364-376.
- Venturino A, Rosenbaum E, Caballero De Castro A, Anguiano OL, Gauna L, Fonovich De Schroeder T, Pechen De D'Angelo AM. 200). Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers*, 8(3-4):167-186.
- Willis BE, Bishop WM. 2016. Understanding fate and effects of copper pesticides in aquatic systems. *Journal of Geoscience and Environment Protection*, 4(5):37-42.
- Xia K, Zhao H, Wu M, Wang H. 2012. Chronic toxicity of copper on embryo development in Chinese toad, *Bufo gargarizans*. *Chemosphere*, 87(11):1395-1402.
- Zhang T, Xu L, Wu JJ, Wang WM, Mei J, Ma XF, Liu JX. 2015. Transcriptional responses and mechanisms of copper-induced dysfunctional locomotor behavior in zebrafish embryos. *Toxicological Sciences*, 148(1):299-310.

Sección II – Arsénico

- Bardach AE, Ciapponi A, Soto N, Chaparro MR, Calderon M, Briatore A, Cadoppi N, Tassara R, Litter MI. 2015. Epidemiology of chronic disease related to arsenic in Argentina: A systematic review. *Science of the Total Environment*, 538:802-816.
- Bhattacharjee P, Chatterjee D, Singh KK, Giri AK. 2013. Systems biology approaches to evaluate arsenic toxicity and carcinogenicity: An overview. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216(5):574-586.
- Birge WJ, Hudson JE, Black JA., Westerman AG. 1979. Embryo-larval bioassay on inorganic coal elements and *in situ* biomonitoring of coal-waste effluents. Surface mining and fish/wildlife needs in the Eastern United States: proceedings of a symposium, Department of the Interior, Fish and Wildlife Service.
- Brodeur JC, Asorey CM, Sztrum A, Herkovits J. 2009. Acute and subchronic toxicity of arsenite and zinc to tadpoles of *Rhinella arenarum* both alone and in combination. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72(14):884-890.
- Davey JC, Nomikos AP, Wungjiranirun M, Sherman JR, Ingram L, Batki C, Lariviere JP, Hamilton JW. 2008. Arsenic as an endocrine disruptor: arsenic disrupts retinoic acid receptor–and thyroid hormone receptor–mediated gene regulation and thyroid hormone–mediated amphibian tail metamorphosis. *Environmental Health Perspectives*, 116(2):165-172.
- Gornati R, Monetti C, Vigetti D, Bosisio S, Fortaner S, Sabbioni E, Bernardini G, Prati M. 2002. Arsenic toxicity and HSP70 expression in *Xenopus laevis* embryos. *Alternatives to Laboratory Animals*, 30(6):597-603.
- Hughes MF, Beck BD, Chen Y, Lewis AS, Thomas DJ. 2011. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicological Sciences*, 123(2):305-332.
- Hughes MF. 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*, 133(1):1-16.

- Johnson CR. 1976. Herbicide toxicities in some Australian anurans and the effect of subacute dosages on temperature tolerance. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 59(1):79-83.
- Khangarot BS, Sehgal A, Bhasin MK. 1985. Man and Biosphere"-Studies on the Sikkim Himalayas. Part 5: Acute toxicity of selected heavy metals on the tadpoles of *Rana hexadactyla*. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 13(2):259-263.
- Kuhlmeier PD. 1997a. Partitioning of arsenic species in fine-grained soils. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 47(4):481-490.
- Kuhlmeier PD. 1997b. Sorption and desorption of arsenic from sandy soils: Column studies. *Soil and Sediment Contamination*, 6(1):21-36.
- Lajmanovich RC, Peltzer PM, Attademo AM, Martinuzzi CS, Simoniello MF, Colussi CL, Cuzziol Boccioni AP, Sigrist M. 2019. First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Heliyon*, 5(10):e02601.
- Linder G, Grillitsch B. 2000. Ecotoxicology of Metals. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA. (Eds). *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. (pp. 325-459) Pensacola, FL: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).
- Litter M. 2018. Arsénico en agua. En: Abraham EM., Quintana RD, Mataloni G. (Eds.). *Aguas + Humedales*. (pp 224-211). 1a ed. San Martín: Universidad Nacional de San Martín (UNSAM Edita).
- Litter M. 2010. La problemática del arsénico en la Argentina: el HACRE. *Revista SAEGRE*, 17(2):1-10.
- Litter MI, Ingallinella AM, Olmos V, Savio M, Difeo G, Botto L, Farfán Torres E, Taylor S, Frangie S, Herkovits J, Schalamuk I, González MJ, Berardozi E, García Einschla FS, Bhattacharya P, Ahmad A. 2019. Arsenic in Argentina: technologies for arsenic removal from groundwater sources, investment costs and waste management practices. *Science of the Total Environment*, 690:778-789.
- Mardirosian MN, Lascano CI, Ferrari A, Bongiovanni GA, Venturino A. 2015. Acute toxicity of arsenic and oxidative stress responses in the embryonic development of the common South American toad *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(5):1009-1014.
- Medina-Pizzali M, Robles P, Mendoza M, Torres C. 2018. Ingesta de arsénico: el impacto en la alimentación y la salud humana. *Revista Peruana de medicina experimental y salud pública*, 35:93-102.
- Moreno Grau. M. D. 2003. *Toxicología Ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana*. Mc Graw-Hill, Madrid, España.
- O'Reilly, J., Watts, M. J., Shaw, R. A., Marcilla, A. L., & Ward, N. I. (2010). Arsenic contamination of natural waters in San Juan and La Pampa, Argentina. *Environmental Geochemistry and Health*, 32(6), 491-515.
- Pérez Coll CS, Pabón-Reyes C, Meichtry JM, Litter MI. 2018. Monitoring of toxicity of As (V) solutions by AMPHITOX test without and with treatment with zerovalent iron nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 60:138-145.

- Rahman MA, Hasegawa H, Lim RP. 2012. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. *Environmental Research*, 116:118-135.
- Ratnaike RN. 2003. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgraduate Medical Journal*, 79(933):391-396.
- Samanta P, Pal S, Mukherjee AK, Ghosh AR. 2020. Acute toxicity assessment of arsenic, chromium and almix 20WP in *Euphlyctis cyanophlyctis* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 191:110209.
- Singh AP, Goel RK, Kaur T. 2011. Mechanisms pertaining to arsenic toxicity. *Toxicology International*, 18(2):87.
- Singh R, Singh S, Parihar P, Singh VP, Prasad SM. 2015. Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112:247-270.
- Singha U, Pandey N, Boro F, Gir S, Giri A, Biswas S. 2014. Sodium arsenite induced changes in survival, growth, metamorphosis and genotoxicity in the Indian cricket frog (*Rana limnocharis*). *Chemosphere*, 112:333-339.
- Smedley PL, Kinniburgh DG. 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17(5):517-568.
- Smedley PL, Nicolli HB, Macdonald DMJ, Kinniburgh DG. 2008. Arsenic in groundwater and sediments from La Pampa province, Argentina. En: Bundschuh J, Armienta MA, Birkle P, Bhattacharya P, Matschullat J., Mukherjee AB. (Eds) *Natural Arsenic in Groundwaters of Latin America*. Taylor & Francis, 35-45.
- Sodhi KK, Kumar M, Agrawal PK, Singh DK. 2019. Perspectives on arsenic toxicity, carcinogenicity and its systemic remediation strategies. *Environmental Technology & Innovation*, 16:100462.
- Wang S, Mulligan CN. 2006. Occurrence of arsenic contamination in Canada: sources, behavior and distribution. *Science of the total Environment*, 366(2-3):701-721.

Capítulo IV - Consideraciones finales y conclusiones

- Alwan S, Chambers CD. 2015. Identifying human teratogens: an update. *Journal of Pediatric Genetics*, 4(02):039-041.
- Balali-Mood M, Naseri K, Tahergorabi Z, Khazdair MR, Sadeghi M. 2021. Toxic mechanisms of five heavy metals: mercury, lead, chromium, cadmium, and arsenic. *Frontiers in pharmacology*, 12:643972.
- Branch S 2004. Teratogenesis. En: Hodgson E (Ed). *A Textbook of Modern Toxicology*, pp.251-259.
- Bridges CC, Zalups RK. 2005. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(3):274-308.
- Finnell RH, Waes JGV, Eudy JD, Rosenquist TH. 2002. Molecular basis of environmentally induced birth defects. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42(1):181-208.

- Gilbert SF y Barresi MJF. 2016. *Developmental Biology*. 11^{ma} Edición. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Gilbert SF, Epel D. 2009. *Ecological Developmental Biology: Integrating Epigenetics, Medicine, And Evolution*. *Ecological Developmental Biology: Integrating Epigenetics, Medicine, and Evolution*. Sinauer Associates.
- Gilbert-Barness E. 2010. Teratogenic causes of malformations. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 40(2):99-114.
- Gosner KL. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3):183-190.
- Hall JÁ. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366):1-11.
- Hansen M, Jacob BR, Piorczynski TB. 2018. Oxidative stress during development: chemical-induced teratogenesis. *Current Opinion in Toxicology*, 7:110-115.
- Kowalski TW, de Vargas Dupont Á, Rengel BD, Sgarioni E, do Amaral Gomes J, Fraga LR, Schuler-Faccini L, Vianna FSL. 2019. Assembling systems biology, embryo development and teratogenesis: What do we know so far and where to go next? *Reproductive Toxicology*, 88:67-75.
- Mann RM, Bidwell JR. 2001. The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs. *Environmental Pollution*, 114(2):195-205.
- Mann RM, Hyne RV, Choung CB, Wilson SP. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*, 157(11):2903-2927.
- Mesnager R, Antoniou MN. 2018. Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides. *Frontiers in Public Health*, 5:361.
- Meteyer CU, Cole RA, Converse KA, Docherty DE, Wolcott M, Helgen JC, Levey R, Eaton-Poole L, Burkhart JG. 2000. Defining anuran malformations in the context of a developmental problem. *Journal of the Iowa Academy of Science*, 107(3-4):72-78.
- Meteyer CU. 2000. Field guide to malformations of frogs and toads: with radiographic interpretations: U.S. Geological Survey BSR 2000-0005, 20 p.
- Ortiz-Santaliestra ME, Marco A, Fernández MJ, Lizana M. 2006. Influence of developmental stage on sensitivity to ammonium nitrate of aquatic stages of amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(1):105-111.
- Pereira JL, Antunes SC, Castro BB, Marques CR, Gonçalves AM, Gonçalves F, Pereira, R. 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology*, 18(4):455-463.
- Puglis HJ, Boone MD. 2011 Effects of technical-grade active ingredient vs. Commercial formulation of seven pesticides in the presence or absence of UV radiation on survival of green frog tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60:145-155.

- Relyea RA. 2005. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*, 15(4):1118-1124.
- Rogers MB, Glozak MA, Heller LC. 1997. Induction of altered gene expression in early embryos. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 396 (1-2):79-95.
- Sadler TW. 2017. Establishing the embryonic axes: prime time for teratogenic insults. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 4(3):15.
- Saxén L. 1976. Mechanisms of teratogenesis. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 36(1):1-12.
- Valko MMHCM, Morris H, Cronin MTD. 2015. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12(10):1161-1208.
- Wells PG, Kim PM, Laposa RR, Nicol CJ, Parmana T, Winn LM. 1997. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 396(1-2):65-78.
- Wolpert L, Tickle C, Arias AM. 2015. *Principles of Development*. Oxford University Press, USA.

ABREVIATURAS

µg/l: microgramos por litro

µm: micras

2,4-D: Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

A: aurícula

AI: asas intestinales

As: Arsénico

BI: branquias internas

C: corazón

CA: cono arterial

CA: control acetona

CE: Concentración Efectiva

CL 50: Concentración Letal 50

CL: Concentración Letal

CL10: Concentración Letal 10

CL90: Concentración Letal 90

CLs: Concentraciones Letales

CSA: Control Solución AMPHITOX

Cu: cobre

CX: Control Xileno

DO: disco oral

E.: estadios del desarrollo

E: espiráculo

H: hígado

h: horas

I: intestino

IR: infrarostrodonte

IT: Índice Teratogénico

LHC: Longitud Hocico-Cloaca

LOAEL: *lowest observed adverse effect level* o menor nivel al cual se observen efectos adversos

LOEC: mínima concentración que tiene efecto letal

LT: Longitud Total

M: mesonefros

MEB: Microscopio Electrónico de Barrido

mg/l: miligramo por litro

mm: milímetros

NOAEL: *no adverse effect level* o nivel que no produce efectos adversos

NOEC: máxima concentración que no tiene efecto letal

P: páncreas

PA: papilas adhesivas

PB: papilas bucales

PIO: pliegue opercular

Q: queratodontes

SA: Solución AMPHITOX

SR: suprarostrodonte.

V: ventrículo

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a mis directores. A Jorge Herkovits por haberme abierto las puertas de la Fundación PROSAMA y brindado la posibilidad de realizar este trabajo. A Cristina Perez-Coll por sus enseñanzas, su calidez y por estar en todos los detalles. A ambos por su tiempo y paciencia y por tener siempre palabras de aliento.

A Beatriz Avanza, por animarme siempre a superarme, es para mí un ejemplo de resiliencia.

A mi familia, papá, mamá, Vivi, Lili, Jorge, Victor, Eli, José, Edgardo, Gabi, Paula y Guido. Gracias por cuidar a Pilar y Tomás cuando tenía que ausentarme.

A Armando Garrido, Olga Dominguez y Amanda Álvarez, por alojarme en mis largas estadías en Buenos Aires.

A Carolina Áronzon, mi compañera de trabajo, por hacer amenas esas largas horas de ensayo en el laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio de Herpetología, especialmente a Ayelén Vaca por sus dibujos.

Un especial agradecimiento a los revisores de este manuscrito, por haberse tomado el tiempo de analizarlo y sugerir modificaciones que han contribuido a mejorar su presentación.

A todas aquellas personas que fueron parte de mi formación y crecimiento personal y académico.