



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

“Caracterización de la toxicidad de formulaciones comerciales de los plaguicidas mancozeb, imidacloprid y cletodim sobre el desarrollo temprano del sapo autóctono *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae)”

Tesis presentada para optar al Título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en
el área de Ciencias Biológicas

Lic. Yamila Belén Asparch

Directora de tesis: Dra. Cristina Pérez Coll

Directora adjunta de tesis: Dra. Gabriela Svartz

Consejero de Estudios: Dra. Paula Vissio

Lugar de trabajo: Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental-CONICET,
Universidad Nacional de San Martín.

Buenos Aires, Abril 2022

Resumen

La contaminación por plaguicidas es una de las causas propuestas para explicar la disminución de las poblaciones de anfibios a nivel global. Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue evaluar la toxicidad de 3 plaguicidas de uso frecuente en nuestro país, mancozeb, imidacloprid y cletodim en formulaciones comerciales sobre el desarrollo temprano del anfibio autóctono *Rhinella arenarum*. Se evaluaron los efectos letales y subletales (alteraciones morfológicas y etológicas) de los 3 plaguicidas durante el desarrollo embrionario (a partir del estadio de 2-blastómeros, E.3) y larval (a partir del estadio de opérculo completo, E.25) mediante bioensayos estandarizados (ANFITOX). Se expusieron los individuos a un amplio rango de concentraciones por periodos agudo (hasta las 96 h), subcrónico (168 h) y crónico (336-504 h). Asimismo, se analizó la respuesta de biomarcadores de neuroprotección y genotoxicidad (actividad de la butirilcolinesterasa y ensayo de micronúcleos, respectivamente) por exposición a concentraciones subletales. Los plaguicidas causaron letalidad en embriones y larvas, siendo el mancozeb el que causó la mayor toxicidad (e.g embriones: $CL_{50}^{\text{Mancozeb-48h}}=1,9$ mg/L; $CL_{50}^{\text{Imidacloprid-48h}}=2235,1$ mg/L; $CL_{50}^{\text{Cletodim-48h}}=18,3$ mg/L). La exposición al mancozeb mostró que el período embrionario fue el más sensible con resultados similares en respuesta a la exposición por pulsos de 24 h. Para imidacloprid, las larvas fueron más sensibles durante la exposición aguda y en tiempos crónicos no difirieron de los embriones. Para cletodim, ambas etapas del desarrollo mostraron similar sensibilidad. Los 3 plaguicidas causaron malformaciones embrionarias y alteraciones en el comportamiento. Los valores de los índices teratogénicos indicaron una alta probabilidad de ocurrencia de malformaciones en ausencia de mortalidad significativa. En larvas, la incidencia de deformidades fue menor observándose principalmente hidropesía en aquellas expuestas a mancozeb e imidacloprid ($LOEC^{\text{Mancozeb}}=0,1$ mg/L y $LOEC^{\text{Imidacloprid}}=500$ mg/L) y ausencia de movimiento por exposición al cletodim ($LOEC^{\text{Cletodim}}=7,5$ mg/L). El mancozeb causó una aceleración en el tiempo de emergencia de miembros posteriores ($LOEC=0,1$ mg/L) pero no afectó la emergencia de miembros anteriores ni el clímax metamórfico. La condición corporal en la metamorfosis no difirió entre tratamientos y control. Los plaguicidas disminuyeron la actividad de la enzima butirilcolinesterasa ($LOEC^{\text{Mancozeb}}=0,05$ mg/L; $LOEC^{\text{Imidacloprid}}=60$ mg/L; $LOEC^{\text{Cletodim}}=0,01$ mg/L) e incrementaron la frecuencia de micronúcleos ($LOEC^{\text{Mancozeb-48h}}=0,05$ mg/L; $LOEC^{\text{Mancozeb-96h}}=0,01$ mg/L; $LOEC^{\text{Imidacloprid-48-96h}}=1$ mg/L; $LOEC^{\text{Cletodim-48-96h}}=0,01$ mg/L).

$_{48-96h} = 0,01 \text{ mg/L}$). En conjunto, los resultados demuestran que estos plaguicidas utilizados en los agroecosistemas argentinos tienen un profundo impacto a nivel morfológico y fisiológico en *R. arenarum* por lo que de hallarse expuestos a las concentraciones aquí ensayadas, esa situación podría constituir un perjuicio para su salud y biodiversidad.

Palabras clave: Anfibios; Malformaciones; Teratogénesis; Biomarcadores; Mancozeb; Imidacloprid; Cletodim; Bioensayos estandarizados.

Characterization of the toxicity of commercial formulations of the pesticides mancozeb, imidacloprid and clethodim on the early development of the native toad *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae)

Abstract

Pesticide contamination is one of the causes proposed to explain the decline of amphibian populations globally. Therefore, the objective of this thesis was to evaluate the toxicity of 3 pesticides frequently used in our country, mancozeb, imidacloprid and clethodim in commercial formulations on the early development of the native amphibian *Rhinella arenarum*. The lethal and sublethal effects (morphological and ethological alterations) of the 3 pesticides during embryonic (from the 2-blastomere stage, E.3) and larval (from the full operculum stage, E.25) development were evaluated by standardized bioassays (AMPHITOX). Individuals were exposed to a wide range of concentrations for acute (up to 96 h), subchronic (168 h) and chronic (336-504 h) periods. The response of biomarkers of neuroprotection and genotoxicity (butyrylcholinesterase activity and micronucleus assay, respectively) was also analyzed for exposure to sublethal concentrations. The pesticides caused lethality in embryos and larvae, with mancozeb causing the highest toxicity (e.g. embryos: $LC50_{\text{Mancozeb-48h}}=1.9$ mg/L; $LC50_{\text{Imidacloprid-48h}}=2235.1$ mg/L; $LC50_{\text{Clethodim-48h}}=18.3$ mg/L). Exposure to mancozeb showed that the embryonic period was the most sensitive with similar results in response to 24-h pulse exposure. For imidacloprid, larvae were most sensitive during acute exposure and at chronic times did not differ from embryos. For clethodim, both developmental stages showed similar sensitivity. All 3 pesticides caused embryonic malformations and behavioral alterations. The values of the teratogenic indices indicated a high probability of occurrence of malformations in the absence of significant mortality. In larvae, the incidence of deformities was lower, mainly dropsy being observed in those exposed to mancozeb and imidacloprid ($LOEC_{\text{Mancozeb}}=0.1$ mg/L and $LOEC_{\text{Imidacloprid}}=500$ mg/L) and absence of movement due to exposure to clethodim ($LOEC_{\text{Clethodim}}=7.5$ mg/L). Mancozeb caused an acceleration in hind limb emergence time ($LOEC=0.1$ mg/L) but did not affect forelimb emergence or metamorphic climax. Body condition at metamorphosis did not

differ between treatments and control. Pesticides decreased butyrylcholinesterase enzyme activity ($LOEC_{\text{Mancozeb}}=0.05 \text{ mg/L}$; $LOEC_{\text{Imidacloprid}}= 60 \text{ mg/L}$; $LOEC_{\text{Clethodim}}=0.01 \text{ mg/L}$) and increased micronucleus frequency ($LOEC_{\text{Mancozeb-48h}}=0.05 \text{ mg/L}$; $LOEC_{\text{Mancozeb-96h}}=0.01 \text{ mg/L}$; $LOEC_{\text{Imidacloprid-48-96h}}= 1 \text{ mg/L}$; $LOEC_{\text{Clethodim-48-96h}}=0.01 \text{ mg/L}$). Overall, the results show that these pesticides used in Argentine agroecosystems have a profound impact on the morphological and physiological level in *R. arenarum*, so that if they are exposed to the concentrations tested here, this situation could be detrimental to their health and biodiversity.

Key words: Amphibians; Malformations; Teratogenesis; Biomarkers; Mancozeb; Imidacloprid; Clethodim; Standardized bioassays.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Universidad Nacional de San Martín por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado a través de la financiación de mi beca doctoral.

Así mismo, quiero agradecer a la Universidad de Buenos Aires, y a todos sus excelentísimos docentes que durante 12 años me han acompañado en mi educación y formación científica brindándome gratuitamente sus conocimientos con absoluta dedicación.

Al Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental y todo su personal por su amabilidad y predisposición absoluta.

A mis directoras, la Dra. Cristina Pérez Coll y la Dra. Svartz Gabriela por abrirme las puertas de su laboratorio y otorgarme la posibilidad de llevar adelante este trabajo con absoluta confianza.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Ecotoxicología por el conocimiento compartido, los aprendizajes y colaboración durante todos estos años.

Un agradecimiento especial a la Lic. Teresa Sandoval y al Dr. Fernando Mejjide por su ayuda con histología.

A los miembros de mi Consejo de Seguimiento de Tesis el Dr. Daniel Medesani, el Dr. Rodrigo Da Cuña y el Dr. Matías Pandolfi por haber dedicado su valioso tiempo, y haber sido un gran sostén para mi trabajo, acompañándome siempre con su optimismo, amabilidad e inestimable conocimiento. A mi consejera de estudios, la Dra. Paula Vissio. Por su gentileza y en todo momento.

A mis amigos, Maga, Gonza, Leo, Nico, Vicky y Yao cuya amistad sincera es el motor que me lleva hacia adelante cada vez que no sé por dónde ir.

A Flor, por su amistad incondicional e inquebrantable.

A Santi, por su ayuda, su amor y sostén.

A mi hermana, Jesica, modelo a seguir durante gran parte de mi vida.

A mi madre Rosita, y mi padre Marcelo quienes nunca han dudado de mí, brindándome todo para que pueda ir detrás de mis sueños.

Publicaciones

Artículos Científicos:

Asparch, Y., Svartz, G., & Coll, C. P. (2020). Toxicity characterization and environmental risk assessment of Mancozeb on the South American common toad *Rhinella arenarum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(3), 3034-3042.

Resúmenes presentados en Congresos:

Asparch, Y., Svartz, G., & Coll, C. P. (2021). “Comparative Analysis of the Toxicity of the Fungicide Mancozeb in Early Developmental Stages of a South American Amphibian after 24 Hours-Pulse Exposure”. SETAC Latin America 14th Biennial Meeting. Virtual.

Asparch, Y., Svartz, G., & Coll, C. P. (2021). “Inducción de daño al ADN y neurotoxicidad en larvas de un anfibio autóctono por exposición al Imidacloprid”. XXXVII Congreso Interamericano de Ingeniería Ambiental y Sanitaria AIDIS. Virtual.

Asparch, Y., Svartz, G., & Coll, C. P. (2019). “Evaluación de la toxicidad del imidacloprid en el desarrollo temprano de *Rhinella arenarum*”. COPIME, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 2° Premio, Póster.

Asparch, Y., Svartz, G., & Coll, C. P. (2018). “Efecto de un fungicida de uso comercial sobre el tiempo de desarrollo larval de la especie autóctona *Rhinella arenarum*“. Libro de resúmenes, p.186, ISBN 978-987-778-472-5. SETAC, San Luis, Argentina

Asparch, Y., Svartz, G., & Coll, C. P. (2018). “Genotoxicidad y teratogénesis del mancozeb sobre el desarrollo temprano de un anfibio autóctono “. Libro de resúmenes, p.187, ISBN 978-987-778-472-5. SETAC, San Luis, Argentina.

Asparch, Y., Svartz, G., & Coll, C. P. (2017). “Toxicidad letal y subletal del mancozeb sobre el desarrollo embrio-larval del anfibio *Rhinella arenarum*”. Resúmenes de posters y presentaciones orales, 18-ECO-02, p.23. IV Congreso Iberoamericano de Salud Ambiental para el Desarrollo Sustentable, XX Congreso Argentino de Toxicología, XXXV Jornadas Argentinas Interdisciplinarias de Toxicología, Santa Fe, Argentina.

Glosario y Abreviaturas

AChE: Acetilcolinesterasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANFITOX: Batería de bioensayos de toxicidad estandarizados con embriones y larvas de anfibios

ATP: Adenosín trifosfato

B: Órgano de Bidder

BChE: Butirilcolinesterasa

BSA: Albúmina suero bovino (Bovine Serum Albumin)

CalEPA: California Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de California)

CE: Concentración Efectiva

CEA: Concentración Esperada en el Ambiente

CF: Ciclofosfamida

CFo: Célula folicular

CM: Cavidad medular

CS: Célula somática

CL 10: Concentración que produce el 10% de letalidad

CL 50: Concentración que produce el 50% de letalidad

CL 90: Concentración que produce el 90% de letalidad

CLs: Concentraciones Letales

CLET: Cletodim

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

DE: desvío estándar

DTNB: Ácido 5,5'-ditiobis-2-dinitrobenzoico

E: Estadio del desarrollo según tablas en ANEXO 1.

EER: Evaluación Ecológica de Riesgo.

EROs: Especies reactivas de oxígeno

FAO: Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)

G: Gónada

ha: Hectárea

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

i.a: Ingrediente Activo

ICC: Índice de condición corporal

IC95%: Intervalo de confianza del 95%

IMI: Imidacloprid

IRAM: Instituto Argentino de Normalización y Clasificación

IT: Índice Teratogénico

Kow: Coeficiente de partición octanol-agua

L: efectos letales

LOC: Nivel de preocupación (del inglés: *Level of Concern*)

LOEC: Mínima concentración de exposición a la que se observa efecto (del inglés: *Lowest Observable Effect Concentration*)

M: Médula

MCZ: Mancozeb

MN: Micronúcleo

N: Núcleo

NOEC: Máxima concentración de exposición a la que no se observa efecto (del inglés: *No Observed Effect Concentration*)

NOEC_L: Máxima concentración de exposición a la que no se observa efecto letal

NOEC_{SL}: Máxima concentración de exposición a la que no se observan efectos subletales

OG: Oogonia

OO: Oocito

rpm: Revoluciones por minuto

RD: Riñón derecho

RI: Riñón izquierdo

RQ: Coeficiente de riesgo (del inglés: *Risk Quotient*)

SA: Solución ANFITOX

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SL: efectos subletales

SNC: Sistema Nervioso Central

TOPs: Curvas de isoletalidad (del inglés: *Toxicity Profile curves*). Representación gráfica de la toxicidad en función del tiempo basado en la letalidad registrada por concentración.

USEPA: Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos)

USGS: United States Geological Survey (Servicio Geológico de los Estados Unidos)

WHO: World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)

Índice de Figuras

Figura 1.1 Mapas de superficies del territorio argentino totales sembradas con soja en la campaña (A) 2000-2001 y (B) 2018-2019. La intensidad de color indica la cantidad de hectáreas sembradas. Fuente: <https://geoportal.agroindustria.gob.ar/tematizador/agricola/>

Figura 1.2 Clasificación taxonómica de *Rhinella arenarum* según Hensel (1867)

Figura 1.3 Distribución de *Rhinella arenarum* (Kwet et al. 2004).

Figura 1.4 Imágenes de (A) individuo adulto de *Rhinella arenarum* donde se observa su textura robusta, cabeza ancha y hocico de bordes redondeados y su piel marrón-verdosa de aspecto verrugoso. (B) macho adulto vocalizando, (C) pareja en amplexo y (D) huevos adheridos a la vegetación.

Figura 1.5 Esquema del ciclo de vida de *Rhinella arenarum* y sus principales fases del desarrollo.

Figura 2.1 Imágenes que ilustran la secuencia de pasos del protocolo ANFITOX (A) Hembra adulta de *Rhinella arenarum* expulsando oocitos (B) oocitos no fecundados dispuestos dentro de la ristra gelatinosa (C) oocitos luego de ser fecundados con macerado testicular y (D) huevos fecundados luego de la desgelatinización.

Figura 2.2 Esquema del ensayo de exposición continua (A) exposición de 10 embriones (B) exposición de 10 larvas (C) Disposición espacial de las cajas de Petri durante el experimento.

Figura 2.3 Esquema de la exposición para la evaluación de la actividad de la enzima butirilcolinesterasa (A) exposición de 30 larvas en estadio de opérculo completo (E.25) y (B) disposición espacial de las cajas de Petri durante el experimento.

Figura 2.4 Esquemización del protocolo para la medición de la actividad de la enzima butirilcolinesterasa y determinación de la cantidad de proteínas.

Figura 2.5 Esquema de la exposición para la evaluación de micronúcleos (A) exposición de 5 larvas en estadio de emergencia de miembros posteriores (E.28) y (B) disposición espacial de las cajas de Petri durante el experimento.

Figura 2.6 Esquemización del protocolo para la observación de micronúcleos.

Figura 3.1 Estructura química del mancozeb (MCZ).

Figura 3.2 Esquematación del frasco para el mantenimiento de los individuos metamórficos.

Figura 3.3 Vista de (A) fotografía y (B) esquema de los riñones y gónadas indiferenciadas dentro de la cavidad abdominal de un individuo de *Rhinella arenarum* en E.35, 30 días post-metamorfosis. **B**: órgano de Bidder, **G**: gónada, **RD**: riñón derecho, **RI**: riñón izquierdo.

Figura 3.4 Porcentajes de sobrevivencia (%) de *R. arenarum* expuestos a mancozeb a partir de los estadios de (A) embriones en 2-blastómeros (E.3) y (B) opérculo completo (E.25). Las barras de error indican \pm DE.

Figura 3.5 Perfil de toxicidad de individuos de *R. arenarum* expuestos a mancozeb a partir de los estadios de (A) embriones en 2-blastómeros (E.3) y (B) opérculo completo (E.25). Las barras de error indican IC 95%.

Figura 3.6 Porcentajes de sobrevivencia (%) de *R. arenarum* expuestos a un pulso de mancozeb por 24 h a partir de los estadios de (A) embriones en 2-blastómeros (E.3) (B) surco neural (E.14), (C) respuesta muscular (E.18) y (D) opérculo completo (E.25). Las barras de error indican \pm DE.

Figura 3.7 Perfil de toxicidad de individuos de *R. arenarum* expuestos a mancozeb a partir de los estadios de (A) embriones en 2-blastómeros (E.3) (B) surco neural (E.14), (C) respuesta muscular (E.18) y (D) opérculo completo (E.25). Las barras de error indican \pm DE.

Figura 3.8 Imágenes de embriones expuestos a mancozeb durante 168 h. (A) control; (B) individuo expuesto a 0,1 mg/L con incurvaciones en la cola (IC); (C) individuo expuesto a 0,5 mg/L con IC; (D) individuo expuesto a 1 mg/L con hidropesía (H), cola reducida (CR) e IC; (E) y (F) individuos expuestos a 5 mg/L con H, CR, IC y microcefalia (MC).

Figura 3.9 Longitud boca-cola (mm) de individuos expuestos desde (A) embriones en 2-blastómeros y (B) larvas a mancozeb durante 168 h. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$). Las barras de error indican \pm DE.

Figura 3.10 Imágenes de larvas (A) control y (B) expuesta durante 168 h a 0,5 mg/L de mancozeb exhibiendo hidropesía (H) y consecuente alteración en la pigmentación de la epidermis.

Figura 3.11 Imágenes de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a mancozeb durante diferentes estadios del desarrollo a las 168 h post-exposición. (A, C, E y G) SA: control de solución ANFITOX (B) embrión expuesto a 1 mg/L con incurvaciones en el eje de la cola (IC) y microcefalia (MC), (D) embrión expuesto a 0,5 mg/L mostrando una longitud de cola reducida (CR), (F) embrión expuesto a 0,1 mg/L con múltiples incurvaciones en el eje de la cola (IC) y (H) embrión expuesto a 1 mg/L con hidropesía (H).

Figura 3.12 Tiempo promedio en días (d) en que (A) el 80% de los individuos expuestos alcanzan el estadio de emergencia de miembros posteriores (E.28) (B) el 100% de los individuos de cada tratamiento alcanzan el estadio de emergencia de miembros anteriores (E.31) y (C) el 100% de los individuos de cada tratamiento alcanzan el clímax metamórfico (E.35). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$). Las barras de error indican \pm DE.

Figura 3.13 Índice de condición corporal (ICC) de los individuos al momento del clímax metamórfico calculado como la diferencia entre el peso real medido y el peso ideal teórico estimado a partir de la ecuación de la recta de regresión lineal entre el logaritmo del peso y la longitud boca-cola de los individuos del control SA. (*) Indica diferencias significativas respecto al control SA.

Figura 3.14 Vista del complejo gónada-riñón de (A) un individuo control con 30-35 días post-metamorfosis, (B) su dibujo y (C) el corte histológico del ovario. Vista del complejo gónada-riñón de (D) un individuo expuesto a 0,05 mg/L de mancozeb con 39-42 días post-metamorfosis, (E) su dibujo y (F) el corte histológico del ovario. **B:** órgano de Bidder, **G:** gónada, **RD:** riñón derecho, **RI:** riñón izquierdo, **OG:** oogonia, **OO:** oocito, **CM:** cavidad medular, **M:** médula, **CFo:** célula folicular, **CS:** célula somática.

Figura 3.15 Vista del complejo gónada-riñón de (A) un individuo control con 39-44 días post-metamorfosis, (B) su dibujo y (C) el corte histológico del testículo. Vista del complejo gónada-riñón de (D) un individuo expuesto a 0,05 mg/L de mancozeb con 45-53 días post-metamorfosis, (E) su dibujo y (F) el corte histológico del ovario. **B:** órgano

de Bidder, **G**: gónada, **RD**: riñón derecho, **RI**: riñón izquierdo, **CG**: célula germinal, **CS**: célula somática.

Figura 3.16 Actividad de la enzima BChE en homogenatos de larvas de *R. arenarum* luego de la exposición a diferentes concentraciones de mancozeb durante 96 h. SA: Control negativo solución ANFITOX. Las barras de error indican \pm DE. (*) Indica diferencias significativas respecto al control SA ($p < 0,05$).

Figura 3.17 Frecuencia de MNs en eritrocitos de larvas de *R. arenarum* expuestas a diferentes concentraciones de mancozeb luego de **(A)** 48 h y **(B)** 96 h. SA: Control negativo solución ANFITOX; CF: Control positivo ciclofosfamida 40 mg/L. Las barras de error indican \pm DE. (*) Indica diferencias significativas respecto al control negativo SA ($p < 0,05$).

Figura 3.18 Frotis de sangre de una larva pre-metamorfica expuesta a 0,01 mg/L de mancozeb durante 96 h. (N) indica el núcleo principal y (MN) un micronúcleo.

Figura 3.19: Vista dorsal **(A)** y lateral **(B)** de un individuo control. Vista dorsal **(C)** y lateral **(D)** de individuo post-metamórfico expuesto durante el período larval a 0,5 mg/L de mancozeb. Nótese la persistencia de escoliosis.

Figura 4.1 Estructura química del imidacloprid (IMI).

Figura 4.2 Porcentajes de sobrevivencia (%) de *R. arenarum* expuestos a imidacloprid a partir de los estadios de **(A)** embriones en 2-blastómeros (E.3) y **(B)** opérculo completo (E.25). Las barras de error indican \pm DE.

Figura 4.3 Perfiles de toxicidad de individuos de *R. arenarum* expuestos a imidacloprid **(A)** desde 2-blastómeros (E.3) y **(B)** desde larvas (estadio de opérculo completo, E.25) durante 504 h. Las barras de error indican intervalos de confianza del 95%.

Figura 4.4 Imágenes de individuos de *R. arenarum* expuestos a imidacloprid desde el estadio de blástula temprana (E.3) a las 24, 72 y 168 h. DC: descamación celular; RD: retraso en el desarrollo; H: hidropesía; AC: acefalia; IC: incurvación en el eje de la cola.

Figura 4.5 Imágenes de larvas de *R. arenarum* expuestas a partir del estadio de opérculo completo (E.25) a las 168 h de exposición **(A)** control, **(B)** larva expuesta a 500 mg/L de imidacloprid con hidropesía (H).

Figura 4.6 Actividad de la enzima BChE de larvas de *R. arenarum* expuestas a imidacloprid durante 96 h. SA: Control negativo solución ANFITOX. Las barras de error indican \pm DE. (*) Indica diferencias significativas respecto al control SA ($p < 0,05$).

Figura 4.7 Frecuencia de micronúcleos (MNs) en eritrocitos de larvas de *R. arenarum* expuestas a diferentes concentraciones de imidacloprid durante (A) 48 h y (B) 96 h. SA: Control negativo solución ANFITOX; CF: Control positivo ciclofosfamida 40 mg/L. Las barras de error indican \pm DE. (*) Indica diferencias significativas respecto al control negativo SA ($p < 0,05$).

Figura 5.1 Estructura química del cletodim (CLET).

Figura 5.2 Porcentajes de sobrevivencia (%) de *R. arenarum* expuestos a cletodim a partir de los estadios de (A) embriones en 2-blastómeros (E.3) y (B) opérculo completo (E.25). Las barras de error indican \pm DE.

Figura 5.3 Perfil de toxicidad de individuos de *R. arenarum* expuestos a cletodim a partir de los estadios de (A) embriones en 2-blastómeros (E.3) y (B) opérculo completo (E.25). Las barras de error indican IC 95%.

Figura 5.4 Imágenes de embriones expuestos a cletodim durante: 96 h (A) control; (B) 20 mg/L; 168 h (C) control; (D) 20 mg/L. OC: ondulaciones en la cola; SDC: subdesarrollo de la cola; RD: retardo en el desarrollo.

Figura 5.5 Actividad de la enzima BChE de las larvas de *R. arenarum* expuestas a cletodim durante 96 h. SA: Control negativo solución ANFITOX. Las barras de error indican \pm DE. (*) Indica diferencias significativas respecto al control SA ($p < 0,05$).

Figura 5.6 Frecuencia de micronúcleos (MNs) en eritrocitos de larvas de *R. arenarum* expuestas a diferentes concentraciones de cletodim durante (A) 48 h y (B) 96 h. SA: Control negativo solución ANFITOX; CF: Control positivo ciclofosfamida 40 mg/L. Las barras de error indican \pm DE. (*) Indica diferencias significativas respecto al control negativo SA ($p < 0,05$).

Índice de Tablas

Tabla 3.1: Promedio de los porcentajes de individuos (%) expuestos durante 168 h al mancozeb desde embriones tempranos con presencia de malformaciones y cambios etológicos \pm DE. (*) Indica diferencias significativas respecto al control SA.

Tabla 3.2 Porcentajes de individuos (%) expuestos al mancozeb durante 168 h desde estadio larval opérculo completo (E.25) que muestran deformaciones y alteraciones en el comportamiento \pm DE.

Tabla 3.3 Frecuencia (%) de embriones malformados de *Rhinella arenarum* expuestos a mancozeb por un pulso de 24 h durante diferentes estadios de desarrollo, luego de 168 h. Los datos representan el porcentaje de efectos subletales (media \pm DE), (*) Significativamente diferente del control ($p < 0,05$).

Tabla 3.4 Toxicidad y Cociente de Riesgo (RQ) ecológico del mancozeb para individuos de *R. arenarum* expuestos desde estadio de embriones en 2-blastómeros (E.3) y desde opérculo completo (E.25).

Tabla 3.5 Proporción (%) de hembras y machos post-metamórficos expuestos en el período larvario al mancozeb.

Tabla 4.1 Frecuencia (%) de embriones de *R. arenarum* con efectos subletales (malformaciones y alteraciones etológicas) luego de 24, 72 y 168 h de exposición a imidacloprid. Los datos representan el porcentaje de efectos subletales (media \pm DE). (*) Indica diferencias significativas respecto al control SA ($p < 0,05$).

Tabla 4.2 Toxicidad y Cociente de Riesgo (RQ) ecológico del imidacloprid para individuos de *R. arenarum* expuestos desde estadio de embriones en 2-blastómeros (E.3) y desde opérculo completo (E.25).

Tabla 5.1 Frecuencia (%) de embriones de *R. arenarum* con efectos subletales (malformaciones y alteraciones etológicas) luego de 96 y 168 h de exposición a cletodim. Los datos representan el porcentaje de efectos subletales (media \pm DE). (*) Indica diferencias significativas respecto al control SA ($p < 0,05$).

Tabla 5.2 Toxicidad y Cociente de Riesgo (RQ) ecológico del cletodim para individuos de *R. arenarum* expuestos desde estadio de embriones en 2-blatómeros (E.3) y desde opérculo completo (E.25).

Tabla 6.1 Valores de CL50 para individuos expuestos desde 2-blastómeros (E.3) y desde opérculo completo (E.25) a mancozeb, imidacloprid y cletodim luego de 48 y 504 h de exposición

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	3
Agradecimientos.....	5
Publicaciones	6
Glosario y Abreviaturas.....	7
Índice de Figuras	10
Índice de Tablas.....	15
Índice	17
Capítulo 1 Introducción General.....	20
1.1 Desarrollo agrícola en Argentina y el mundo	20
1.2 Plaguicidas: clasificación, mecanismos de acción e impacto ambiental	23
1.3 Ecotoxicología: breves fundamentos	25
1.4 Los anfibios como especies amenazadas	27
1.5 Modelo experimental: <i>Rhinella arenarum</i>	31
1.5.1 Desarrollo embrionario, larval y gonadal de <i>Rhinella arenarum</i>	34
1.6 Bioensayos estandarizados para el estudio de la toxicidad.....	37
1.6.1 Test de toxicidad ANFITOX	39
1.6.2 Biomarcadores de Toxicidad	39
1.7 Caracterización del riesgo	42
1.8 Objetivos e hipótesis generales.....	44
Capítulo 2 Materiales y Métodos Generales	46
2.1 Obtención y mantenimiento de animales experimentales en laboratorio	46
2.2 Criterio de aceptación de los embriones	49
2.3 Bioensayos estandarizados ANFITOX: Protocolos experimentales	49
2.3.1 Exposición continua	49
2.3.2 Evaluación del riesgo ambiental: Caracterización de Riesgo	51
2.3.3 Biomarcador enzimático butirilcolinesterasa	51
2.3.4 Biomarcador de genotoxicidad	54
2.4 Análisis estadístico general	55
Capítulo 3 Evaluación de la toxicidad de un formulado comercial de mancozeb sobre el desarrollo embriolarval de <i>Rhinella arenarum</i>.....	58
3.1 Introducción	58
3.2 Objetivos e hipótesis	62
3.2.1 Objetivos generales	62
3.2.2 Objetivos específicos	62

3.2.3 Hipótesis.....	63
3.3 Materiales y Métodos.....	64
3.3.1 Preparación de las soluciones de exposición.....	64
3.3.2 Bioensayos de toxicidad	64
3.4 Resultados	68
3.4.1 Efectos letales.....	68
3.4.2 Alteraciones morfológicas y etológicas	74
3.4.3 Evaluación del riesgo ecológico	82
3.4.4 Efectos sobre el tiempo de desarrollo	82
3.4.5 Efectos sobre el desarrollo gonadal.....	84
3.4.6 Actividad de la enzima Butirilcolinesterasa.....	87
3.4.7 Ensayo de micronúcleos	88
3.5 Discusión	90
3.6 Conclusiones.....	96
Capítulo 4 Evaluación de la toxicidad de un formulado comercial de imidacloprid sobre el desarrollo embrionario de <i>Rhinella arenarum</i>.....	48
4.1 Introducción	97
4.2 Objetivos e hipótesis	101
4.2.1 Objetivos generales	101
4.2.2 Objetivos específicos	102
4.2.3 Hipótesis.....	102
4.3 Materiales y Métodos.....	103
4.3.1 Preparación de las soluciones de exposición.....	103
4.3.2 Bioensayos de toxicidad	103
4.4 Resultados	104
4.4.1 Efectos letales.....	104
4.4.2 Alteraciones morfológicas y etológicas	107
4.4.3 Evaluación del riesgo ecológico	111
4.4.4 Actividad de Butirilcolinesterasa	112
4.4.5 Ensayo de micronúcleos	113
4.5 Discusión	114
4.6 Conclusiones.....	118
Capítulo 5 Evaluación de la toxicidad de un formulado comercial de cletodim sobre el desarrollo embrionario de <i>Rhinella arenarum</i>.....	120
5.1 Introducción	120
5.2 Objetivos e Hipótesis	123
5.2.1 Objetivos generales	123
5.2.2 Objetivos específicos	123

5.2.3 Hipótesis.....	124
5.3 Materiales y métodos	124
5.3.1 Preparación de las soluciones de exposición.....	124
5.3.2 Bioensayos de toxicidad	125
5.4 Resultados	126
5.4.1 Efectos letales.....	126
5.4.2 Alteraciones morfológicas y etológicas	129
5.4.3 Evaluación del riesgo ecológico	132
5.4.4. Actividad de la Butirilcolinesterasa	132
5.4.5 Ensayo de micronúcleos	133
5.5 Discusión	134
5.6 Conclusiones.....	137
Capítulo 6 Discusión General.....	138
Capítulo 7 Conclusiones Generales	144
Anexo.....	139
Bibliografía	153

Capítulo 1

Introducción General

1.1 Desarrollo agrícola en Argentina y el mundo

Desde comienzos del siglo XIX, se consolidó mundialmente un modelo de crecimiento socioeconómico antropocéntrico y productivista fuertemente sustentado en el positivismo y desentendido de los problemas ecológicos y ambientales, considerados como un escollo en el desarrollo humano (Viglizzo & Jobbágy, 2010).

Es indiscutible que el uso de plaguicidas en la producción agrícola produjo muchos beneficios, principalmente, el aumento de la productividad y calidad de los cultivos, el control de plagas, las mejoras en la salud pública y un mayor rédito económico (Butinof et al. 2014). La llamada “era de los plaguicidas sintéticos” comenzó en el año 1940 con la introducción en el mercado de los herbicidas hormonales y los insecticidas organofosforados y organoclorados, cuya efectividad contra la mayoría de plagas de artrópodos y malezas provocó un aumento indiscriminado de su uso (Edwards, 1993). Así, a pesar de los sucesivos avances tecnológicos en materia agrícola, el aumento del rinde de la producción se debió fundamentalmente al uso de fertilizantes y plaguicidas tanto en países desarrollados como en desarrollo (Schaaf, 2013).

La publicación del libro “Primavera Silenciosa” en el año 1960 por la estadounidense Rachel Carson puso en tela de juicio la liberación al ambiente de sustancias químicas cuyas consecuencias ambientales, ecológicas y para la salud humana, no eran totalmente conocidas (Rivera, 2012). Esto desató numerosas medidas de protección ambiental en Estados Unidos que luego se hicieron eco en el mundo (McIntosh et al. 2007). Dentro de las medidas más importantes, se destaca la fundación en 1970 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Wisman, 1985). En respuesta a la visibilización de las consecuencias ambientales del uso plaguicidas, las agencias internacionales desarrollaron sistemas complejos de requerimientos, registros y monitoreos que una sustancia debe cumplir para poder ser introducida en el mercado de plaguicidas (Edwards, 1993). Sin embargo, muchos plaguicidas son empleados sin los requerimientos y registros adecuados y mucho menos, con el cuidado y precaución que por su naturaleza merecen (Edwards, 1993).

América Latina es una de las fuentes primarias de producción y exportación de alimentos a escala mundial (FAO, 2021). Entre las décadas 1960 y 1970 la región sufrió una serie de golpes de Estado y procesos de militarización que conllevaron a una profunda

transformación de las políticas públicas (Victoriano Serrano, 2010). Así, se produjo una desregulación de la función del Estado, desinversión pública, precarización laboral y privatización de empresas estatales y de los recursos naturales (Schmidt, 2015). Dentro de esta región, Argentina es uno de los países más importantes en materia de producción agrícola, exportación de cereales y aceites, siendo esta actividad un importante pilar de su economía (Butinof et al. 2014). En este país, para la década del 90, se consolidó el modelo neoliberal caracterizado por el ajuste fiscal, liberación de los mercados, e ingreso de capitales extranjeros. El gobierno, llevó adelante una intensa reestructuración socioeconómica y administrativa que impactó sobre el sector agropecuario mediante la disolución de los principales organismos de control de dicha actividad (Pérez Ponsa, 2011). En el año 1996 se produjo un hito en las políticas agropecuarias con la aprobación del cultivo y comercialización de semillas de soja resistente a glifosato (Schmidt, 2015). Así, se consolidó un nuevo modelo agropecuario argentino que modificó la escala de producción, incorporó nueva maquinaria e insumos, implementó la siembra directa y la masificación del uso de agroquímicos (Pérez Ponsa, 2011).

Hacia fines del siglo XX y XXI, la creciente demanda de los productos argentinos junto con la expansión de la frontera agrícola alentada principalmente por el crecimiento de las áreas destinadas al cultivo de soja, provocó profundos cambios socioeconómicos, demográficos y ambientales (Zarrilli, 2020). De esta forma, se consolidó la “agriculturización”, entendida como un aumento del uso de los suelos para la agricultura por sobre la ganadería y un corrimiento de los límites de los territorios destinados a la producción (Schmidt, 20015). El alcance de tal ampliación de tierras destinadas a cultivo es claro al observar la estimación aproximada de la superficie sembrada en Argentina entre los años 2000 y 2001. Dicha estimación abarcaba un total de 27 millones de hectáreas mientras que entre los años 2019 y 2020 aumentó hasta alcanzar aproximadamente 40 millones (Dirección Nacional de Agricultura, 2021). En cuanto a las regiones abarcadas por la expansión se encuentran la región extra-pampeana (Zarrilli, 2020) y la región del noroeste argentino que ha tomado relevancia debido a la deforestación de bosques nativos y a la oposición de los pueblos originarios (Schmidt, 2015). Sin embargo, la región pampeana sigue siendo el principal centro productivo del país (Zarrilli, 2020). En términos gráficos, podemos observar la expansión agrícola comparando la distribución y densidad de superficie sembrada con soja entre los años 2000- 2001 (11,6 millones de hectáreas) y 2018-2019 (17 millones de hectáreas en total)

(Figura 1.1 A y B). En cuanto a la producción agrícola, entre los años 1962 y 2013, se ha mantenido siempre en alza con una tasa de crecimiento anual acumulada del 3% (Zarrilli, 2020).

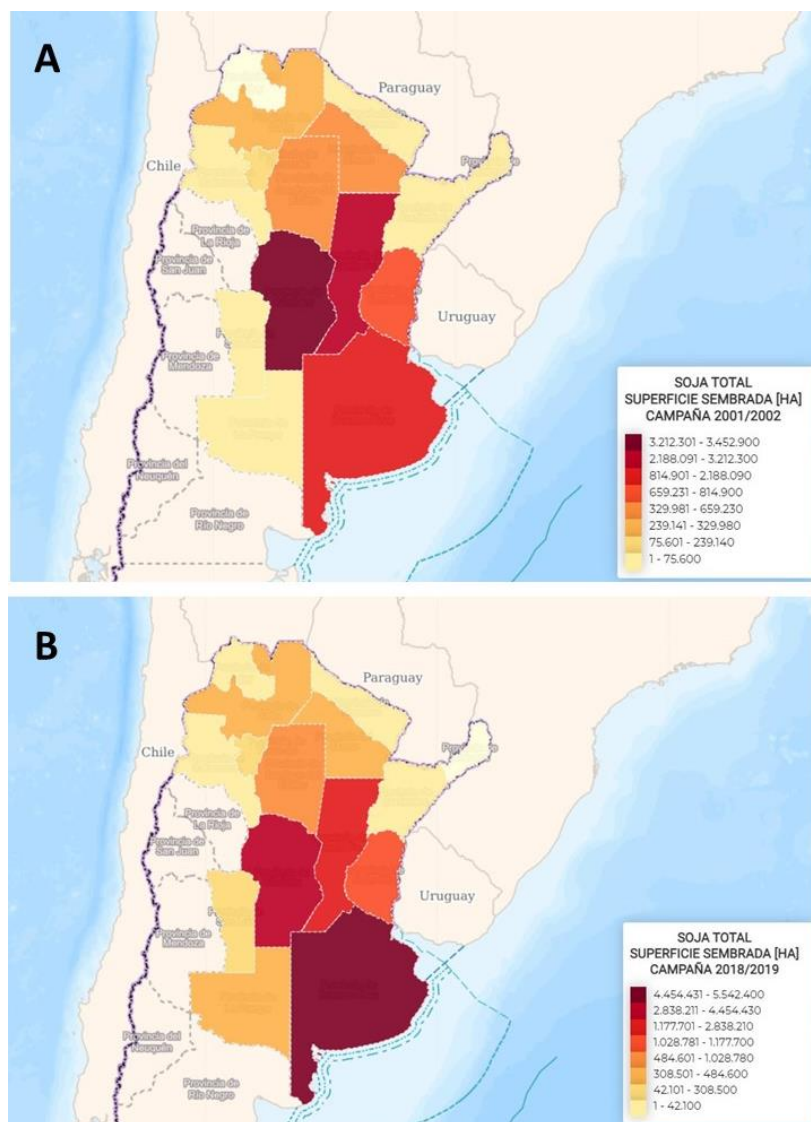


Figura 1.1 Mapas de superficies del territorio argentino totales sembradas con soja en la campaña (A) 2000-2001 y (B) 2018-2019. La intensidad de color indica la cantidad de hectáreas sembradas. Fuente: <https://geoportal.agroindustria.gob.ar/tematizador/agricola/>

El aumento de los rindes de cultivos fue acompañado por un aumento constante del uso de agroquímicos (Butinof et al. 2014) no sólo en nuestro país, sino a nivel global. El consumo mundial de plaguicidas entre los años 2000 y 2001 alcanzó un valor aproximado de 2,27 millones de toneladas (Kiely et al. 2004), mientras que los reportes más recientes publicados, estiman el uso de 2,63 millones de toneladas entre los años

2008 y 2012 en todo el mundo (USEPA, 2017) lo que indica un aumento de aproximadamente un 16% en una década. Si observamos las tendencias en ese mismo período de tiempo en Argentina, también sigue un patrón de aumento. En el año 2008 el total de agroquímicos importados fue de 237.130 toneladas (SENASA, 2008) por un valor de 1.777 millones de dólares (CASAFA, 2009). En el año 2012 la cantidad importada fue de 255.314 toneladas (SENASA, 2012) por un valor de 2.381 millones de dólares (CASAFA, 2012). Comparando estos dos períodos el incremento del volumen fue de 7,66%. Datos más recientes indican que en el año 2019, se importaron 317.844 toneladas de productos fitosanitarios (SENASA, 2020).

La agricultura es, sin dudas, una de las principales actividades humanas y estas, en su conjunto, están llevando a la Tierra a un estado de desequilibrio ambiental con terribles consecuencias en gran parte del mundo (Rockström et al. 2009). La producción de alimentos contribuye fuertemente a la emisión de gases de efecto invernadero, la contaminación acuática por su uso para riego de plantaciones tratadas con agroquímicos, la pérdida de biodiversidad por el requerimiento de tierras y a las alteraciones en el balance de nutrientes en océanos y aguas superficiales (Andrade, 2016).

1.2 Plaguicidas: clasificación, mecanismos de acción e impacto ambiental

Por definición, los plaguicidas son sustancias o mezclas de sustancias que actúan sobre una o más especies consideradas plaga que afectan la producción de alimentos, que son vectores de enfermedades o bien, destruyen algún bien que se considera preciado (Eldridge, 2008; Yadav & Devi, 2017).

Existen distintas formas de clasificar a los plaguicidas. Las más utilizadas son de acuerdo a su uso (agricultura, industrial o doméstico) (Falconer, 1998; Rani et al. 2021) o de acuerdo a su estructura química: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, neonicotinoides, fenilamidas, triazinas, benzólicos, entre muchos otros (Jayaraj et al. 2016). Por último, según el organismo *blanco* de su toxicidad (herbicidas, fungicidas, insecticidas y rodenticidas) (Yadav & Devi, 2017). Los plaguicidas más utilizados son los insecticidas, herbicidas y fungicidas.

Los herbicidas son empleados para eliminar químicamente malezas en remplazo del método mecánico. Estas sustancias, intervienen en distintos procesos fisiológicos de las plantas por ejemplo inhibiendo la síntesis de carotenos, proteínas y lípidos, o interviniendo a nivel de fotosíntesis y regulación hormonal (Casida & Durkin, 2017).

Los fungicidas, funcionan previniendo enfermedades causadas por hongos afectando su metabolismo. Por ejemplo, algunos fungicidas alteran la producción de esteroides, otros influyen en la respiración celular e incluso, pueden actuar afectando a los microtúbulos (Casida & Durkin, 2017).

Por último, los mecanismos de toxicidad de los insecticidas más relevantes en la actualidad (organofosforados, carbamatos, piretroides y neonicotinoides) intervienen principalmente a nivel de sistema nervioso afectando fundamentalmente tres vías: la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, los receptores nicotínicos de acetilcolina, o bien a los canales de sodio dependientes de voltaje presentes en las membranas de las neuronas (Nauen, 2006).

Idealmente, estas sustancias deberían ser letales sólo para las especies *blanco*. Sin embargo, esto no sucede así por lo cual existe gran controversia sobre su uso ya que pueden afectar la salud de otras especies entre las que se encuentra el hombre (Aktar, 2009).

Los plaguicidas llegan al ambiente principalmente por su aplicación directa y como se mencionó anteriormente, mediante efluentes de uso industrial y doméstico (Zacharia, 2011). Una vez que son introducidos, pueden causar numerosos efectos adversos a corto y largo plazo en el funcionamiento de los ecosistemas (Zacharia, 2011) y en la salud humana (Lichtenberg, 2002). De la cantidad total de plaguicidas aplicados, sólo el 0,3% cumple su función sobre la especie que se intenta controlar (Pimentel, 1995). El resto se distribuye y permanece en los distintos compartimentos del ambiente (aire, suelo y agua) pudiendo incluso transportarse a largas distancias (Zacharia, 2011). En el caso del aire, se han encontrado presencia de plaguicidas volátiles y no volátiles en la atmósfera (Nash, 1983). El transporte atmosférico y la deposición son los procesos más importantes en la distribución de plaguicidas en la Tierra (Atlas & Schauffler, 1990). En el suelo, estas sustancias pueden degradarse, volatilizarse, adsorberse o ser incorporadas por las plantas dando inicio a una cadena de bioacumulación (van der Werf, 1996). La contaminación de los suelos también puede afectar a los microorganismos que allí habitan provocando alteraciones en la microbiota e interferencias en los ciclos de nutrientes en los ecosistemas (Zacharia, 2011) lo que indiscutiblemente genera una pérdida de la fertilidad de ese suelo (Yadav & Devi, 2017). En el medio acuático, muchas veces los plaguicidas son aplicados sin cuidado directamente sobre los cuerpos de agua, pero también pueden verse arrastrados hacia ellos por escorrentía, lixiviación y erosión del suelo (Pimentel, 2014).

La contaminación de los sistemas acuáticos no sólo provoca un deterioro de la salud de dichos ambientes sino también de la calidad del agua potable a la que accede la población, y también afectando sus usos recreativos (Lichtenberg, 2002). Se estima que cada año entre 5.000 y 20.000 personas mueren, y alrededor de 500.000 a 1 millón se intoxican con plaguicidas (FAO, 1999; Yadav et al. 2015). La capacidad de una sustancia de este tipo de causar contaminación depende de varios factores, como su solubilidad, la distancia del cuerpo de agua de la zona de aplicación, el método utilizado para aplicar el plaguicida, la temperatura y el clima (Zacharia, 2011).

Estas sustancias químicas pueden ingresar a los organismos a través de la inhalación, la ingestión o por contacto con los ojos y la piel (Yadav & Devi, 2017) provocándoles efectos tóxicos que pueden llevar incluso a la muerte. Debido a que, en los ecosistemas los organismos viven en una compleja trama de relaciones tróficas, la pérdida de una especie ya sea por contaminación química u otros motivos puede llevar a un desbalance de las dinámicas de la comunidad afectando indirectamente a todo el conjunto (Zacharia, 2011).

En este sentido, el uso no controlado de plaguicidas puede tener efectos drásticos sobre las especies *no blanco*, afectando severamente a la biodiversidad de plantas y animales (Mahmood et al. 2016).

1.3 Ecotoxicología: breves fundamentos

El término ecotoxicología fue definido inicialmente por René Truhart como la ciencia que describe los efectos tóxicos de los agentes sobre los organismos vivos, especialmente en comunidades y poblaciones pertenecientes a un ecosistema (Conell et al. 2009). Esta disciplina, como su nombre lo indica, combina esencialmente dos áreas, la ecología y la toxicología. La ecología, aporta las bases para la interpretación de las interacciones entre especies en los ecosistemas y los impactos que los agentes tóxicos pueden tener en su función y estructura mientras que, la toxicología, de la mano de la biología molecular y la farmacocinética, describe las interacciones de los organismos con los tóxicos a un nivel molecular (Landis & Yu, 2003). Sin embargo, los enfoques modernos sobre la ecotoxicología la proponen como una ciencia multidisciplinaria que combina los esfuerzos de muchas otras disciplinas científicas como la química analítica, la biología evolutiva, genética, limnología y microbiología, entre otras (Newman, 1998; Landis & Yu, 2003).

Para enfatizar el aspecto ecológico de la disciplina, se propone la utilización de modelos que sean representativos de las comunidades y ecosistemas cuyo estado desea ser evaluado. Determinar el impacto de los contaminantes en las especies más sensibles resulta en la protección de toda la comunidad (Amiard-Triquet et al. 2012).

Los ecosistemas, se encuentran en permanente cambio, incluso sin inferencia de la actividad humana. Así, conocer los procesos naturales que allí ocurren, es la base necesaria para poder distinguir entre perturbaciones naturales y antropogénicas (Kelly et al. 1989). Los ecosistemas acuáticos son el destino de la mayoría de los contaminantes de origen antropogénico pudiendo permanecer allí en los sedimentos depositados, en suspensión o bien, solubles (Post et al. 2012). Es allí donde la rama de la ecotoxicología acuática toma especial importancia. A nivel de los ecosistemas acuáticos, la susceptibilidad de los seres vivos a los contaminantes, depende de las condiciones ambientales (bióticas y abióticas), propias del hábitat, que condicionarán la biodisponibilidad de los tóxicos presentes (Boudou & Ribeyre, 1997).

Existen distintas metodologías dentro de la ecotoxicología acuática que, mediante diversos abordajes, intentan comprender el impacto de los contaminantes en el ambiente (Boudou & Ribeyre, 1997). El primer método, y el más representativo, es el estudio *in situ* en el lugar de interés. Éste método brinda un gran volumen de información ya que permite abarcar distintos compartimentos del ecosistema. Sin embargo, esto mismo representa un nivel de complejidad muy grande que lleva inevitablemente al reduccionismo, en términos de interpretación del fenómeno (limitación del muestreo, campañas, inclusión de especies etc.) (Boudou & Ribeyre, 1997). Un segundo abordaje son los estudios en laboratorio utilizando una única especie como modelo. Éste método permite evaluar un gran número de parámetros morfológicos, etológicos y bioquímicos, favoreciendo un mejor entendimiento de los mecanismos de acción de los tóxicos (Lu, 1985). A la vez, permite la estandarización del ensayo en la especie modelo elegida, posibilitando la evaluación de la toxicidad de sustancias químicas puras o de efluentes bajo condiciones controladas y de alta replicabilidad (Boudou & Ribeyre, 1997). Sin embargo, la utilización de esta técnica lleva a que la extrapolación de los resultados a los ecosistemas resulte limitada ya que subestima su estructura al no contemplar la diversidad de especies, su sensibilidad específica y las interacciones complejas que existen entre ellas a través de las redes tróficas (Schmitt-Jansen et al. 2008).

Es claro que ambas metodologías presentan a la vez desafíos y limitaciones. Sin embargo, cada una de ellas aporta conocimientos que permiten el entendimiento de los posibles perjuicios de la introducción de algunas sustancias químicas en el ambiente. Los ensayos de laboratorio, constituyen un primer paso necesario para entender los efectos y mecanismos de acción posibles en condiciones controladas mientras que, los ensayos *in situ*, permiten evaluar un escenario más complejo y realista. Es por ello que de cara al progreso en la disciplina ecotoxicológica es necesario diseñar estrategias conjuntas de evaluación que integren distintos niveles de análisis incluyendo ensayos *in situ* y en laboratorio, así como también indicadores de alerta temprana (e.g biomarcadores de toxicidad), información sobre el ciclo de vida y la posición en la red trófica de las especies contempladas en el estudio, etc. (Schmitt-Jansen et al. 2008). De esta manera, podría mejorarse el realismo de las evaluaciones de los contaminantes químicos en los sistemas acuáticos brindando un aporte de mayor significancia a la hora de diseñar estrategias de conservación ya sea políticas y legislativas (Schmitt-Jansen et al. 2008).

1.4 Los anfibios como especies amenazadas

En todo el mundo, la pérdida de biodiversidad es notoria. Si bien los eventos de extinción de especies, son procesos naturales que han ocurrido una y otra vez a lo largo de la historia de la Tierra, la tasa de extinción de especies durante la era en la que vivimos ha alcanzado ritmos alarmantes y, sin duda, el impacto de las actividades del hombre son la causa principal (Hassan et al. 2005). La antropización de los ecosistemas naturales en pos de aumentar la producción de alimentos para satisfacer las demandas de la creciente población humana nos ha llevado a las mayores tasas de extinción jamás vistas (Hoffman et al. 2010). La lista roja de especies amenazadas según IUCN estima que alrededor del mundo, un total de 38.500 especies están en peligro de extinción de las cuales. De la cantidad de anfibios conocidos en el mundo, un 41% se encuentra en riesgo (IUCN, 2021). Según los investigadores, las principales causas de la declinación de sus poblaciones se relacionan con la destrucción, alteración y fragmentación de sus hábitats naturales, la introducción de especies exóticas, la sobre-explotación de los suelos, la radiación UV, el cambio climático, infecciones y la contaminación química (Collins & Storfer, 2003). Sin embargo, la continua desaparición de las especies de anfibios no es producto de una única sino del producto de la interacción de múltiples causas lo cual dificulta la predicción de los efectos (Halliday, 2005). En este sentido, y teniendo en

cuenta la masividad del uso de agroquímicos, en los últimos 20 años muchas investigaciones se volcaron a entender su contribución a la declinación sus poblaciones por sí mismos o en combinación con otros factores (Relyea & Mills, 2001). Un estudio que relacionó áreas de alta densidad de población humana con zonas de gran pérdida de biodiversidad encontró una fuerte correlación entre ambas variables, particularmente en las zonas asociadas a la urbanización y agricultura (Gallant et al. 2007). Más aún, existen trabajos que apoyan con evidencia la disminución de la densidad poblacional de la especie *Rana muscosa* asociada a la presencia de xenobióticos en el ambiente (Fellers et al. 2004).

La magnitud del desconocimiento sobre la biodiversidad de anfibios en el mundo se refleja hoy en día en la alta tasa de descubrimiento de especies (Halliday, 2005). Más aún, de las 7.212 especies relevadas por la IUCN, sobre 1.184 no se conoce información suficiente para conocer su estado de conservación y vulnerabilidad (IUCN, 2021). Un estudio realizado para predecir la situación en la que se encuentran arrojó el alarmante resultado de que el 63% de estas especies se encontraría en peligro de extinción (Howard et al. 2014).

Los anfibios son más sensibles a la contaminación química que otros vertebrados como mamíferos y aves, principalmente por dos motivos (Brhül et al. 2011). En primer lugar, la mayoría tiene ciclos de vida muy complejos (Halliday, 2008). Los adultos depositan huevos en el medio acuático, cuya única protección es una membrana delgada rodeada de gelatina, donde los individuos se desarrollan hasta alcanzar una fase juvenil-adulta terrestre (Halliday, 2008). De esta forma, los anfibios a lo largo de su vida se encuentran expuestos a los contaminantes presentes tanto en el agua como en la tierra (Mann et al. 2003). En segundo lugar, la piel de los anfibios es extremadamente delgada y vascularizada la cual les permite realizar intercambio gaseoso, pero también facilita la pérdida de agua y el ingreso de xenobióticos desde el ambiente (Shoemaker et al. 1992).

Debido a la gran extensión de la frontera agrícola en Argentina, los anfibios que habitan en los agroecosistemas se encuentran en permanente contacto con los plaguicidas. En cuerpos de agua de la región pampeana se detectaron niveles del herbicida glifosato (Peruzzo et al. 2008) e insecticidas como clorpirifos, cipermetrina y endosulfan (Jergentz et al. 2005). Como se mencionó anteriormente, los plaguicidas pueden llegar a los medios acuáticos por aplicación directa o de manera indirecta por escorrentía, lixiviación y erosión del suelo (Pimentel, 2014) afectando a los estadios tempranos del desarrollo de los anfibios. Por otro lado, los estadios terrestres viven en estrecha asociación con los

cultivos alimentándose de plagas lo que los expone al rociado directo de plaguicidas (Attademo et al. 2005). Esta doble vía de exposición los hace excelentes modelos para el estudio de los efectos de los agroquímicos (Lajmanovich et al. 2012).

Particularmente en Argentina, no existen políticas de conservación articuladas entre quienes se ven implicados en el estudio y la conservación de las especies de anfibios (Vaira et al. 2018). En este sentido, es fundamental el aporte del trabajo de las y los investigadores para identificar, conocer y caracterizar la biodiversidad de especies autóctonas, así como también reportar cómo se ve afectada su salud, distribución, hábitos y conductas ante la pérdida de sus hábitats naturales, el cambio del uso de los suelos, la agriculturización y la contaminación química. En este sentido, en los últimos años se han volcado grandes esfuerzos por parte la comunidad científica a incrementar el conocimiento sobre la biodiversidad de anfibios en nuestro territorio (Lavilla et al. 2000). Estas contribuciones permiten tener una idea más acertada sobre el estado de conservación para mejorar y direccionar eficientemente los esfuerzos en aquellas regiones dónde se encuentren poblaciones que requieran acciones urgentes (Vaira et al. 2012). Los últimos reportes, indican que en el territorio argentino habitan 13 familias compuestas por 175 taxones. De éstos, 51 se encuentran en distinto grado de riesgo de conservación, 103 no se encuentran en peligro y 21 se consideran insuficientemente conocidos como para determinar su estado (Vaira et al. 2012). A modo de ejemplo, entre las especies en peligro se encuentran la ranita patagónica *Atelognathus patagonicus*, la rana marsupial *Gastrotheca christiani* y la ranita pehuenche *Alsodes pehuenche*. En cambio, entre ejemplos de especies amenazadas se identifican al sapo de achala *Rhinella achalensis*, varios representantes del género *Telmatobius* y la llamada ranita de Darwin *Rhinoderma darwinii*. El grupo de especies vulnerables cuenta con un número mayor de especies con varios representantes del género *Atelognathus*, *Telmatobius* y *Rhinella* (Vaira et al. 2012).

Si bien se han realizado grandes avances en el estudio de la biodiversidad de anfibios, aún se requiere profundizar sobre las distribuciones y los requerimientos ecosistémicos para su subsistencia para determinar políticas de conservación eficientes (Vaira et al. 2018).

Como se mencionó anteriormente, la región Pampeana es la zona del país que ha sufrido la mayor expansión de la frontera agrícola y se constituye hoy día como el gran centro productivo argentino (Zarrilli, 2020). Es por esta razón que ha sufrido una transformación masiva de sus pastizales nativos por tierras destinadas principalmente a la

agricultura y a la ganadería (Baldi & Paruelo, 2008). El cambio de uso de la tierra modifica los paisajes naturales reduciendo la cobertura de vegetación autóctona (Sabattini et al. 2010) promoviendo la pérdida de los hábitats naturales y la fragmentación de la tierra que impacta de manera negativa sobre la diversidad de las especies de anfibios (Cushman, 2006). En esta región, se han identificado hasta 34 especies, pertenecientes a 6 familias (Frost, 2020). Aquí, los anfibios se encuentran principalmente en estanques y cuerpos de agua que se forman temporalmente tras las inundaciones y que se encuentran íntimamente relacionados con las tierras destinadas a la agricultura (Ceí, 1980) en contacto directo con los agroquímicos y fertilizantes que se utilizan para aumentar el rinde de los cultivos.

Se han realizado numerosos estudios que evalúan cómo afecta a la biodiversidad y distribución de anfibios la modificación de sus hábitats naturales para cultivo y la introducción de agroquímicos. En este sentido, las áreas más relevadas de la región Pampeana, son las provincias de Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos. En sitios agrícolas, se ha encontrado gran presencia de adultos con graves malformaciones anatómicas como ectromelia en una incidencia mayor que en áreas de vegetación boscosa (Peltzer et al. 2011; Chilote et al. 2018). De igual manera, otros investigadores también han reportado cómo el uso del suelo, la cobertura vegetal y la presencia de fertilizantes y agroquímicos en el agua influyen en la riqueza de las poblaciones de anfibios presentes en zonas y cuerpos de agua dónde se reproducen. Se ha encontrado que, en algunas regiones, la diversidad de especies presentes aumenta positivamente conforme incrementa la amplitud de las zonas boscosas y decrece ante el incremento del porcentaje de tierras cercanas destinadas al cultivo, el exceso de nutrientes, y agroquímicos como el glifosato y el 2,4-D (Agostini et al. 2021). Un punto muy interesante de este trabajo es que aporta evidencia de que la presencia de cobertura vegetal en los estanques influye positivamente en mantener la abundancia de anfibios, ya que ofrece un lugar resguardado para la reproducción, refugio para los embriones y larvas en desarrollo (Hoff et al. 1999) y contribuye a la reducción de la toxicidad de los agroquímicos (Brogan & Relyea, 2014). Más aún, ensayos realizados en laboratorio evaluando la calidad de agua de muestras de arroyos de las zonas agropecuarias de Arrecifes, Pergamino y Salto mostraron que pueden provocar letalidad y malformaciones en las etapas tempranas del desarrollo de la especie autóctona *Rhinella arenarum* (Peluso et al. 2019).

Toda esta evidencia en conjunto demuestra innegablemente la sensibilidad de los anfibios ante la contaminación química y modificación de los paisajes naturales. Es por ello, que se constituyen como buenos indicadores y modelos experimentales. Existen otras particularidades mencionadas anteriormente propias de los anfibios que les confieren importantes cualidades como indicadores biológicos. Estas son, en primer lugar, su ciclo bifásico de vida con períodos dependientes de ambientes acuáticos y períodos dependientes de ambientes terrestres (Mann et al. 2003). En segundo lugar, su piel altamente permeable y vascularizada que permite el intercambio de gases, agua y electrolitos con el ambiente (Quaranta, et al. 2009) lo que los hace especialmente vulnerables a la radiación ultravioleta, patógenos y xenobióticos (Brühl et al. 2011). En tercer lugar, su susceptibilidad diferencial dependiente del estadio de desarrollo. Particularmente, los estadios tempranos suelen ser más susceptibles a la contaminación química que los adultos debido a que algunos procesos homeostáticos y órganos involucrados en la detoxificación como el hígado y los riñones pueden no estar completamente desarrollados (Ozoh, 1979; Bentivegna & Piatkowski, 1998; Mohammed, 2013). Por otro lado, los organismos en desarrollo pueden tener menor cantidad de grasa corporal acumulada por lo cual, tienen menor capacidad de almacenar sustancias lipofílicas. Además, el tiempo en que las sustancias demoran en hacer blanco en los estadios tempranos es menor debido a que son mucho más pequeños y su relación superficie-volumen en contacto con el medio contaminado es mayor (Mohammed, 2013).

En este sentido, conocer cómo afectan los plaguicidas más utilizados en Argentina a la salud de nuestros anfibios autóctonos durante su desarrollo es de vital importancia para la elaboración de propuestas e impulsar medidas adecuadas para su conservación y protección.

1.5 Modelo experimental: *Rhinella arenarum*

Rhinella arenarum

Phyllum: Chordata

Clase: Amphibia

Subclase: Lissamphibia

Orden: Anura

Familia: Bufonidae

Género: *Rhinella*

Especie: *Rhinella arenarum*

Figura 1.2 Clasificación taxonómica de *Rhinella arenarum* según Hensel (1867)

La especie *Rhinella arenarum* (Figura 1.2), también llamada sapo común americano, sapo argentino o sapo grande, es una especie de anuro de la familia de los bufónidos. En un comienzo fue denominada *Bufo arenarum* por el zoólogo Hensel (1867) quien la describió originalmente y desde el momento, ha atravesado varias clasificaciones taxonómicas hasta llegar a su nombre actual. Se distribuye ampliamente por el territorio Sudamericano principalmente por los países de Argentina, Bolivia, Uruguay y Brasil (Figura 1.3) (Kwet et al. 2004). Habita un amplio rango de hábitats desde ambientes costeros, bosques tropicales y subtropicales, así como también áreas rurales y urbanas (Bionda et al. 2015). Debido a todos estos factores y su presunta abundante población, la especie se encuentra incluida en la categoría de menor preocupación de la IUCN (Kwet et al. 2004).

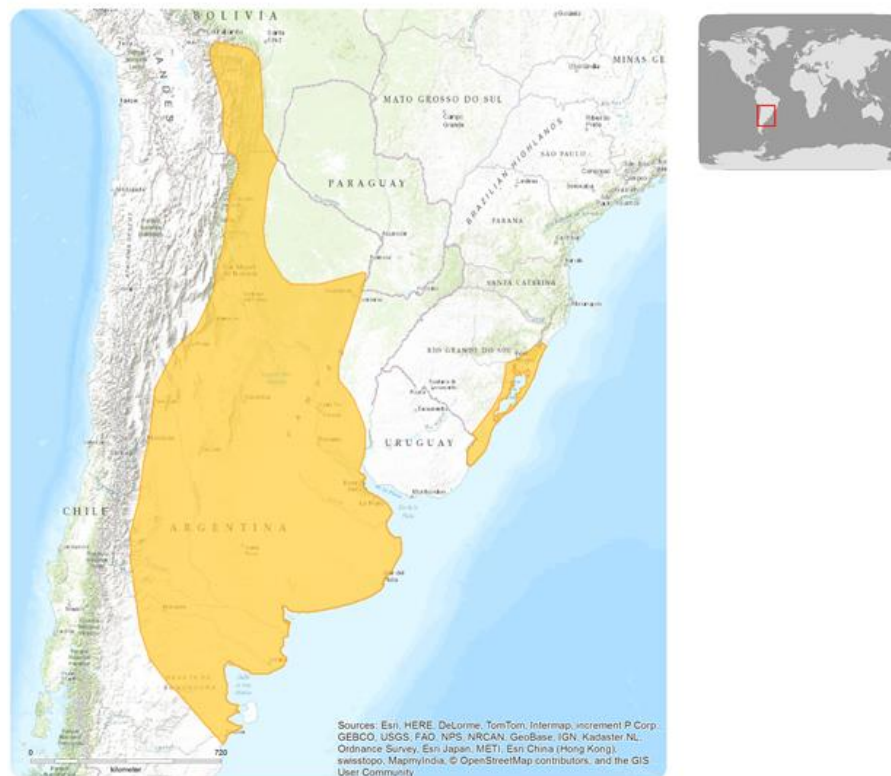


Figura 1.3 Distribución de *Rhinella arenarum* (Kwet et al. 2004).

Es un sapo de cuerpo robusto y tamaño mediano a grande adaptado a la vida terrestre (Figura 1.4 A). Presenta dimorfismo sexual. Las hembras alcanzan un largo entre 93 y 140 mm y en promedio 250 g de peso, mientras que los machos llegan a medir un poco menos, entre 88 y 108 mm, y en promedio alcanzan un peso de 150 g (Aronzon, 2013). En las patas delanteras, poseen cuatro dedos de poca movilidad sin membrana interdigital, mientras que en los miembros posteriores poseen cinco dedos con membrana interdigital completa (Duport Bru, 2020).

Presentan una piel gruesa de aspecto verrugoso dada la presencia de glándulas (Duport Bru, 2020). Su coloración es uniforme y varía entre el marrón y distintas tonalidades de verde y amarillo, mientras que su vientre es de color uniforme y claro, de tonalidades blancuzcas, gris, o amarillo verdoso (Aronzon, 2013). Poseen una cabeza ancha, y un hocico corto de bordes redondeados. Sus ojos son de color amarillo intenso con la pupila horizontal y están cubiertos por párpados. Por detrás del tímpano, conspicuo, se observa la presencia de las glándulas paratiroides (Duport Bru, 2020).

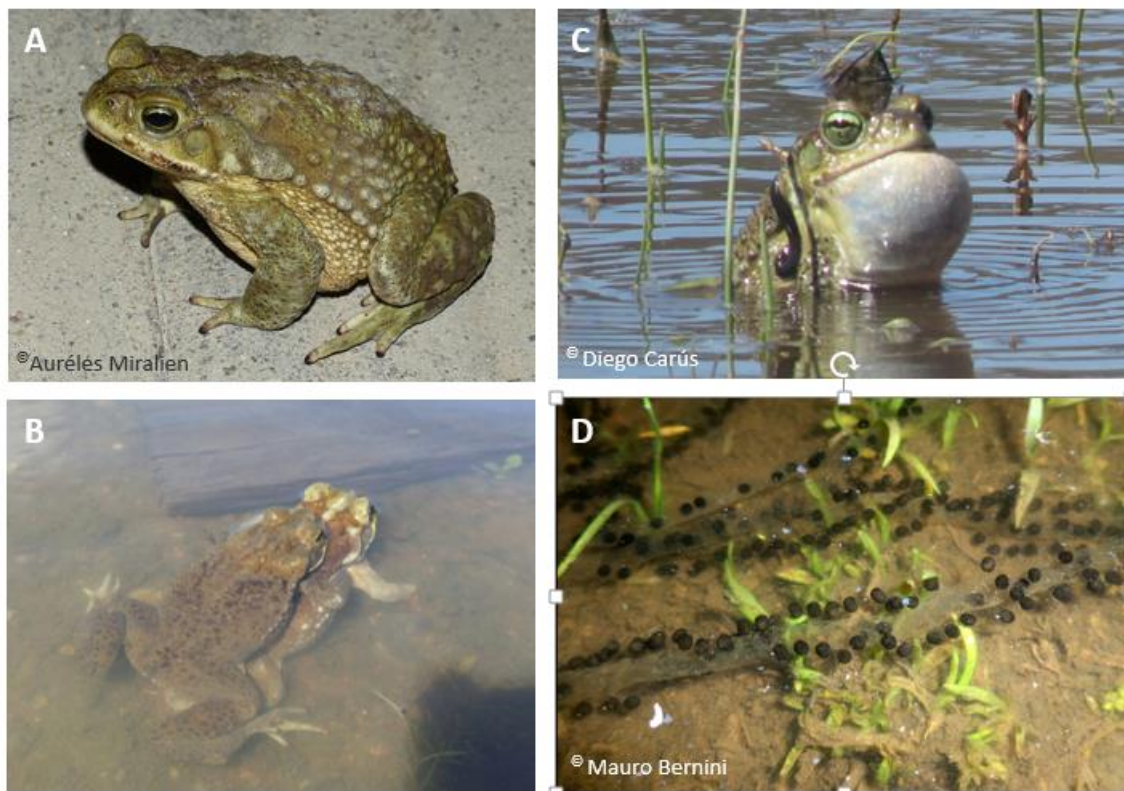


Figura 1.4 Imágenes de (A) individuo adulto de *Rhinella arenarum* donde se observa su textura robusta, cabeza ancha y hocico de bordes redondeados y su piel marrón-

verdosa de aspecto verrugoso, **(B)** macho adulto vocalizando, **(C)** pareja en amplexo y **(D)** huevos adheridos a la vegetación.

En cuanto a su alimentación, son predadores generalistas, aunque principalmente se alimentan de himenópteros, coleópteros y crustáceos (Quiroga et al. 2009). Durante los meses de junio a agosto los individuos de la especie *R. arenarum* se encuentran en período de hibernación, mientras que los meses de septiembre a abril, constituyen el período reproductivo coincidiendo con el período de lluvias (Aronzon, 2013; Herkovits & Pérez Coll, 1999). Durante la temporada reproductiva, los especímenes de *R. arenarum* coinciden en los pantanos, lagunas y charcas formadas por las lluvias siendo los machos los primeros en llegar y, con su canto, (Figura 1.4 B) atraen a otros machos menos experimentados y a las hembras. El amplexo es axilar y produce el reflejo de oviposición en las hembras (Figura 1.4 C). A medida que la hembra expulsa por la cloaca los huevos envueltos en cordones de gelatina, lo que constituye la ristra, el macho expulsa orina que contiene una gran cantidad de espermatozoides produciéndose la fecundación. Una hembra madura, puede poner un promedio de entre 4.000 a 5.000 huevos (Gallardo, 1987). Las ristras quedan adheridas a la vegetación del sitio de reproducción y no tienen ningún tipo de cuidado parental (Figura 1.4 D) (Herkovits & Pérez Coll, 1999).

1.5.1 Desarrollo embrionario, larval y gonadal de *Rhinella arenarum*

Un esquema general del ciclo de vida de *R. arenarum*, puede observarse en la Figura 1.5. Los huevos de *R. arenarum* son heterolecíticos y tienen un tamaño que oscila entre los 1,2 y 2 mm de diámetro (Svartz, 2014). Están envueltos en una membrana vitelina traslúcida que es digerida mediante enzimas en el momento de la eclosión. En cuanto al desarrollo temprano de los individuos, se distinguen dos fases importantes. La primera etapa, la embrionaria, se define como el período comprendido desde la fecundación del huevo hasta que los individuos comienzan a alimentarse (Rossi, 1958). Una segunda etapa, la larval, se distingue desde el inicio de la alimentación hasta la completitud de la metamorfosis (Contronei, 1932). Del Conte & Sirlin (1952) realizaron una descripción detallada de todos los estadios del desarrollo embrionario de la especie. Para ello, teniendo en cuenta los cambios en su morfología, definieron veinticinco estadios desde la fecundación del huevo (E.1) hasta la finalización del desarrollo embrionario (E.25), momento coincidente con el inicio de la etapa larval (Figura 1.5, Anexo 1A). Los estadios de 1-9 (E. 1-9) abarcan el período de segmentación. El período

10-12 comprende la neurulación. El estadio 17 (E.17) corresponde con la etapa de la formación del brote caudal y al llegar al estadio 18 (E.18) los individuos comienzan a tener respuesta neuromuscular y eclosionan de su membrana vitelina. Antes de la eclosión, los individuos sufren una gran transformación de su morfología por lo que les crece la cola, su cuerpo se alarga, comienza el latido cardíaco y se produce el enrollamiento del intestino. A partir del estadio 19 (E.19) hasta el estadio 22 (E.22) se da la circulación branquial, y luego la internalización de las mismas y la formación del opérculo (E.23-25).

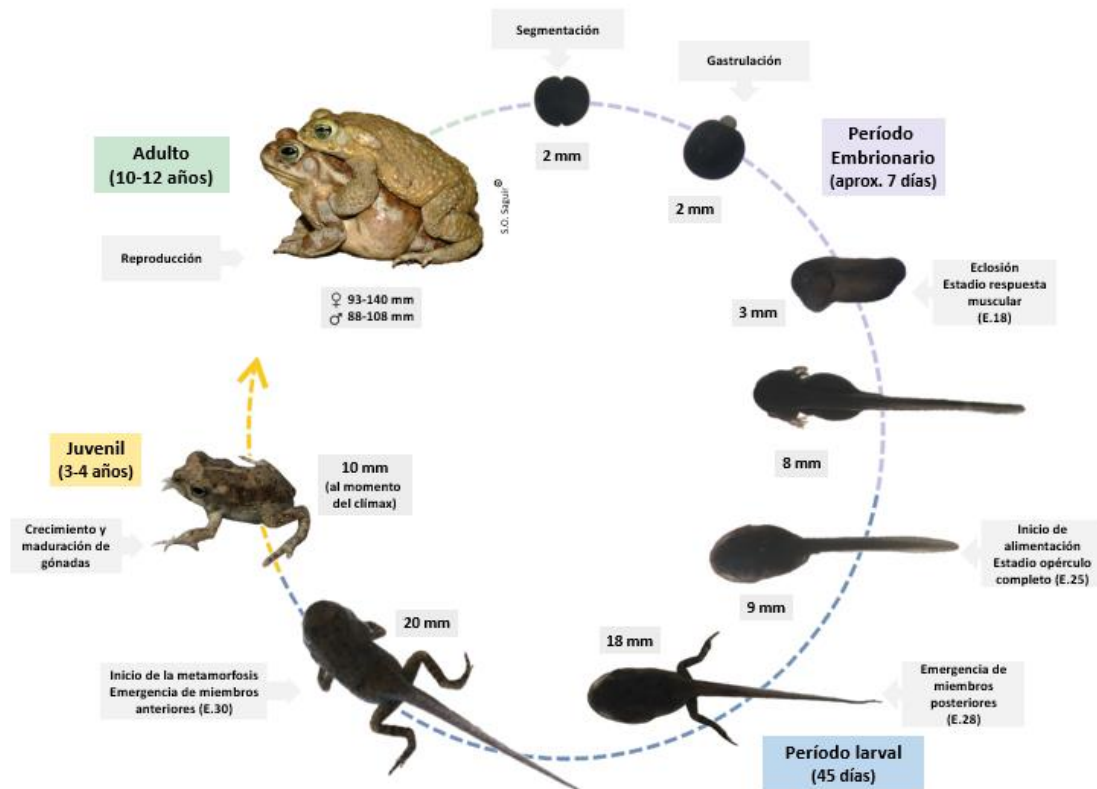


Figura 1.5 Esquema del ciclo de vida de *Rhinella arenarum* y sus principales fases del desarrollo.

Echeverría y Fiorito de López (1981) han realizado una descripción del período larval de *R. arenarum* como continuación de la descripción del desarrollo del período temprano abarcando todo el período larval hasta la metamorfosis y definiendo diez estadios desde el 26 al 35 (Anexo 1B). Para definir cada estadio las autoras se basan en el grado de desarrollo de las extremidades. En el momento que aparecen los esbozos de miembros posteriores, se da inicio a la etapa pre-metamórfica (E.28). Luego, la larva continúa su crecimiento desarrollando los miembros posteriores extracorpóreamente,

mientras que los miembros anteriores se desarrollan a la vez dentro de la cámara branquial. En este punto, la distinción de los estadios se realiza mediante la identificación del grado de desarrollo de los miembros posteriores. Al final de la etapa pre-metamórfica las larvas comienzan a subir a la superficie para enviar aire a los pulmones en vías de desarrollo. En el momento del clímax, emerge el miembro anterior izquierdo por el espiráculo y luego el derecho por el tegumento (E.31). En este punto del desarrollo los cambios morfológicos se aceleran y los órganos y otras estructuras que ya no serán necesarias en la vida adulta desaparecen completamente o se reducen, se desarrollan los órganos funcionales durante y posteriormente a la metamorfosis, se reabsorben las branquias y cámaras branquiales, así como también la cola. También la larva adquiere características más similares a los individuos adultos ya que desarrolla en este período los párpados y se modifica la boca, la forma de la cabeza y el esqueleto craneal. Otro cambio importante ocurre a nivel de piel. Mientras que la larva tiene una epidermis constituida por una bicapa con cilias, el individuo metamórfico tendrá una piel con un mayor número de células y una capa córnea en la superficie. Otro cambio significativo, será la coloración y la aparición de glándulas mucosas y serosas.

En promedio, los individuos de *R. arenarum* tardan dos meses en completar la metamorfosis desde el huevo. El desarrollo temprano es muy sensible a variaciones de temperatura y fotoperíodo pudiéndose alterar significativamente los tiempos que tardan los individuos en atravesar los distintos estadios (Aronzon, 2013).

En *R. arenarum*, la formación de los órganos reproductores, se trata de un proceso secuencial y ordenado que involucra las etapas tempranas del ciclo de vida. Las gónadas se desarrollan desde gónadas primordiales localizadas en la superficie ventral de los riñones. Al momento de alcanzar el estadio de esbozo de miembros posteriores (E.26) pueden observarse estos primordios y, en posición anterior, los órganos de Bidder. Esos primordios, que están formados por células germinales rodeadas de células somáticas epiteliales, tienen forma de cordones que se extienden a lo largo del riñón (Piazza, 2006). Al momento del clímax metamórfico, no existe gran cambio en el estado de desarrollo de las gónadas, que continúan desarrollándose por el borde interno del riñón y aumentando su volumen (Piazza, 2006). Luego de 30 días de haber ocurrido la metamorfosis, se puede observar bajo microscopio óptico la presencia de oocitos en estadio diplotene de la profase. Éstos se encuentran rodeados de células foliculares. En la médula del ovario, se observan células somáticas y, una cavidad ovárica incipiente (Piazza, 2006). En machos,

se observan grupos de células germinales (espermatogonias) asociadas a células somáticas (pre-Sertoli). Bajo lupa, se observan constricciones sucesivas a lo largo de la gónada (Piazza, 2006). A los 50-55 días post-metamorfosis, los ovarios y los testículos presentan una morfología característica que permite distinguirlos bajo lupa. El ovario se repliega formando lóbulos y se ensancha alcanzando el tamaño del órgano de Bidder, mientras que el testículo, se transforma en una estructura lisa sin presencia de lobulaciones (Piazza, 2006). Así, conocer la secuencia de desarrollo gonadal de la especie, y estudiar patrones de alteración, o desviaciones de la proporción de sexos 1:1 ante la exposición a xenobióticos, se vuelve relevante en el contexto de actual declinamiento de las poblaciones de anfibios y de gran contaminación por agroquímicos.

1.6 Bioensayos estandarizados para el estudio de la toxicidad

La determinación de los efectos de las sustancias en los organismos depende fundamentalmente de la realización de bioensayos en laboratorio que permitan cierta extrapolación y predicción de los efectos posibles en los ambientes naturales (Levin et al. 1989). Para esto, se utiliza una amplia variedad de modelos biológicos como cultivos celulares, microorganismos, daphnidos, invertebrados, peces y anfibios (USEPA, 1993; Fulladosa et al. 2005).

A pesar de no representar fielmente las condiciones naturales, los bioensayos de laboratorio constituyen una herramienta invaluable para la evaluación de la toxicidad de los contaminantes (Levin et al. 1989). El desarrollo de métodos estandarizados ha permitido evaluar los efectos de un gran número de sustancias en una amplia variedad de especies contribuyendo a la mejoría de la calidad de agua y la protección de los ecosistemas (Mount, 1982).

A lo largo de los años, diferentes organismos internacionales han publicado protocolos de estandarización de bioensayos, entre ellos los más relevantes son: American Society for Testing Materials (ASTM), Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), y United States Environmental Protection Agency (USEPA) (Landis & Yu, 2003). En nuestro país, el organismo encargado de la estandarización del muestreo y bioensayos de toxicidad es el Subcomité de Métodos Biológicos dentro del IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Clasificación).

Existen ventajas metodológicas del empleo de bioensayos estandarizados y radican en la uniformidad de los resultados lo que facilita su comparación. También, implican alta reproducibilidad lo que permite la compilación de la información en grandes bases de datos toxicológicas (Landis & Yu, 2003).

Dentro de los bioensayos de toxicidad existen distintos tipos que se clasifican, por ejemplo, de acuerdo al tiempo de duración, medio y tipo de exposición. En cuanto a la duración, podemos encontrar ensayos de toxicidad aguda que abarcan períodos de exposición entre 24 y 96 horas (Sprague, 1969). En cambio, la duración de los ensayos de exposición crónica dependerá de la expectativa de vida de los organismos modelo debiendo abarcar una porción significativa de la misma (Landis & Yu, 2003). Entre los medios de exposición posibles se encuentra el medio acuático, el suelo, el sedimento, etc. Respecto al medio acuático, en primer lugar, podemos encontrar ensayos de tipo estático donde no hay renovación del medio de exposición. Este método trae como consecuencia que la concentración de la sustancia puede alterarse por vaporización, adsorción a las paredes del recipiente donde ocurre la exposición, fotólisis, entre otros procesos de degradación. Estos problemas, pueden ser minimizados por los ensayos semi-estáticos donde las soluciones son parcial o completamente reemplazadas de manera periódica. Por último, se encuentran los ensayos dinámicos donde hay un flujo intermitente o continuo de las soluciones de exposición (Newman, 1998).

A partir de los bioensayos, se pueden obtener curvas de dosis-respuesta o concentración-respuesta que relacionan la concentración de la sustancia con un efecto observado (i.e. mortalidad, malformaciones, etc.) De éstas, se pueden calcular las concentraciones letales (CLs) que causan mortalidad en distintos porcentajes de los individuos expuestos. Los bioensayos también brindan información sobre las concentraciones efectivas (CE), los valores de concentración a los cuales no se observa efecto (NOEC, *por sus siglas en inglés*) y también la estimación de la concentración más baja a la que se observa efecto (LOEC, *por sus siglas en inglés*).

En conjunto, el análisis de los bioensayos permite la caracterización de la toxicidad de las sustancias en términos multiparamétricos.

1.6.1 Test de toxicidad ANFITOX

En cuanto a antecedentes de bioensayos estandarizados que utilicen anfibios, el protocolo FETAX (*en inglés Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus*) (ASTM, 1993) representó un hito importante para la evaluación de efectos letales y teratogénicos en embriones de anfibios en períodos agudos de exposición tomando como modelo a la especie *Xenopus laevis* (Pérez Coll et al. 2017).

Posteriormente se desarrolló el método ANFITOX (Herkovits & Pérez Coll, 1999) que incorporó también los tiempos agudos, sub-crónicos y crónicos de exposición para la evaluación de la toxicidad de sustancias potencialmente peligrosas y mezclas de ellas (Pérez Coll et al. 2017). Otra incorporación del protocolo ANFITOX fue el estudio de la toxicidad durante el período embrionario y larval del desarrollo de los anfibios. Por último, también propone realizar un análisis más profundo de los efectos letales a partir de la construcción de curvas TOP (del inglés *Toxicity Profile Curves*). En estas curvas se representan los valores de las CLs en función del tiempo de exposición por lo que brindan mayor información y comprensión sobre la toxicidad de la sustancia evaluada (Svartz, 2014).

A diferencia de FETAX, el protocolo ANFITOX propone como modelo a *R. arenarum*. Esta especie se constituye como modelo debido a que se encuentra ampliamente distribuida en gran parte del territorio argentino y Sudamérica, es relativamente fácil de mantener en condiciones de laboratorio (Herkovits & Pérez Coll, 1999) y es una especie sensible a la contaminación ambiental dada por diversas sustancias (Vera Candiotti et al. 2010; Sztrum et al. 2011; Aronzon et al. 2016).

1.6.2 Biomarcadores de Toxicidad

Los biomarcadores son alteraciones en parámetros bioquímicos, fisiológicos, morfológicos, o histológicos que indican exposición o efecto de un tóxico (Melancon, 1995). Su inclusión en la evaluación de toxicidad es de gran utilidad ya que detectan efectos adversos antes de que sean visibles en niveles de organización más complejos, por tanto, se dice que constituyen indicadores tempranos (Newman, 1998). Tradicionalmente, se pueden clasificar en 3 principales categorías: de exposición, de efecto y susceptibilidad. Los primeros, pueden ser utilizados para corroborar la

exposición a un tóxico en organismos, poblaciones, etc., mediante la detección de la sustancia o sus metabolitos en los fluidos y tejidos (Gupta, 2014). Los biomarcadores de efecto incluyen alteraciones fisiológicas e histológicas observables (Gupta, 2014). Por último, los de susceptibilidad indican la capacidad del organismo de responder a la presencia de un tóxico ya sea por factores genéticos heredables o adquiridos.

Un buen biomarcador debe ser específico, preciso, sensible, validado y biológicamente relevante. También debe ser fácil y rápido de evaluar para poder ser considerado una herramienta predictiva útil para los estudios de toxicidad y monitoreo (Gupta, 2014). En este sentido, la utilización de biomarcadores enzimáticos y su inhibición específica ha demostrado ser de utilidad. Por ejemplo, en el caso de la evaluación del potencial neurotóxico de una sustancia, un biomarcador enzimático muy utilizado es la medición de la actividad de las enzimas colinesterasas (ChE) de vertebrados. Estas enzimas, son las encargadas de degradar los ésteres de colina, por lo que juegan un papel sumamente importante en la correcta neurotransmisión de los impulsos eléctricos (Moncaleano-Niño et al. 2018). Entre las ChE, la medición de la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE) son dos indicadores muy útiles de toxicidad subletales (Sharma et al. 1993). Las sustancias neurotóxicas que afectan a estas enzimas actúan inhibiéndolas, lo que lleva a la acumulación del neurotransmisor acetilcolina en los receptores de membrana post-sinápticos (Moncaleano-Niño et al. 2018). Esto resulta en una sobre-estimulación de los receptores colinérgicos del sistema nervioso (Sánchez-Hernandez, et al. 2003). El grado de inhibición de estas enzimas está directamente relacionado al efecto tóxico de la sustancia (Grue et al. 1991). Específicamente, la actividad de la enzima AChE ha sido inicialmente considerada como un biomarcador específico de exposición a plaguicidas de las familias de los organofosfatos y los carbamatos (Amiard-Triquet et al. 2012). Sin embargo, recientemente, se ha demostrado que muchos otros grupos de sustancias químicas presentes en los ecosistemas acuáticos, como los detergentes, hidrocarburos, metales, y otros plaguicidas, pueden alterar también la actividad de esta enzima (Amiard-Triquet et al. 2012; Gholami-Seyedkolaei et al. 2013; Topal et al. 2017; Almeida et al. 2021).

En cuanto a la BChE, se trata de una enzima inespecífica presente principalmente en hígado, plasma, intestino, corazón y pulmones (Dave et al. 2000). Aportes recientes al entendimiento del rol de esta enzima indican que funcionaría como co-regulador junto a

la AChE de los niveles de acetilcolina en cerebro, y por tanto de la transmisión de señales colinérgicas (Geula et al. 2004). Algunos autores sugieren que es una de las enzimas neuroprotectoras más importantes ya que se encarga de hidrolizar un amplio espectro de sustancias químicas, desde drogas farmacológicas y de abuso, así como también plaguicidas antes de que afecten a la AChE en sitios de mayor relevancia fisiológica como lo son el cerebro y los músculos donde la AChE es más abundante (Çokuğraş, 2003). A pesar de su relevancia biológica, la mayoría de los estudios de evaluación de efectos neurotóxicos se avocan a estudiar los efectos sobre la actividad de la AChE.

Por otro lado, la exposición a agentes contaminantes puede causar daño en el ADN ya sea por interacción directa con el material genético o de manera indirecta (Zhang et al. 2014). Entre los mecanismos de acción indirecta se encuentran la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROs) que provoca ruptura de las hebras de ADN (Kumar et al. 2013), la interferencia en los mecanismos de reparación (García-Lestón et al. 2012) y alteración de la estructura de las proteínas de unión al ADN (Zawia et al. 2000). Para la evaluación del potencial genotóxico de una sustancia, uno de los biomarcadores más utilizados es la evaluación del incremento de la frecuencia de micronúcleos (MNs) en las células (Fenech 2000). Los MNs son pequeños fragmentos de material genético rodeados por membrana que se originan por una ruptura parcial de un cromosoma o por su pérdida total por problemas en el funcionamiento del huso mitótico durante la anafase (Lähdetie & Parvinen 1981). En este sentido, como los MNs pueden encontrarse en células en división que contengan fragmentos cromosómicos acéntricos (sin centrómeros) o bien, cromosomas enteros que no han podido migrar hacia los polos, evaluar su frecuencia provee un índice confiable para determinar, sin distinción, tanto efectos clastogénicos como aneunógenos (Fenech, 2000).

Existen ciertos criterios establecidos por Fenech (2000) que deben tenerse en cuenta a la hora de identificar la presencia de MNs en una célula. El diámetro de los MNs debe tener entre 1/16 y 1/3 del tamaño del núcleo principal. No tiene que estar conectado al núcleo principal, ni solaparse, y debe ser claramente diferenciable. No debe presentar refringencia y su coloración, tiene que la misma intensidad que el núcleo principal, (aunque ocasionalmente, dada su estructura, puede teñirse de manera más intensa). Por último, no deben existir más de 6 MNs en una misma célula.

Una de las utilidades de este biomarcador es que se lo considera un buen predictor de riesgo cancerígeno ya que existe una relación positiva entre la incidencia de cáncer y el incremento de la frecuencia de MNs (Kang et al. 2013).

Sin lugar a dudas, la elección de un biomarcador adecuado para el estudio de toxicidad que se plantea requiere un conocimiento previo de las características físico-químicas de las sustancias, el modelo a utilizar y la problemática a evaluar. Pero también es necesario, conocer en profundidad la naturaleza del biomarcador para realizar una correcta interpretación de las modificaciones de sus respuestas ante la exposición a una sustancia potencialmente nociva. Si bien la falta de especificidad de un biomarcador, impide utilizarlo como herramienta para la detección de la presencia de un contaminante en particular, los biomarcadores inespecíficos se constituyen como herramientas importantes para evaluar la degradación en la condición de los ecosistemas (Amiard-Triquet et al. 2012).

Teniendo en cuenta que un xenobiótico puede afectar la fisiología de los organismos expuestos a él en distintos niveles biológicos, el análisis de la respuesta de múltiples biomarcadores constituye una herramienta útil para definir una perspectiva más representativa del efecto en los organismos y prever de forma temprana los posibles efectos nocivos.

1.7 Caracterización del riesgo

La caracterización del riesgo de una sustancia (*en inglés risk characterization*) es un proceso que se encuentra comprendido dentro de la Evaluación de Riesgo Ecológico (EER) que estima la probabilidad de que ocurran efectos adversos ya sea en humanos o en entidades ecológicas (organismos, poblaciones, comunidades y ecosistemas) por liberación presente o futura de la sustancia al ambiente (Newman, 1998). La EER, comprende 3 etapas bien definidas: la primera etapa se trata de la formulación del problema donde se reúne información sobre los posibles contaminantes ambientales en cuestión, qué plantas y animales pueden encontrarse en riesgo y por tanto necesitar protección, los alcances de la evaluación en tiempo y espacio, las mediciones, modelos, y tipo de datos a relevar. En la segunda etapa, se procede al análisis de la exposición y de los efectos determinando qué plantas y animales están expuestas y en qué grado, y la relación entre la exposición y la presencia de efectos adversos en los organismos y

ecosistemas. La tercer y última fase se trata de la caracterización que incluye dos componentes: la estimación y descripción del riesgo. La estimación del riesgo compara el nivel de exposición medida en plantas, animales, poblaciones, comunidades, y ecosistemas con la información disponible sobre los efectos esperados para ese grupo y nivel de exposición (USEPA, 2021). La descripción del riesgo provee información para la interpretación de los resultados de la evaluación de riesgo, detallando si se esperan efectos nocivos en plantas y animales, comparaciones relevantes, e incertezas en la información relevada (USEPA, 2021).

La USEPA utiliza un cociente para comparar la toxicidad observada y la exposición ambiental. De esta forma, el cociente de riesgo (RQ) se calcula dividiendo la Concentración Esperada en el Ambiente (CEA) con un parámetro toxicológico de efecto como puede ser la Concentración Letal que causa mortalidad en el 50% de los individuos (CL50) (USEPA, 2021). Para animales vertebrados acuáticos, el RQ para exposición aguda se calcula como el cociente entre la EEC y la CL50, mientras que para exposición crónica se calcula como EEC y el valor NOEC. Si el valor de RQ para períodos agudos es mayor a 0,5 la sustancia se presume riesgosa para la especie. En cambio, el RQ de exposición crónica debe ser mayor a 1 para que la sustancia sea considerada presuntamente peligrosa (USEPA, 2021).

De esta forma la evaluación del riesgo ambiental se constituye como una herramienta fundamental para estimar retrospectivamente si los efectos observados en las entidades ecológicas son consecuencia de exposiciones pasadas, o bien estimar el riesgo futuro por exposición a distintos estresores. Asimismo, permite la regulación de los sitios de deposición final de residuos industriales y plaguicidas, regulación del manejo de las cuencas y la protección de los ecosistemas de las sustancias químicas, físicas y biológicas que pudieran causar efectos perjudiciales o bien desarrollar planes de monitoreo para promover la recuperación de los ecosistemas dañados (USEPA, 2021).

Actualmente, existen ciertas controversias sobre la utilización del método del RQ para la estimación de riesgo ecotoxicológico, como herramienta inequívoca. Entre las críticas que se le hacen se destaca la limitación del método de cálculo que contempla una CEA y un parámetro de sensibilidad al tóxico que algunos autores cuestionan ya que los tildan de ser seleccionados de manera un tanto azarosa (Verdonck et al. 2003). De esta manera, el RQ excluye otros parámetros y herramientas ecotoxicológicas que podrían

brindar un panorama más real sobre la toxicidad de la sustancia evaluada. Por esta razón, la estimación del RQ puede ser un primer paso, pero no puede sostenerse por sí sólo como un estimador confiable del riesgo, sino que debe ir acompañado de la incorporación de otros métodos más complejos que puedan caracterizar de manera más precisa y confiable los efectos posibles en el ambiente (Bartell, 1996; Campbell et al. 2000).

1.8 Objetivos e hipótesis generales

El trabajo aquí presentado se propone evaluar la toxicidad de 3 plaguicidas de uso frecuente en los agroecosistemas pampeanos (mancozeb, imidacloprid y cletodim) sobre el desarrollo embrio-larval de *R. arenarum*.

Habiendo presentado el marco teórico que contiene al presente trabajo, a continuación, se listan los objetivos generales:

- Estudiar las consecuencias de la exposición en el desarrollo temprano de individuos de la especie *R. arenarum* a 3 plaguicidas ampliamente utilizados en Argentina y el mundo, mancozeb, imidacloprid y cletodim, mediante bioensayos estandarizados analizando los efectos letales, y subletales entendidos como presencia de malformaciones embrionarias, deformidades larvarias, cambios etológicos y alteración de la respuesta de biomarcadores de neuroprotección y genotoxicidad.
- Realizar la caracterización del riesgo de estas sustancias mediante la comparación de las concentraciones letales y subletales con los valores de las concentraciones esperadas en el ambiente.

Las hipótesis que se pondrán a prueba son:

- La exposición a los plaguicidas mancozeb, imidacloprid y cletodim causa letalidad, malformaciones, deformidades y cambios etológicos durante el período de desarrollo temprano de *R. arenarum*.
- El efecto de la exposición a los plaguicidas mancozeb, imidacloprid y cletodim se manifiesta como alteraciones en la respuesta del biomarcador enzimático neuroprotector.

- El efecto de la exposición a los plaguicidas mancozeb, imidacloprid y cletodim se manifiesta como alteraciones en la respuesta del biomarcador de genotoxicidad.
- La magnitud de efectos de la toxicidad de los plaguicidas es superior en los individuos expuestos a concentraciones más elevadas.
- Los plaguicidas evaluados presentan un riesgo para los individuos de la especie *R. arenarum* que atraviesan el desarrollo temprano en tiempos de exposición aguda.
- Los plaguicidas evaluados presentan un riesgo para los individuos de la especie *R. arenarum* en desarrollo temprano en períodos de exposición crónica.

Capítulo 2

Materiales y Métodos Generales

2.1 Obtención y mantenimiento de animales experimentales en laboratorio

Para la obtención de animales experimentales en condiciones de laboratorio se recolectaron de campo adultos sexualmente maduros (permiso de captura Provincia de Buenos Aires, EXP 2021-01133069). El lugar seleccionado para la captura se corresponde con un sitio no contaminado en Lobos, Provincia de Buenos Aires (35° 11' S; 59° 05' O). Los criterios de selección de animales se basaron en primer lugar, en el estado de salud de los individuos, eligiendo sólo aquellos que se encontraban en condiciones saludables y que no tuvieran en su piel manchas o lesiones que son indicio de infecciones. En segundo lugar, se seleccionó animales con un peso adecuado eligiendo hembras por encima de los 220 g y machos de al menos 120 g (Herkovits & Pérez Coll, 1999).

Los individuos adultos fueron mantenidos el menor tiempo posible hasta su utilización en recipientes plásticos suficientemente grandes con grava como sustrato, refugios y una pequeña pileta bajo condiciones controladas de temperatura ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo natural.

La obtención *in vitro* de embriones, su cuidado y mantenimiento, se realizó de acuerdo al protocolo ANFITOX (Herkovits & Pérez Coll, 1999; Pérez Coll et al. 2017).

Los animales utilizados en los experimentos fueron manejados según las normas internacionales de bienestar animal (Canadian Council on Animal Care in Science, 1993) y fueron supervisados y controlados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales en Experimentación (CICUAE) de la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM).

Para inducir la ovulación de las hembras, se les inyectó intraperitonealmente 5000 UI de hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) Gonacor®, donada por Ferring Pharmaceuticals. Durante la inducción, las hembras fueron mantenidas en recipientes individuales humedecidos, bajo condiciones controladas de temperatura ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo natural. Entre 16 y 24 h post-inducción, las hembras comienzan a tener movimientos abdominales ondulatorios correspondientes con el inicio de la expulsión de huevos. Al comenzar la expulsión de los huevos (Figura 2.1 A), las hembras fueron desmeduladas. A continuación, se inició un masaje manual compresivo del abdomen para facilitar la expulsión de las ristras gelatinosas de huevos. Mediante disección abdominal

se extrajeron también los oocitos retenidos en el ovisaco. Los oocitos en las ristras gelatinosas (Figura 2.1 B), fueron colocados en pequeñas cantidades (de manera de asegurar la correcta oxigenación) en bandejas plásticas de 50x25x5 cm apenas humedecidas con solución ANFITOX (SA), una solución salina suave cuya composición es NaCl 36 mg/L, KCl 0,5 mg, CaCl₂ 1 mg, NaHCO₃ 2 mg/L preparada en agua destilada (Herkovits et al. 2002).

A continuación, se realizó la desmedulación y disección de los machos. Luego, mediante disección abdominal a través de un corte longitudinal se procedió a la extracción de los testículos de ubicación retroperitoneal y a la realización de un macerado testicular. Esto consistió en realizar cuidadosos cortes de las gónadas en 1 mL de SA obteniéndose una concentración espermática cercana al 10%. La morfología, viabilidad y movilidad de los espermatozoides fue confirmada bajo microscopio óptico (Leica DM2700 P) utilizando un aumento de 400x. A continuación, se procedió a la fecundación de los oocitos en los recipientes mediante suaves pinceladas con el macerado testicular suspendido en SA (Figura 2.1 C). Pasados 10 min, tiempo suficiente para que se haya concluido la fecundación, se agregó cuidadosamente 2 L de SA a cada recipiente plástico. Luego de 2 h fue posible observar bajo lupa el primer surco de división celular en los embriones.

Para los ensayos en los que se requiere individuos en estadios embrionarios tempranos, se procedió a la desgelatinización artificial de las ristras. Para ello, se empleó una solución de ácido tioglicólico al 2% en SA, neutralizada con NaOH hasta alcanzar pH entre 7,2 y 7,4. Una vez eliminada la gelatina (Figura 2.1 D), se procedió a lavar con abundante SA a los embriones. En los ensayos que requirieron el empleo de embriones post-eclosionales (a partir del E.18) se utilizaron embriones cuya eclosión fue natural.

Hasta alcanzar el estadio necesario de acuerdo a Del Conte & Sirlin (1952) y Echeverría & Fiorito de López (1981) (Anexo 1A y 1B, respectivamente) para su utilización en los protocolos experimentales, los animales en desarrollo fueron mantenidos en recipientes plásticos de 50x25x5 cm conteniendo 2L de SA bajo fotoperíodo natural y condiciones controladas de temperatura (20±1°C). El medio fue renovado cada 48 h para asegurar su correcta oxigenación. El pH fue controlado de manera tal de asegurar valores aceptables entre 7,0 y 7,4. Diariamente se inspeccionó la presencia de individuos muertos para su remoción.

Una vez que los individuos alcanzaron el estadio larval (E.25) se les brindó gránulos de alimento balanceado para peces de la marca TetraColor®.

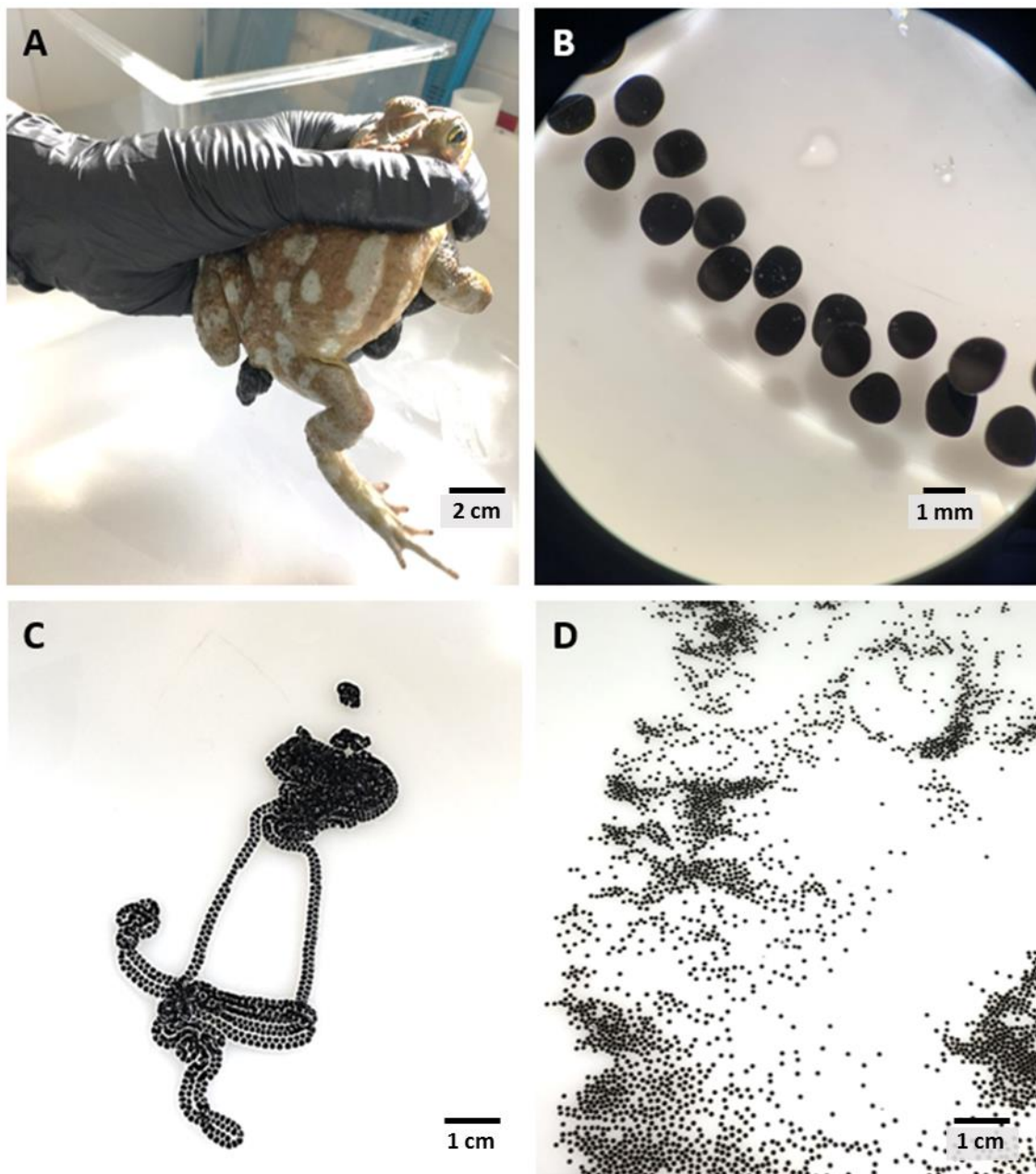


Figura 2.1 Imágenes que ilustran la secuencia de pasos del protocolo ANFITOX (A) Hembra adulta de *Rhinella arenarum* expulsando oocitos (B) oocitos no fecundados dispuestos dentro de la ristra gelatinosa (C) oocitos luego de ser fecundados con macerado testicular y (D) huevos fecundados luego de la desglatinización

2.2 Criterio de aceptación de los embriones

Se inspeccionó la calidad de la fecundación *in vitro* considerándose aceptable si la tasa de fecundación observada fue mayor al 75% y la sobrevida en estadio de surco neural (E.13) mayor al 70%.

2.3 Bioensayos estandarizados ANFITOX: Protocolos experimentales

Entre los años 2017-2021 se realizaron bioensayos estandarizados con individuos obtenidos de la reproducción *in vitro* de distintas parejas de adultos de *R. arenarum*. Algunos de los protocolos descritos a continuación fueron repetidos entre 3 y 5 veces utilizando individuos de distintas camadas.

Para la definición de las concentraciones de exposición se realizaron ensayos preliminares abarcando un rango amplio de concentraciones de manera de definir las concentraciones finales que permitieran la descripción de efectos letales y construcción de perfiles de toxicidad y la descripción de los efectos subletales entendidos como alteraciones en la morfología, desarrollo y comportamiento de los individuos así como también cambios en las respuestas de los biomarcadores de neuroprotección y genotoxicidad.

2.3.1 Exposición continua

Para los ensayos de exposición continua se utilizaron 2 estadios del desarrollo de la especie *R. arenarum*, esto es: embriones en estadio de 2-blastómeros (E.3) y larvas en estadio de opérculo completo (E.25) (Anexo 1A) (Del Conte & Sirlin, 1952). Previo al inicio de la exposición, los individuos fueron cuidadosamente seleccionados de manera de asegurar poca variabilidad y óptimas condiciones.

Para la exposición se colocaron 10 individuos, ya sea en E.3 o E.25 en cajas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro cubiertas, conteniendo 40 mL de solución del plaguicida a evaluar (Figura 2.2 A y B). Cada tratamiento se realizó por triplicado (Figura 2.2 C). Simultáneamente, los individuos pertenecientes al control negativo fueron mantenidos en SA. Los ensayos se realizaron bajo condiciones controladas de temperatura ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo natural.

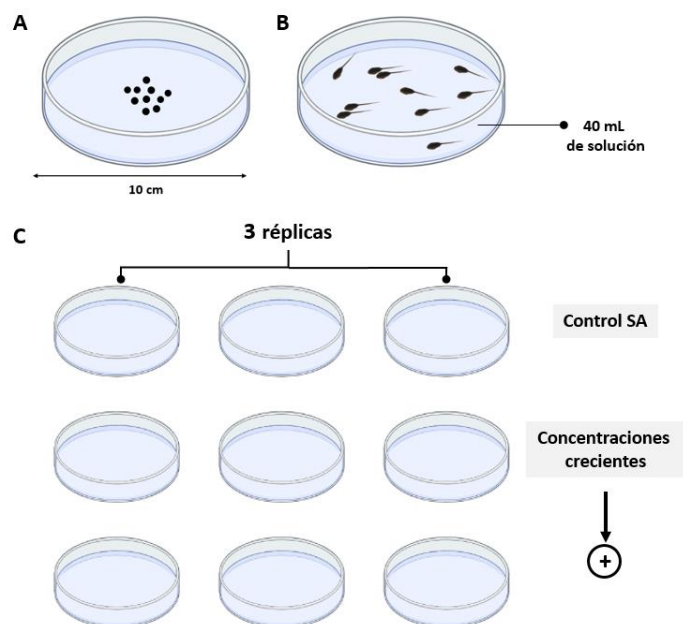


Figura 2.2 Esquema del ensayo de exposición continua (A) exposición de 10 embriones (B) exposición de 10 larvas y (C) disposición espacial de las cajas de Petri durante el experimento.

Los formulados comerciales de los plaguicidas evaluados en el presente trabajo son solubles en agua, por tanto, el medio de dilución empleado fue SA. Todas las soluciones fueron preparadas inmediatamente antes de su uso y renovadas cada 48 h para asegurar una correcta oxigenación del medio y una concentración constante de los plaguicidas.

La exposición se realizó de manera continua durante períodos agudos (48-96 h), sub-crónicos (hasta las 168 h) y crónicos (336-504 h). Los individuos en E.25 fueron alimentados diariamente con 3 gránulos ($6 \pm 0,5$ mg) de alimento balanceado de peces TetraColor® por caja de Petri.

Diariamente se registró la mortalidad, la presencia de individuos malformados, el tipo de malformación (i.e incurvaciones en el eje de la cola, hidropesía, microcefalia, acefalia, retraso en el desarrollo, reducción del tamaño corporal, distribución anómala del pigmento) y los cambios etológicos (i.e nado errático, movimientos débiles, ausencia de movimiento) en relación al control negativo SA. Las alteraciones morfológicas fueron observadas bajo lupa (Zeiss Stemi DV4).

A partir de estos ensayos se calculó el valor NOEC de efectos letales (NOEC_L) y subletales (NOEC_{SL}), LOEC, las curvas TOP y los índices teratogénicos (IT) para cada plaguicida. El IT fue calculado como el cociente entre la CL50 y la concentración efectiva 50 (CE50). Un IT mayor a 1,5 indica un alto riesgo de malformaciones embrionarias en ausencia significativa de mortalidad (ASTM, 1993).

2.3.2 Evaluación del riesgo ambiental: Caracterización de Riesgo

Para realizar la caracterización de riesgo de cada uno de los plaguicidas, se obtuvieron de la USEPA la Concentración Esperada en el Ambiente (CEA) en aguas superficiales para cada uno luego de 48-96 h y 504 h post-aplicación, exposición aguda y crónica, respectivamente.

Con los datos obtenidos de los ensayos de exposición continua se obtuvieron los valores CL50 a las 96 h y el valor NOEC_L a las 504 h. De esta manera, se calculó el coeficiente de riesgo (RQ) para tiempos de exposición aguda como el cociente entre la CEA y la CL50_{96h} y el RQ para tiempos crónicos como el cociente entre la CEA y el valor $\text{NOEC}_{L\ 504h}$ (USEPA, 2021). Los coeficientes fueron comparados contra un valor de nivel de preocupación (LOC, *del inglés level of concern*). El LOC es un instrumento que utiliza la USEPA para interpretar el RQ y analizar el riesgo potencial para los organismos *no blanco* en pos de considerar la toma de acciones para la regulación de las sustancias evaluadas. Para animales acuáticos, se considera que si el RQ excede el valor LOC agudo de 0,5 existe riesgo agudo de las especies *no blanco* por exposición a la sustancia. Para riesgo crónico en cambio, el RQ debe exceder un valor LOC de 1.

2.3.3 Biomarcador enzimático butirilcolinesterasa

2.3.3.1 Exposición

Para la medición de la acción de la enzima butirilcolinesterasa (BChE) se expusieron 30 individuos en E.25. El criterio de selección de este estadio para la medición del biomarcador neuroprotector BChE radica en que, en este período, las larvas han alcanzado un completo desarrollo del sistema nervioso. Las larvas fueron colocadas en cajas de Petri de 15 cm de diámetro cubiertas conteniendo un volumen de solución de 150 mL durante 96 h (Figura 2.3 A). Como control negativo se utilizó SA. Cada tratamiento se realizó por triplicado (Figura 2.3 B). Las larvas fueron alimentadas diariamente con 5

gránulos ($6 \pm 0,5$ mg) de alimento balanceado de peces TetraColor® por caja de Petri. El medio de exposición fue renovado por completo a las 48 h de exposición para asegurar la correcta oxigenación y una concentración constante de los plaguicidas. Los ensayos se realizaron bajo condiciones controladas de temperatura ($(20 \pm 1^\circ\text{C})$ y fotoperiodo natural.

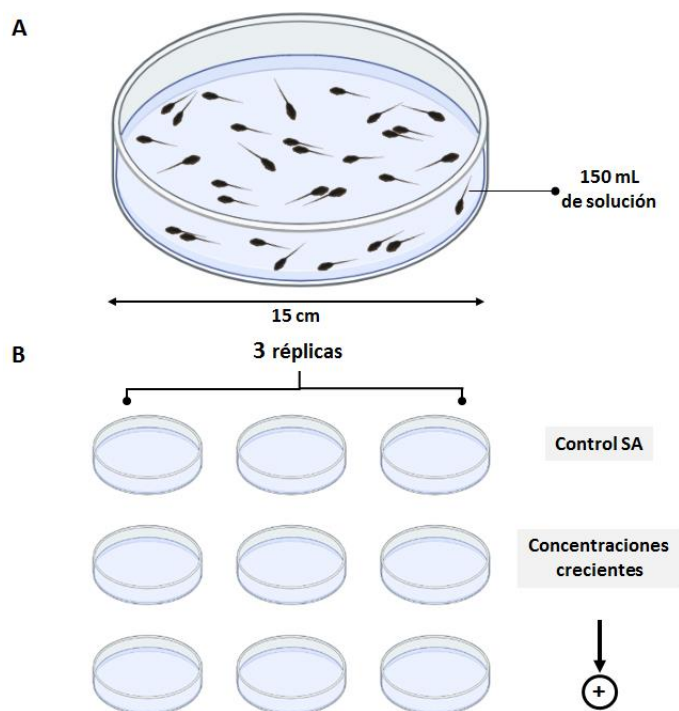


Figura 2.3 Esquema de la exposición para la evaluación de la actividad de la enzima butirilcolinesterasa (A) exposición de 30 larvas en estadio de opérculo completo (E.25) y (B) disposición espacial de las cajas de Petri durante el experimento.

2.3.3.2 Medición de la actividad enzimática

Finalizada la exposición, las larvas fueron sacrificadas. A continuación, se realizó por placa, un homogenato de cuerpo completo en buffer (Tris 25 mM/Triton 0,1%, pH=7,6). Luego, los homogenatos fueron centrifugados a 10.000 r.p.m durante 15 min a 4°C de temperatura. Al finalizar este punto, sólo se conservó el sobrenadante. A continuación, se realizó la medición de la actividad de la BChE de acuerdo a Ellman et al. (1961) con algunas modificaciones. La composición del medio de reacción fue 890 μL de buffer (Tris- HCl 25 Mm/ CaCl_2 1 Mm, pH=7,6), 50 μL de ácido 5,5'-ditiobis-2-dinitrobenzoico (DTNB) 0,2 mM, 10 μL del sustrato butiriltiocolina iodada (2×10^{-3} M) y 50 μL del sobrenadante.

La absorbancia fue medida durante 1 min a una longitud de onda de 412 nm en espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 35) (Figura 2.4). La actividad de la enzima fue expresada como la cantidad de sustrato hidrolizado por min relativizado a la cantidad total de proteínas ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). Para ello, se utilizó un coeficiente de extinción molar de $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

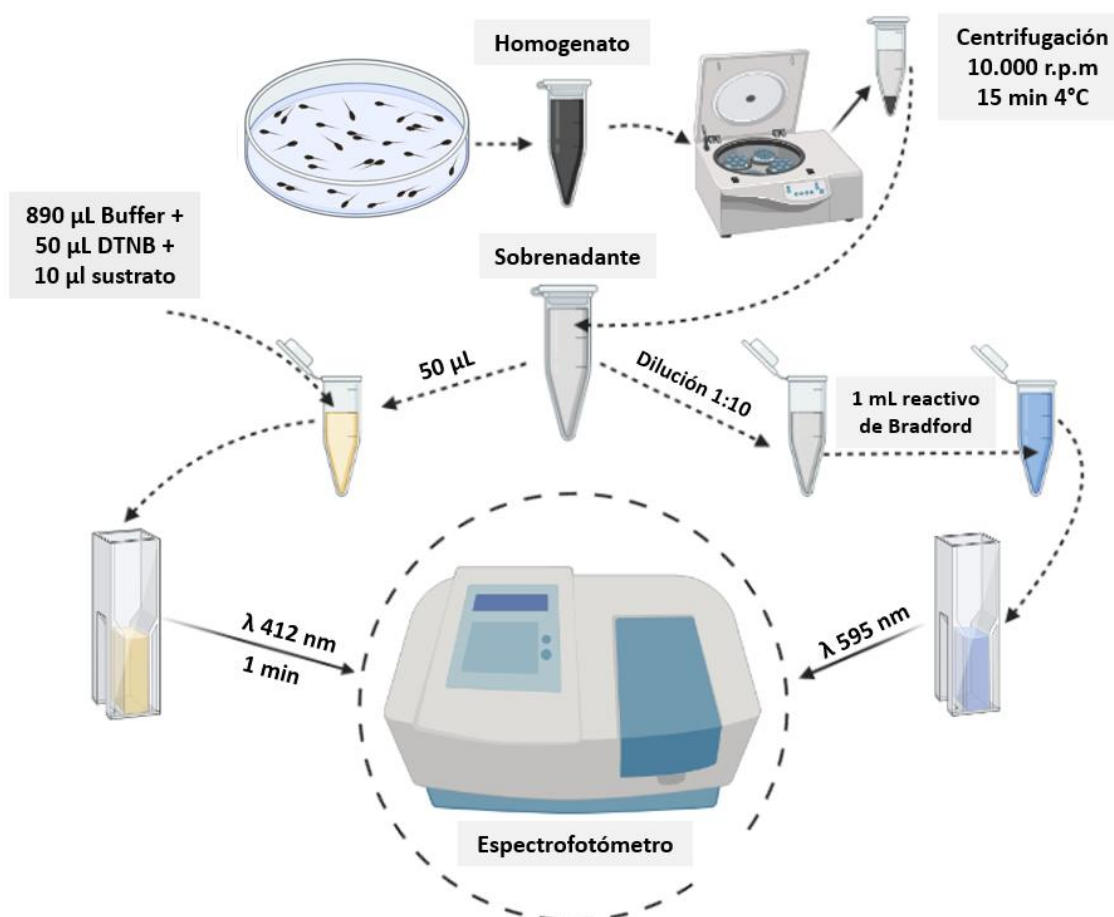


Figura 2.4 Esquematización del protocolo para la medición de la actividad de la enzima butirilcolinesterasa y determinación de la cantidad de proteínas.

La cantidad de proteínas en el homogenato, fue determinada de acuerdo a Bradford (1971) utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Las muestras fueron diluidas en un factor de 1:10. Se tomó 10 μL de la dilución de la muestra anterior y se llevó a un volumen final de 100 μL con agua destilada. Luego, se procedió a la incubación con 1 mL reactivo de Bradford. Se midió la cantidad de proteínas a una longitud de onda de 595 nm en espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 35) (Figura 2.4).

2.3.4 Biomarcador de genotoxicidad

2.3.4.1 Exposición

Se expusieron 5 larvas pre-metamórficas en estadio E.28 por triplicado (Echeverría & Fiorito de López, 1981) en cajas de Petri cubiertas de 15 cm de diámetro conteniendo 150 mL de solución a evaluar (Figura 2.5 A). El criterio de selección de este estadio radica en que los individuos han alcanzado un tamaño tal (18 mm aproximadamente) que permite la obtención de un adecuado volumen de sangre. Como control negativo, se utilizó SA. Para el control positivo se utilizó ciclofosfamida (CF) en una concentración de 40 mg/L adquirida de Sigma-Aldrich®. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado (Figura 2.5 B). Se evaluaron 2 tiempos de exposición: 48 y 96 h. En el caso del experimento de mayor duración, las soluciones fueron totalmente renovadas a las 48 h para asegurar la correcta oxigenación y concentración de los plaguicidas. Los ensayos se realizaron bajo condiciones controladas de temperatura ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) y fotoperiodo natural. Las larvas fueron alimentadas diariamente con 5 gránulos ($6 \pm 0,5$ mg) de alimento balanceado de peces TetraColor® por caja de Petri.

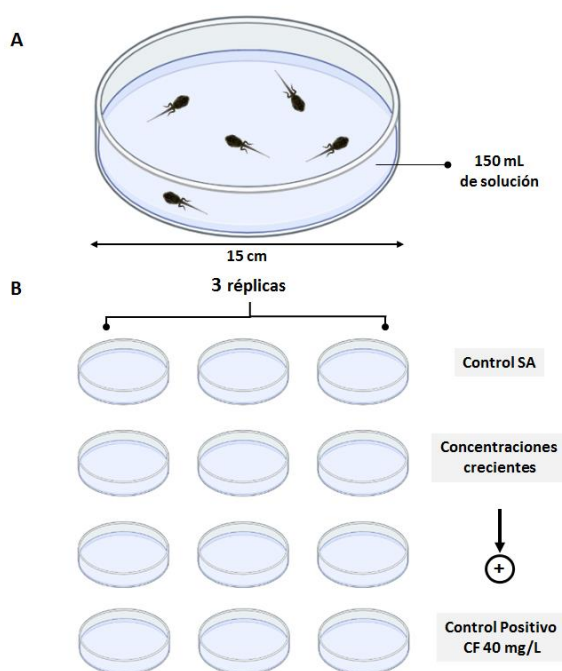


Figura 2.5 Esquema de la exposición para la evaluación de micronúcleos (A) exposición de 5 larvas en estadio de emergencia de miembros posteriores (E.28) y (B) disposición espacial de las cajas de Petri durante el experimento.

2.3.4.2 Obtención de muestras de sangre

Finalizado el tiempo de exposición, las larvas fueron anestesiadas en agua fría. Luego se obtuvieron muestras de sangre periférica seccionando detrás del opérculo sobre un portaobjetos limpio para seguidamente realizar un frotis. Las muestras se secaron al aire y luego se fijaron en metanol frío durante 20 min. Finalmente, se colorearon mediante la técnica de May Grünwald-Giemsa. La frecuencia de micronúcleos (MNs) se calculó estimando la frecuencia de eritrocitos micronucleados en un total de 1000 células utilizando un microscopio óptico (Leica DM2700 P) bajo un aumento de 1000x (Figura 2.6). Los criterios para identificar los MNs se siguieron de acuerdo a Fenech (2000).

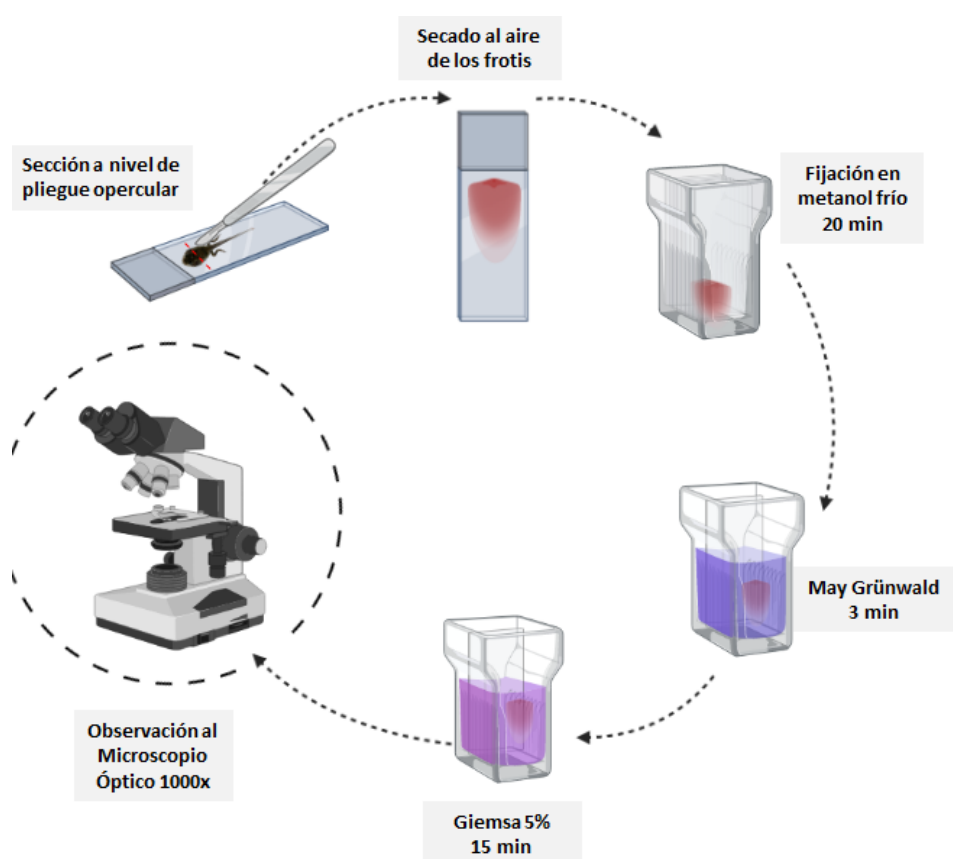


Figura 2.6 Esquematización del protocolo para la observación de micronúcleos.

2.4 Análisis estadístico general

Para obtener las concentraciones letales (CLs) 10, 50 y 90 de cada plaguicida y, sus intervalos de confianza del 95% (IC95%), se analizaron los resultados de sobrevida a las 24, 48, 96, 168, 336 y 504 h mediante el método Probit. El software utilizado para éste

proceso fue el Statgraphics Centurion XVII.I. Los valores de CLs 10, 50 y 90 y sus intervalos de confianza fueron graficados en función del tiempo de exposición en una curva de perfil de toxicidad (TOP). En aquellos casos donde se realizaron comparaciones entre los valores de CL obtenidos, se consideró significancia si los valores de los IC95% no se solaparon (Litchfield & Wilcoxon, 1949).

Para hallar la determinación del NOEC y LOEC de letalidad (NOEC_L y LOEC_L) se procesaron los datos mediante ANOVA de un factor. Las comparaciones entre tratamientos vs el control fueron realizadas mediante el test de Dunnet, considerando un $\alpha=0,05$. Se consideró el valor NOEC_L aquella concentración cuya incidencia de efectos no difirió significativamente respecto al control ($p>0,05$), mientras que el valor LOEC_L fue establecida como la mínima concentración cuya incidencia de efectos difirió significativamente del control ($p<0,05$). El software utilizado fue el GraphPad Prism 8.0.1.

Los resultados sobre la incidencia de malformaciones, deformidades y cambios etológicos (efectos subletales, SL), fueron analizados de igual manera utilizando contraste de Tukey para muestras desbalanceadas. Se consideró el valor NOEC_{SL} aquella concentración cuya incidencia de efectos no difirió significativamente respecto al control ($p>0,05$), mientras que el valor LOEC_{SL} fue establecida como la mínima concentración cuya incidencia de efectos difirió significativamente del control ($p<0,05$).

La actividad de la enzima BChE fue analizada mediante ANOVA de un factor. Los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron corroborados mediante los test de Shapiro-Wilk y Barlett, respectivamente. Las comparaciones del control vs los tratamientos fueron realizadas mediante el test de Dunnet. Se consideró como valor NOEC a la concentración más baja que no presentó diferencias significativas respecto al control ($p>0,05$) y como valor LOEC la concentración más baja significativamente distinta ($p<0,05$). Los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron corroborados de igual forma que lo detallado anteriormente. El software utilizado fue el GraphPad Prism 8.0.1.

La incidencia de MNs fue analizada mediante ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis ya que los supuestos de normalidad y homocedasticidad no se cumplieron. Sólo se realizaron comparaciones entre el control SA vs los tratamientos mediante el test de Dunnet. El criterio para la definición de las concentraciones NOEC y

LOEC fue el mismo que lo descrito anteriormente. Se consideró un $\alpha=0,05$. Todos estos análisis fueron realizados mediante el programa GraphPad Prism 8.0.1.

Capítulo 3

Evaluación de la toxicidad de un formulado comercial de mancozeb sobre el desarrollo embrio-larval, metamorfosis y gonadogénesis de *Rhinella arenarum*

3.1 Introducción

El fungicida mancozeb (MCZ) fue patentado en el año 1962 por Rohm y Hass (Gullino et al. 2010). Desde la introducción al mercado, su uso se ha consolidado alrededor del mundo debido a varios factores entre los que se encuentran su baja toxicidad para aves y mamíferos, su alta efectividad contra una gran variedad de infecciones fúngicas y su baja persistencia en el ambiente (Edwards, 1991; Holmes & Ruhman 2007).

El MCZ pertenece a la familia de los fungicidas conocidos como ditiocarbamatos, más específicamente al grupo de los etileno-bis-ditiocarbamatos entre los que se encuentran otros principios activos como el maneb y el zineb (Gullino et al. 2010). Se presenta como un polvo amarillento prácticamente sin olor cuya estructura química se compone por etileno bis ditiocarbamato de manganeso coordinado con iones de zinc (Figura 3.1) (USEPA, 2005). Presenta una baja solubilidad en agua (6 mg/L a 25°C y pH=7) y se hidroliza rápidamente en etilentiourea, etilenurea, y bisisotiocianato de etileno alcanzando una vida media promedio de alrededor de 48 h (Xu, 2000). Si bien como ingrediente activo la persistencia en ambiente es baja, existen estudios que demuestran que en formulados comerciales, el MCZ se mantiene prácticamente estable por alrededor de 30 días (Becerra et al. 2016). Acerca de su capacidad de acumulación en órganos y tejidos, el MCZ presenta un bajo coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow} < 1,34$ a 25°C) lo que es probable que ocurran altos niveles de bioacumulación (Xu, 2000; Thiruchelvam, 2005)

Se trata de un fungicida de contacto que se utiliza como prevención de infecciones por ascomicetos, oomicetos, basidiomicetos, entre otros hongos, en una gran variedad de cultivos de hojas verdes, legumbres, frutas, y plantas ornamentales (USEPA, 2005). Un aspecto importante de la aplicación y el mecanismo de acción del MCZ es que al tratarse de una sustancia que actúa por contacto, no penetra en los tejidos de la planta, sino que permanece en la superficie de las hojas. Por esta razón, el MCZ es un fungicida de prevención y no provee cura a las plantas que ya se encuentran infectadas (Gullino et al. 2010).

Su mecanismo de acción implica la inhibición de la germinación de las esporas de los hongos (Wong & Wilcox, 2001). El MCZ forma complejos con los metales que forman parte de la estructura proteica de enzimas importantes en el metabolismo fúngico

como por ejemplo, las implicadas en la producción del adenosín trifosfato (ATP) lo que causa su inhibición (Thiruchelvam, 2005).

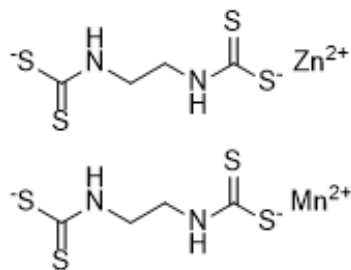


Figura 3.1 Estructura química del mancozeb (MCZ).

Respecto al método de aplicación en campo, el MCZ es principalmente utilizado en hojas, aunque puede también ser empleado para el tratamiento de semillas. Puede aplicarse mediante equipos de pulverización aéreos o terrestres. La frecuencia de aplicación depende del tipo de cultivo. Por ejemplo, para el maíz se puede aplicar hasta 15 veces por temporada con un intervalo entre aplicaciones de entre 4 a 14 días (USEPA, 2005).

En cuanto a valores de MCZ hallados en el ambiente, estudios realizados para determinar la concentración de sus residuos demostraron que en acueductos que sirven de agua de bebida para una población en el país de Venezuela, el fungicida se encuentra en una concentración de 1,27 µg/L (Flores-García et al. 2011). En muestras de agua de distintas localidades de Costa Rica también se encontraron concentraciones del metabolito etilentiourea en un rango de 0,15 a 0,25 µg/L (De Joode et al. 2016). En Argentina, no se cuenta con reportes de concentraciones ambientales. Por otro lado, la USEPA estima que la Concentración Esperada en el Ambiente (CEA) luego de las 96 h de la aplicación en campos de cultivo en aguas superficiales cercanas puede ser mucho mayor, oscilando entre los 0,013 a 0,05 mg/L mientras que, luego de 21 días, puede encontrarse entre 0,004 y 0,017 mg/L (USEPA, 20005).

El MCZ está clasificado como ligeramente tóxico (Clase III) y probable carcinógeno para humanos (Grupo B2) (USEPA, 2005). Si bien se ha reportado baja toxicidad en vertebrados superiores, es importante destacar que diversos estudios han demostrado que la exposición a este fungicida causa toxicidad aguda en una gran variedad de organismos, por ejemplo, invertebrados, peces de agua dulce, anfibios y humanos (Simakani et al. 2018; Carniel et al. 2019; Holmes & Ruhman 2007; Zhou et al. 2004).

Particularmente en anfibios, el MCZ provoca letalidad en distintas especies y los valores de CL50 resultan bastante diferentes entre organismos. Por ejemplo, para embriones de *Rana clamitans* el valor de CL50_{96 h} es de 2,21 mg/L (Harris et al. 1998), mientras que en el caso de *Bufo americanus* es 1,43 mg/L y para *Rana pipiens* alcanza el valor de 0,20 mg/L (Harris et al. 2000). En cuanto a efectos subletales, se ha reportado que la exposición aguda de embriones de *R. clamitans* a 0,078 mg/L causa incurvaciones laterales y dorsales de la aleta, hidropesía y desplazamiento de las branquias (Harris et al. 1998). En *B. americanus* se registró malformaciones esqueléticas en embriones en estadio de circulación branquial (E.20) luego de ser expuestos durante 96 h a una concentración de 0,08 mg/L (Harris et al. 2000). En larvas de *R. pipiens* el MCZ causó una disminución de la tasa de crecimiento en una concentración de 16 µg/L (Shenoy et al. 2009).

El MCZ, es un compuesto que, dada su estructura, puede causar alteración en la síntesis de hormonas sexuales, a la vez que interfiere con la señalización de los receptores de andrógenos y estrógenos (Skalny et al. 2021). En conjunto, puede dar lugar al desarrollo de disfunciones reproductivas tanto en machos como en hembras. La USEPA también ha reportado efectos negativos sobre los órganos reproductivos por exposición al MCZ (USEPA, 2005). Un estudio realizado en células de la granulosa de ratones y humanos expuestas a concentraciones bajas de MCZ (0,001-1 µg/L) demostró que causa cambios en la morfología y en el patrón de migración (Paro et al. 2012). También se demostró una disminución de la cantidad de ciclos estrales y calidad de los folículos en ratas tratadas (Mahadevaswami et al. 2000; Baligar & Kaliwal, 2004). En machos, la exposición al mancozeb provocó una disminución del peso de los testículos, así como una disminución del recuento espermático (Khan & Sinha, 1996; Ksheerasagar & Kaliwal, 2003).

En anfibios, la exposición a compuestos xeno-estrogénicos como el MCZ, puede afectar el desarrollo y crecimiento de los embriones a lo largo de su ciclo de vida (Sana et al. 2015). La gonadogénesis también puede verse afectado por la presencia de contaminantes. Por esta razón, estudiar alteraciones morfológicas en el desarrollo gonadal, ya sea a nivel macro o microscópico, así como también desviaciones de la proporción de sexos 1:1 debido a la exposición por xenobióticos es importante para entender en varios niveles las consecuencias de la contaminación por agroquímicos.

La exposición al MCZ no sólo causa efectos letales, malformaciones embrionarias y deformidades en larvas, sino que también puede ocasionar modificaciones de fisiología de los organismos. Respecto a los efectos neurotóxicos, los principales antecedentes se avocan a la evaluación de la salud humana y la exposición laboral por lo que la información en otras especies es escasa. Sin embargo, existe evidencia de efectos neurotóxicos de este fungicida en el pez *Oncorhynchus kisutch* donde se ha demostrado que tiene la capacidad de afectar la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en cerebro y bulbos olfativos (Jarrard et al. 2004).

En lo que respecta a la evaluación de la toxicidad de una sustancia es interesante estudiar también diseños experimentales poco utilizados, como la exposición por pulsos de 24 h, condición que podría simular accidentes o vertidos de plaguicidas con concentraciones más elevadas durante periodos cortos de exposición (Aronzon et al. 2011; Svartz et al. 2014). Además, es destacable la importancia de incluir en este análisis, diferentes etapas de desarrollo para evaluar la sensibilidad dependiente del estadio con fines de dirigir con mayor eficiencia acciones para la conservación de las especies (Pérez Coll & Herkovits, 1990; Pérez Coll et al. 2017).

En cuanto al análisis del efecto a nivel genómico del MCZ en organismos no humanos, el modelo biológico de preferencia son los peces. En *Clarias batrachus*, se observó un incremento de la frecuencia de micronúcleos (MNs) en eritrocitos luego de 48 h de exposición a 2,2 mg/L de MCZ (v & Singh, 2014). Sin embargo, en cuanto al relevamiento en anfibios, es notoria la escasez de estudios.

A pesar de las evidencias sobre el riesgo de este fungicida en numerosas especies, el MCZ se comercializa sin restricciones en todo el mundo salvo algunas excepciones. Recientemente la Unión Europea ha retirado la aprobación para el uso y la comercialización de productos fitosanitarios que contengan MCZ (EU Comission, 2020). También, en Canadá, se ha limitado su uso sólo para dispersión foliar en cultivo de papa debido a riesgos inaceptables para la salud humana (PMRA, 2018).

A pesar de estas recientes restricciones, en nuestro país parece lejana la posibilidad de regulación de su uso. Sólo en los últimos 14 años se ha importado una cantidad promedio de 1.893 toneladas por año con un pico de 2.696 en el 2016, lo que lo convierte en uno de los fungicidas más utilizados en el país (SENASA, 2020). Entre los formulados comerciales que se encuentran disponibles en nuestro territorio se halla el

Candil ® (80% ingrediente activo) de la empresa Agri Star S.A. Se trata de un producto de fácil adquisición debido a su gran disponibilidad en el mercado local y costo moderado. De acuerdo a su marbete, el Candil® exhibe persistencia y acción residual y puede ser utilizado en mezclas con fertilizantes y otros plaguicidas. Las dosis de aplicación abarcan un amplio rango de concentraciones entre 1,50 g/L para cítricos, y 3,5 g/L para arroz, aunque la dosis para la mayoría de los cultivos es de 2 g/L (hojas verdes, pimientos, cebolla, frutales, etc.).

Teniendo en cuenta que el MCZ persiste en el mercado hace aproximadamente 60 años, que la información existente sobre la toxicidad del MCZ en anfibios es limitada y la gran presencia del fungicida en el mercado fitosanitario argentino, es sumamente relevante estudiar la susceptibilidad de nuestras especies de anfibios durante su desarrollo embrio-larval y determinar si esta sustancia constituye o no un riesgo para las poblaciones autóctonas.

3.2 *Objetivos e hipótesis*

3.2.1 *Objetivos generales*

En base a las inquietudes anteriormente planteadas se propone:

Caracterizar la toxicidad de un formulado comercial a base del principio activo mancozeb (Candil®, 80% ingrediente activo) en el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*, evaluando los efectos letales, malformaciones embrionarias y deformidades en larvas, modificaciones en los tiempos de desarrollo, alteraciones en la respuesta de biomarcadores de neuroprotección y genotoxicidad, así como también, efectos a nivel de desarrollo metamórfico y gonadal mediante bioensayos estandarizados.

3.2.2 *Objetivos específicos*

- Obtener el perfil de toxicidad del Candil ® (curvas TOP) para embriones y larvas de *R. arenarum* en base al cálculo de las concentraciones letales (CLs) 10, 50 y 90 para períodos de exposición agudos (48-96 h), subcrónico (168 h) y crónicos (336-504 h)

- Evaluar los efectos teratogénicos, índice teratogénico, y alteraciones en el comportamiento de embriones de *R. arenarum* por exposición continua y por pulsos de 24 h.
- Evaluar los efectos en el desarrollo, deformidades y alteraciones en el comportamiento de larvas de *R. arenarum* por exposición continua y por pulsos de 24 h.
- Realizar una evaluación del riesgo ecológico mediante la estimación del coeficiente de riesgo (RQ) para períodos de exposición aguda y crónica.
- Evaluar los efectos sobre la metamorfosis y la condición corporal de los individuos.
- Evaluar los efectos sobre el desarrollo gonadal de individuos de *R. arenarum*.
- Determinar el potencial del formulado comercial de modificar las respuestas de biomarcadores de neuroprotección y genotoxicidad.

3.2.3 Hipótesis

- La exposición a Candil ® produce letalidad en embriones y larvas de *R. arenarum* de forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.
- El MCZ produce malformaciones durante el desarrollo embrionario (hidropesía, retraso en el desarrollo, incurvaciones en el eje de la cola, cambios en el comportamiento etc.) y un IT >1,5.
- La magnitud de los efectos letales y subletales por exposición al MCZ dependen del estadio de desarrollo en el que se encuentre el individuo.
- El MCZ afecta el tiempo en que los individuos de *R. arenarum* alcanzan la metamorfosis.
- El MCZ afecta la condición corporal de los individuos expuestos de manera concentración-dependiente.
- El MCZ causa inhibición de la enzima butirilcolinesterasa.
- La exposición al MCZ causa un incremento de células con micronúcleos en larvas expuestas.
- La presencia de MCZ en los cuerpos acuáticos constituye un potencial riesgo ecológico para las poblaciones de *R. arenarum*.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Preparación de las soluciones de exposición

Para la realización de los distintos experimentos, se utilizó un formulado comercial de MCZ, Candil® (80% principio activo) comercializado por Agri Star S.A. La concentración de principio activo en el formulado fue verificada mediante cromatografía gaseosa GC-MSD (cromatógrafo marca Shimadzu, modelo TQ-8040) con un límite de detección de 0,005 µg/L y un límite de cuantificación de 0,01 µg/L hallándose una diferencia no superior al 5,6% con la pureza nominal.

Para la preparación de las soluciones a evaluar, primeramente, se realizó una solución madre de concentración 1000 mg/L de ingrediente activo (i.a) mediante dilución del formulado sólido en solución ANFITOX (SA). A partir de esta solución se realizaron las diluciones para preparar las soluciones de ensayo. Las concentraciones utilizadas a lo largo del presente capítulo se hayan expresadas en mg/L (i.a). Todas las soluciones de uso fueron preparadas inmediatamente antes de su utilización.

3.3.2 Bioensayos de toxicidad

Se realizaron 6 tipos de bioensayos:

1) Exposición continua de embriones y larvas:

La metodología general del ensayo se realizó de acuerdo a la *sección 2.3.2* del Capítulo 2. Los estadios evaluados fueron embriones en estadio 2-blastómeros (E.3) y larvas en opérculo completo (E.25). Se seleccionaron 6 concentraciones: 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5 y 5 mg/L (i.a). Parte del rango fue seleccionado teniendo en cuenta las CEAs estimadas por la USEPA en aguas superficiales 21 días post-aplicación que oscilan entre 0,007 y 0,016 mg/L con un pico entre 0,047 y 0,021 mg/L (USEPA, 2005). Las concentraciones por sobre este límite fueron elegidas para simular condiciones posibles en cuerpos de agua poco profundos como consecuencia de incorrecta aplicación del pesticida, derrames o daños en la maquinaria dónde, a su vez, ésta especie puede reproducirse y desarrollarse. Los individuos pertenecientes al grupo control fueron mantenidos en SA.

Se registró mortalidad y presencia de malformaciones, alteraciones en el desarrollo, cambios en el comportamiento y tamaño corporal (longitud boca-cola)

de los individuos a las 168 h de exposición. Para embriones se estimó el IT en este tiempo.

Para ambos estadios de desarrollo se calculó el RQ por exposición aguda y crónica.

2) Exposición al MCZ por pulso de 24 h:

Para este ensayo, se siguió la metodología descrita en la *sección 2.3.2* del Capítulo 2 con ciertas modificaciones. En primer lugar, los estadios evaluados fueron: 2-blastómeros (E.3), surco neural (E.14), respuesta muscular (E.18) y opérculo completo (E.25). La exposición al MCZ se realizó durante un período de 24 h. Las concentraciones evaluadas fueron 0,1, 0,5, 1, 5 y 10 mg/L (i.a). Simultáneamente los individuos control fueron mantenidos en SA. Al finalizar el período de exposición de 24 h, los individuos de cada placa fueron removidos del medio contaminado, lavados profusamente con SA para asegurar la eliminación completa del plaguicida y puestos nuevamente en una caja de Petri conteniendo 40 mL de SA.

Se calcularon los valores de CL50 para los períodos de post-exposición aguda (48-96 h), subcrónico (168 h) y crónico (336-504 h). También se registró mortalidad y presencia de malformaciones, alteraciones en el desarrollo, cambios en el comportamiento y tamaño corporal (longitud boca-cola) de los individuos a las 168 h post-exposición. Para embriones se estimó el IT en este tiempo.

3) Exposición continua para la evaluación de la metamorfosis:

Para el estudio de los efectos en la metamorfosis, en términos de tiempo hasta completar la metamorfosis, condición corporal y desarrollo gonadal, se realizó una exposición continua específica.

Para ello, se expusieron 5 larvas en E.25 en cajas de Petri de 15 cm de diámetro cubiertas. En ellas, se colocó 150 mL de solución a evaluar. Los controles negativos fueron mantenidos en SA. El número de réplicas por tratamiento fue de 10. La exposición se realizó de manera continua hasta completar la metamorfosis.

En cuanto al análisis del tiempo de desarrollo metamórfico se registraron tres momentos: el tiempo promedio en el que el 80% de los individuos alcanzó el

estadio de emergencia de miembros posteriores (E.28), tiempo en el que el 100% alcanzó el estadio de emergencia de miembros anteriores (E.31) y el clímax metamórfico (E.35).

Una vez los individuos alcanzaron la metamorfosis, se registró el peso y la longitud boca-cola. Luego, fueron colocados en grupos de a 5 en frascos de vidrio de 1 L de capacidad, conteniendo 10 mL de SA. Los frascos fueron cubiertos con una tela de tul para asegurar la correcta oxigenación y se dispusieron levemente inclinados de manera de que la SA se acumulara en un costado y funcionara de “pileta” donde los individuos podían humedecerse pero no sumergirse por completo (Figura 3.2). Como los individuos completaron la metamorfosis en distintos días, los pertenecientes a un mismo frasco pudieron tener hasta 5 días de diferencia en su desarrollo. Los juveniles, fueron alimentados diariamente con grillos recién eclosionados de la especie *Acheta domesticus* (~3 mm).



Figura 3.2 Esquematzación del frasco para el mantenimiento de los individuos metamórficos.

Con los datos de peso y longitud, se realizó un índice de condición corporal (ICC) basado en la ecuación de la recta de regresión lineal entre el logaritmo del peso y el logaritmo de la longitud boca-cola de los individuos controles. A partir de esta regresión se estimó el ICC para cada individuo entendido como la diferencia entre el peso ideal estimado y el peso real medido. Aquellos individuos con un índice positivo presentan mejor condición corporal que los controles, mientras que un índice negativo indica una peor condición corporal (Schulte-Hostedde et al. 2005).

Respecto al estudio gonadal, se extrajeron las gónadas en complejo con el riñón de los individuos post-metamórficos con distinto rango de tiempo de

desarrollo mediante disección abdominal bajo lupa (Zeiss Stemi DV4) (Figura 3.3). De ser posible, se determinó el sexo de los individuos al estado fresco y se calculó el promedio de individuos machos y hembras por tratamiento relativizado al total de ejemplares.

Para el análisis histológico, el complejo gónada-riñón fue fijado en Bouin durante 48 hs. Luego, se procedió a la deshidratación de los órganos mediante pasaje por alcohol en concentraciones crecientes por un lapso de 30 min, comenzando por alcohol 70% y finalizando con alcohol 100%. A continuación, se realizó un pasaje por una mezcla equitativa de xilol y alcohol 100% durante 30 min. Luego, se realizaron 2 pasajes en xilol puro de 15 minutos cada uno. Por último, se introdujo a las muestras en una mezcla equitativa de xilol y parafina. Para la inmersión de las muestras en parafina, se realizaron 3 inmersiones de 1 h de duración a 60°C. Se realizaron cortes transversales seriados de 7µm de grosor utilizando un micrótopo de rotación (Leica RM2125RTS). Los preparados fueron teñidos mediante la técnica de hematoxilina-eosina y observados bajo microscopio óptico (Leica DM2700 P).

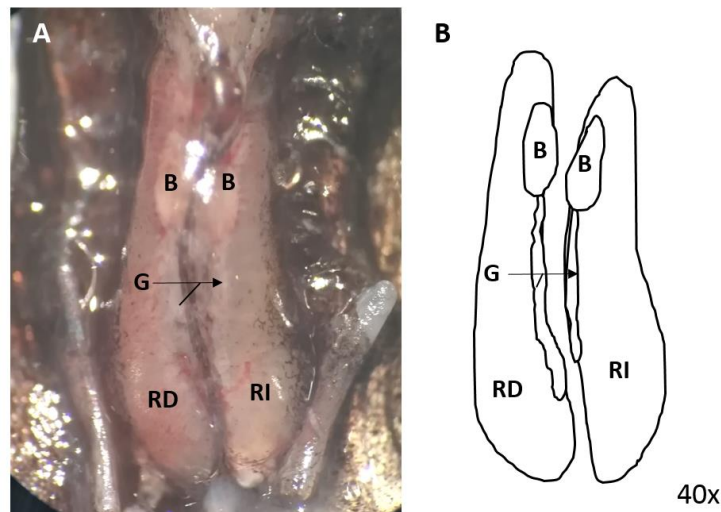


Figura 3.3 Vista de (A) fotografía y (B) esquema de los riñones y gónadas indiferenciadas dentro de la cavidad abdominal de un individuo de *Rhinella arenarum* en E.35, 30 días post-metamorfosis. **B:** órgano de Bidder, **G:** gónada, **RD:** riñón derecho, **RI:** riñón izquierdo.

4) Exposición aguda para la evaluación del biomarcador enzimático neuroprotector:

La exposición se realizó de acuerdo a la *sección 2.3.3* del Capítulo 2. Se evaluaron las siguientes concentraciones subletales: 0,0025, 0,01 y 0,05 mg/L. Estos valores se encuentran en el rango de las Concentraciones Esperadas en el Ambiente (CEA) y por debajo del mismo.

5) Exposición aguda para la evaluación del biomarcador de genotoxicidad:

El protocolo experimental se desarrolló de acuerdo a la *sección 2.3.4* del Capítulo 2. Se evaluaron las siguientes concentraciones subletales: 0,0025, 0,01 y 0,05 mg/L. Estos valores se encuentran en el rango de las CEAs y por debajo del mismo.

3.4 Resultados

3.4.1 Efectos letales

3.4.1.1 Exposición continua

La Figura 3.4 A muestra la sobrevida de los embriones registrada ante la exposición al MCZ. No se registró mortalidad durante las primeras 24 h, incluso en la concentración más alta de 5 mg/L. Sin embargo, a las 48 h se registró 100% de mortalidad para dicha concentración. Analizando la tendencia se observa que la sobrevida de los tratamientos disminuye gradualmente en forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.

A las 336 h, los embriones expuestos hasta 0,05 mg/L mostraron similar sobrevida que el control negativo SA. Sin embargo, aquellos expuestos a 0,1 mg/L, 0,5 mg/L y 1 mg/L mostraron una disminución significativa de la sobrevida respecto al control SA ($p < 0,005$). A las 504 h, los embriones expuestos a concentraciones partir de 0,05 mg/L, mostraron una sobrevida significativamente menor respecto al control ($p < 0,005$). A partir de estos resultados, se determinó que el valor $NOEC_L$ para embriones a las 504 h fue de 0,01 mg/L.

Por otro lado, a las 96 h sólo el $10,00 \pm 1,00\%$ ($p < 0,005$) de las larvas expuestas a 5 mg/L sobrevivieron. Desde las 48 h hasta las 336 h, la sobrevida se mantuvo relativamente constante para individuos expuestos hasta 2,5 mg/L ($p > 0,05$). Sin embargo, para tiempos crónicos de exposición (504 h), todas las exposiciones mayores a 0,05 mg/L

mostraron una disminución significativa de la sobrevivencia ($p < 0,005$) (Figura 3.4 B). Entonces, a las 504 h el valor NOEC_L estimado para larvas fue de 0,05 mg/L.

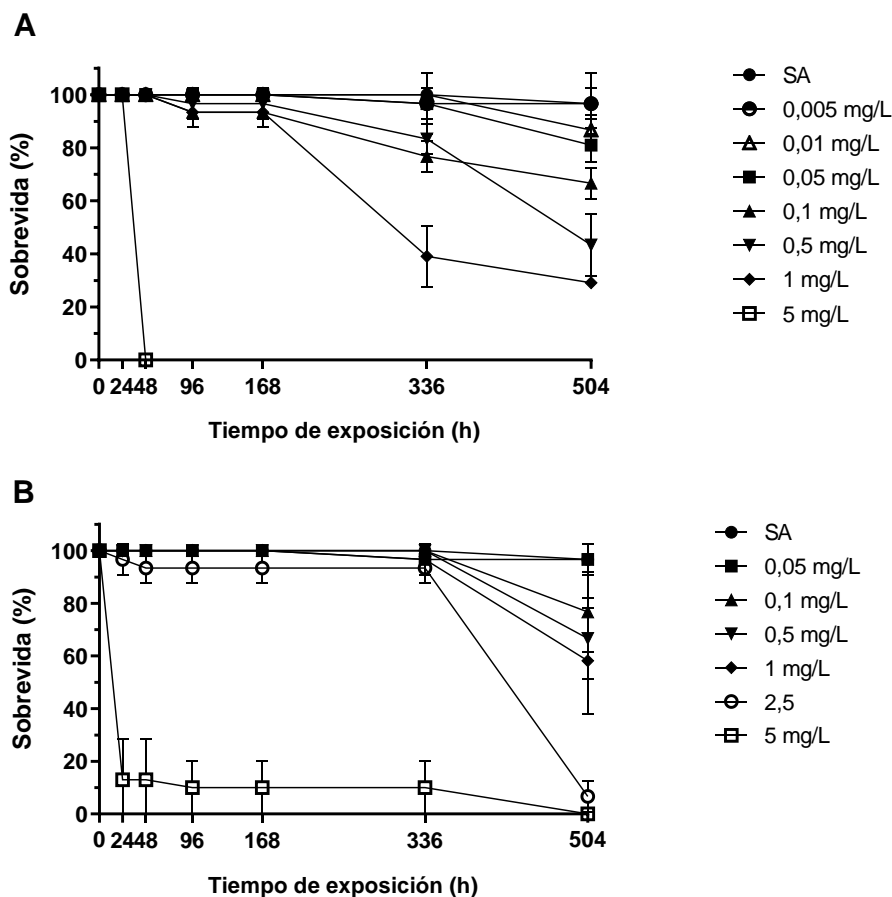


Figura 3.4 Porcentajes de sobrevivencia (%) de *R. arenarum* expuestos a mancozeb a partir de los estadios de (A) embriones en 2-blastómeros (E.3) y (B) opérculo completo (E.25). Las barras de error indican \pm DE.

En la Figura 3.5 A se representan las curvas TOP basadas en las CL10, 50 y 90 para los distintos tiempos de exposición para embriones. A las 48 h, las CL10, 50 y 90 fueron 1,95 mg/L, 3,97 mg/L y 6 mg/L, respectivamente. A las 96 h, la toxicidad se incrementó abruptamente, alcanzando valores de CL10 = 1,04 mg/L, CL50 = 2,29 mg/L y CL90 = 3,65 mg/L. Los valores de toxicidad a las 168 h, no difirieron de los valores obtenidos a los 96 h ($p < 0,05$).

Luego de las 168 h, coincidiendo con la finalización de la etapa embrionaria y el comienzo del periodo larval, la toxicidad incrementó en ambos tiempos crónicos de

Capítulo 3: Evaluación de un formulado comercial de mancozeb sobre el desarrollo embrionario, metamorfosis y gonadogénesis de *Rhinella arenarum*

exposición (CL10_{336 h} = 0,21 mg/L, CL50_{336 h} = 0,90 mg/L, CL90_{336 h} = 1,59 mg/L, CL10_{504 h} = 0,04 mg/L, CL50_{504 h} = 0,65 mg/L y CL90_{504 h} = 1,26 mg/L).

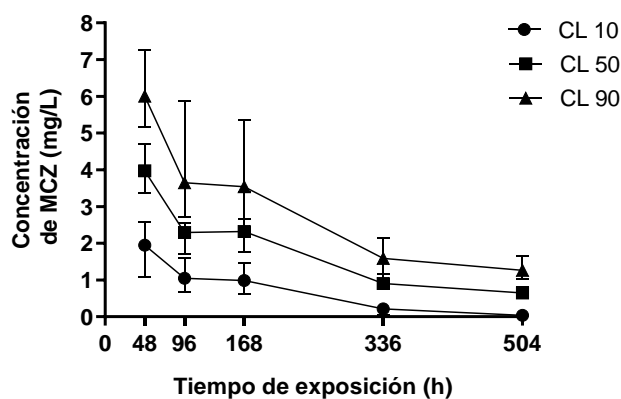
Comparando las CL50 al inicio del experimento (48 h) con la obtenida a las 504 h, la toxicidad del plaguicida se sextuplicó ($p < 0,05$).

El perfil de toxicidad del MCZ para larvas en estadio de opérculo completo, está representado en la Figura 3.5 B. Los valores de CL10, 50 y 90 a las 48 h fueron 2,65 mg/L, 3,71 mg/L y 5,20 mg/L respectivamente, y se mantuvieron constantes hasta los 336 h. A las 504 h, hubo un aumento abrupto de la toxicidad, alcanzándose valores mucho menores de CL (CL10 = 0,57 mg/L; CL50 = 1,12 mg/L; CL90 = 2,18 mg/L).

Comparando las CL50_{48 h} con la CL50_{504 h}, la toxicidad del plaguicida se triplicó ($p < 0,05$).

Si se observan los efectos letales para ambos estadios, la toxicidad del fungicida fue similar solo a las 48 h y luego es notable el aumento de la sensibilidad del desarrollo embrionario el cual fue más susceptible al MCZ que los individuos en estadio larval.

A



B

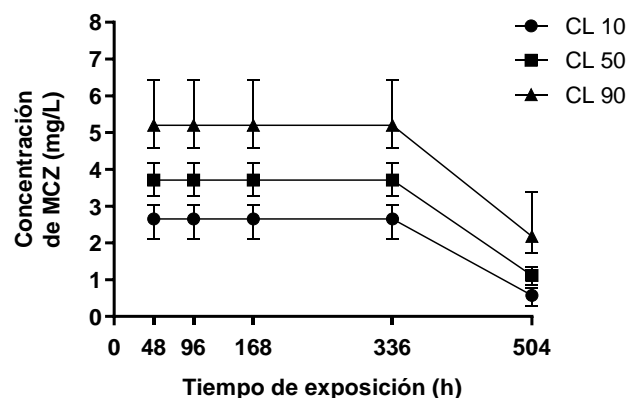


Figura 3.5 Perfil de toxicidad de individuos de *R. arenarum* expuestos a mancozeb a partir de los estadios de (A) embriones en 2-blastómeros (E.3) y (B) opérculo completo (E.25). Las barras de error indican IC 95%.

3.4.1.2 Exposición por pulso de 24 h

Los resultados mostraron que, tras exposiciones por pulsos de 24 horas, el MCZ causó efectos perjudiciales que continuaron incluso después de interrumpir la exposición al plaguicida.

La Figura 3.6 A muestra la sobrevida para individuos expuestos durante el estadio de 2-blastómeros (E.3). Durante las primeras 48 h no se registró una disminución de la sobrevida de los embriones. Sin embargo, a las 96 h post-exposición, los individuos que fueron expuestos a 5 y 10 mg/L no sobrevivieron. Asimismo, se observó una sobrevida significativamente menor desde 0,1mg/L cuyos valores se mantuvieron constantes hasta el fin del experimento ($LOEC_{L\ 96h-504h}=0,1\text{ mg/L}$, $p<0,05$). Los individuos expuestos a concentraciones de 0,5 y 1 mostraron una sobrevida similar en todos los tiempos post-exposición.

El caso de embriones expuestos a partir de surco neural (E.14), se encuentra representado en la Figura 3.6 B. En este caso, no se observa una diferencia significativa en la sobrevida respecto al control para todas las concentraciones iguales o menores a 0,5 mg/L hasta las 168 h ($LOEC_{L\ 24-168h}=1\text{ mg/L}$, $p<0,05$). En cambio, se registró una disminución de la sobrevida desde las 24 h para las concentraciones de 5 y 10 mg/L siendo para ésta última de 43%. A las 48 h el valor de sobrevida para 5 mg/L y 10 mg/L fue de 60 y apenas del 16%, respectivamente, y se mantuvo aproximadamente constante en adelante. Para 5 mg/L se observa a las 48 h post-exposición una disminución de la sobrevida respecto al control ($p<0,05$). Conforme se prolonga el tiempo post-exposición se observó un mayor efecto tóxico. La sobrevida a las 336 y 504 h post-exposición no difiere entre sí siendo el valor $LOEC_{L\ 336-504h}=0,5\text{ mg/L}$ ($p<0,05$).

Respecto a los individuos expuestos desde respuesta muscular (E.18) (Figura 3.6 C), los individuos expuestos a concentraciones menores o iguales a 1 mg/L mostraron una sobrevida similar al control hasta las 336 h post-exposición ($LOEC_{L\ 24-336h}=5\text{ mg/L}$, $p>0,05$). A las 24 h, los individuos expuestos a 10 mg/L no sobrevivieron. A las 504 h post-exposición el incremento de la toxicidad se refleja en un valor $LOEC_{L\ 504h}=0,1\text{ mg/L}$ ($p<0,05$).

Por último, la sobrevida de los individuos expuestos desde estadio de opérculo completo (E.25) se muestra en la Figura 3.6 D. Hasta las 168 h la sobrevida de los individuos expuestos a concentraciones iguales o menores a 1 mg/L no difirió del control (LOEC_{L 24-168h}=5 mg/L) ($p>0,05$). Sin embargo, las concentraciones más altas mostraron una disminución de la sobrevida a las 24 h, registrándose un 100% de mortalidad en el caso de 10 mg/L. A partir de las 48 h post-exposición, la concentración de 5 mg/L mostró una disminución significativa de la sobrevida respecto al control ($p<0,05$).

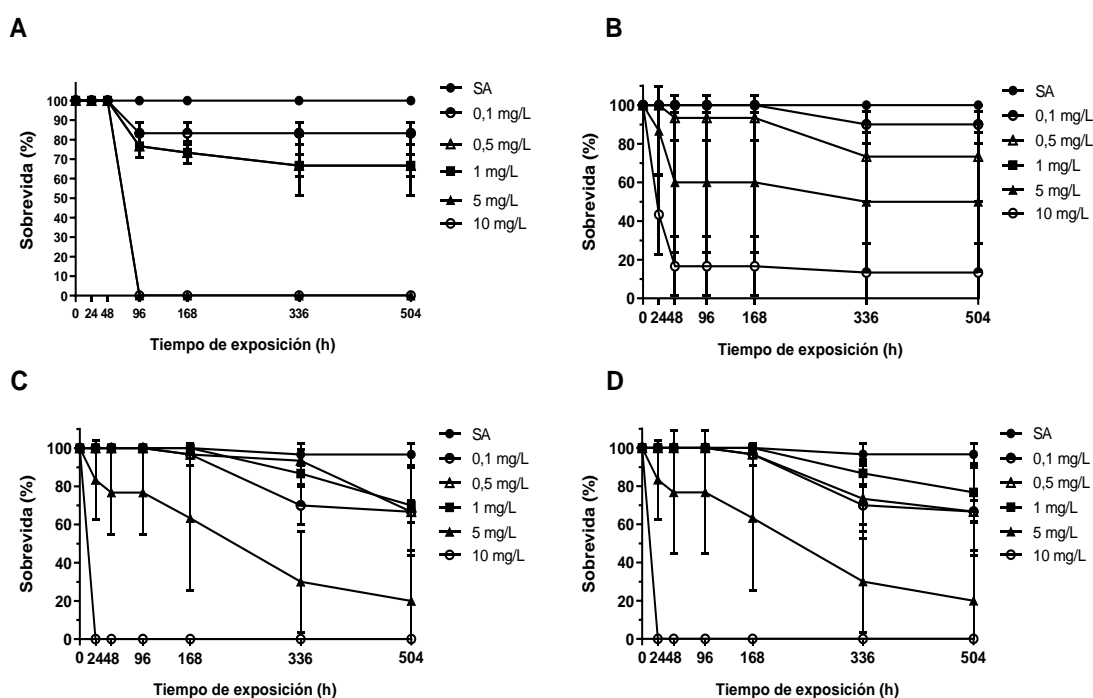


Figura 3.6 Porcentajes de sobrevida (%) de *R. arenarum* expuestos a un pulso de mancozeb por 24 h a partir de los estadios de (A) embriones en 2-blastómeros (E.3) (B) surco neural (E.14), (C) respuesta muscular (E.18) y (D) opérculo completo (E.25). Las barras de error indican \pm DE.

La Figura 3.7 resume los valores de las CL50s calculados para los 4 estadios evaluados. A las 48 h, no fue posible calcular la CL50 para los embriones expuestos desde E.3 ya que no se registró mortalidad para este tiempo post-exposición. Para E.14 y E.18, las CL50 fueron muy similares entre sí ($p>0,05$) (CL50= 6,64 mg/L y CL50= 6,33 mg/L, respectivamente) mientras que, los embriones expuestos durante E.25 fueron más susceptibles (CL50= 4,25 mg/L) ($p<0,05$). El valor de CL50 para éstos últimos se mantuvo aproximadamente constante hasta las 336 h post-exposición.

A las 96 h post-exposición a MCZ, el valor más bajo de CL50 se obtuvo para E.3 lo que indica que, para este tiempo, es el período más sensible (CL50=2,25 mg/L) (Figura 3.7). Nuevamente la toxicidad para E.14 y E.18 fue similar ($p>0,05$). Sin embargo, los embriones expuestos desde E.18 comenzaron a mostrar un aumento de la sensibilidad. Los embriones expuestos desde la fase de opérculo completo mostraron una mayor susceptibilidad que los E.14 y E.18 pero menor que E.3 ($p<0,05$).

A las 168 h post-exposición, las CL50 obtenidas fueron muy similares a las del tiempo anterior. E.3 continuó siendo el período de desarrollo embrionario más sensible (CL50=2,06 mg/L). Nuevamente, la toxicidad entre E.14 y E.18 no difirió, pero se mantuvo la tendencia observada en el punto anterior a la disminución de los valores de CL50 para respuesta muscular (CL50=6,36 mg/L y CL50=5,93 mg/L, respectivamente). En el caso del E.25, el valor CL50 no difirió del de E.18 (CL50=4,25 mg/L) ($p>0,05$).

A medida se prolongó el tiempo post-exposición, se observó un aumento de la toxicidad de MCZ para todos los estadios evaluados. A las 336 h se registró un aumento de la toxicidad modificándose la susceptibilidad estadio-dependiente observada anteriormente. El valor de CL50 de E.3, no difirió de E.18, ni la de este último con el valor de E.25 ($p>0,05$). Esta tendencia continuó hacia el final del bioensayo observándose a las 504 h post-exposición una toxicidad similar entre los 3 estadios ($p>0,05$). En cambio, los individuos expuestos desde E.14 fueron los únicos que mostraron una marcada diferencia en la respuesta y menor sensibilidad, reflejada en que su CL50 fue mayor y aproximadamente constante desde el inicio de la exposición (CL50=5,59 mg/L) ($p<0,05$).

En síntesis, el E.3 fue el estadio más sensible hasta el periodo crónico (336 h); pero después (336-504 h), el E.18 y el E.25 mostraron un incremento de su susceptibilidad hasta alcanzar valores similares de toxicidad. Por el contrario, E.14 mostró la menor sensibilidad durante todo el periodo post-exposición. Por otra parte, el E.18 fue el período embrionario en que el incremento de la toxicidad fue más marcado (Figura 3.7).

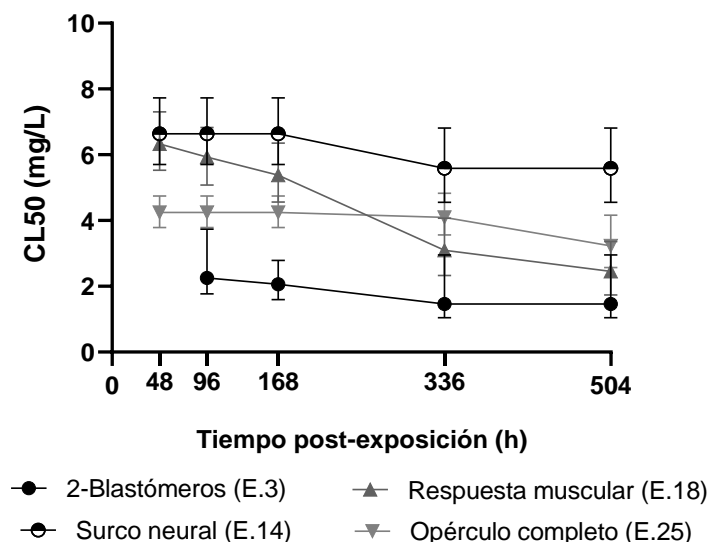


Figura 3.7 Perfil de toxicidad de individuos de *R. arenarum* expuestos a mancozeb a partir de los estadios de (A) embriones en 2-blastómeros (E.3) (B) surco neural (E.14), (C) respuesta muscular (E.18) y (D) opérculo completo (E.25). Las barras de error indican \pm DE.

3.4.2 Alteraciones morfológicas y etológicas

3.4.2.1 Exposición continua

A las 168 h, los embriones que fueron expuestos a concentraciones menores a 0,1 mg/L, no mostraron presencia de malformaciones por esa razón no se muestran en la Tabla.1. Por otro lado, los embriones expuestos a 0,1 mg/L, exhibieron incurvaciones del eje de la cola (Figura 3.8 B) y nado errático en sentido circular (Tabla 3.1). La incidencia de malformaciones en cuanto a tipo y frecuencia, aumentó en los embriones expuestos a 0,5 mg/L. Algunos de ellos presentaron malformaciones severas como microcefalia. Todos los individuos expuestos presentaron hidropesía mientras que la mayoría alcanzó un tamaño corporal reducido, incurvaciones en el eje de la cola y nado errático con sentido circular (Tabla 3.1; Figura 3.8 C). Todos los individuos expuestos a 1 y 5 mg/L presentaron retraso en el desarrollo, reducción del tamaño del cuerpo, hidropesía, incurvaciones en el eje de la cola, y movimientos débiles (Tabla 3.1; Figura 3.8 D, E y F). Asimismo, el 100% de los individuos expuestos a 5 mg/L, también presentaron malformaciones severas como microcefalia y ausencia total de movimiento (Tabla 3.1; Figura 3.8 E y F).

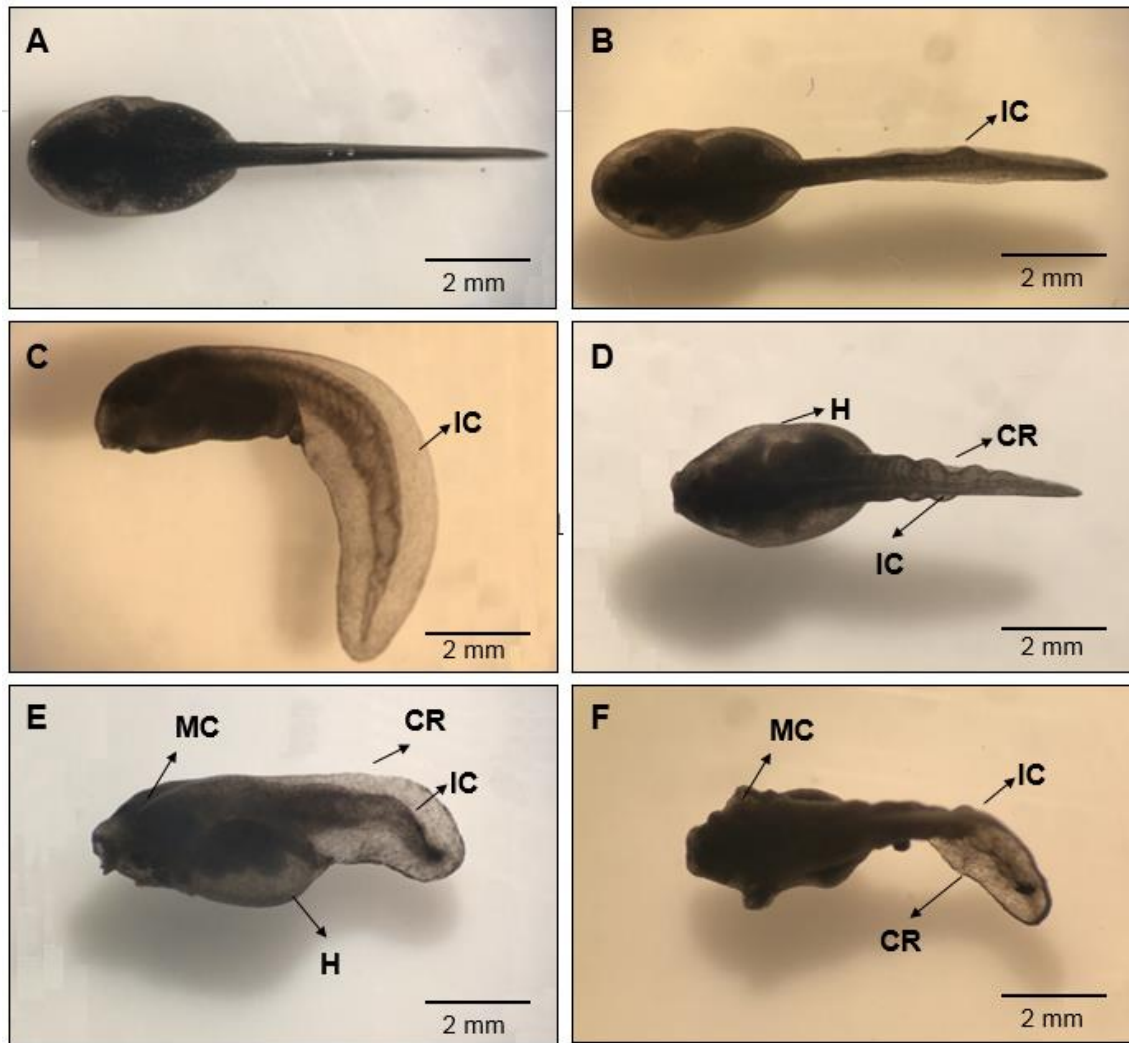


Figura 3.8 Imágenes de embriones expuestos a mancozeb durante 168 h. (A) control; (B) individuo expuesto a 0,1 mg/L con incurvaciones en la cola (IC); (C) individuo expuesto a 0,5 mg/L con IC; (D) individuo expuesto a 1 mg/L con hidropesía (H), cola reducida (CR) e IC; (E) y (F) individuos expuestos a 5 mg/L con H, CR, IC y microcefalia (MC).

Tabla 3.1 Promedio de los porcentajes de individuos (%) expuestos durante 168 h al mancozeb desde embriones tempranos con presencia de malformaciones y cambios etológicos \pm DE. (*) Indica diferencias significativas respecto al control SA.

Efectos subletales (%)	Concentraciones (mg/L)				
	SA	0,1	0,5	1	5
Microcefalia	-	-	-	-	100,00 \pm 0,00*
Retraso en el desarrollo	-	-	-	100,00 \pm 0,00*	100,00 \pm 0,00*
Tamaño corporal reducido	-	-	93,33 \pm 11,55*	100,00 \pm 0,00*	100,00 \pm 0,00*
Hidropesía	-	-	100,00 \pm 0,00*	100,00 \pm 0,00*	100,00 \pm 0,00*
Incurvaciones en el eje de la cola	-	73,33 \pm 5,28*	96,67 \pm 5,77*	100,00 \pm 0,00*	100,00 \pm 0,00*
Nado Circular	-	30,00 \pm 10,00*	76,67 \pm 11,55*	40,40 \pm 5,71*	-
Movimientos débiles	-	-	-	100,00 \pm 0,00*	-
Ausencia de movimientos	-	-	-	-	100,00 \pm 0,00*

(*) Indica diferencias significativas con el control mediante Test de Tukey para muestras desbalanceadas ($p < 0,05$)

En relación al tamaño corporal, los individuos expuestos desde embriones a 0,1 mg/L, presentaron a las 168 h una reducción significativa del tamaño corporal, expresado como la distancia entre la boca y la punta de la cola, respecto del control (Figura 3.9; $p < 0,005$). Por otro lado, los individuos expuestos a 0,05 mg MCZ/L, no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$). El índice teratogénico (IT) calculado para las 168 h fue 21,09 ($CL_{50}/CE_{50} = 2,32 \text{ mg/L}/0,11 \text{ mg/L}$), valor que evidencia el alto potencial teratogénico del MCZ (ASTM 1993).

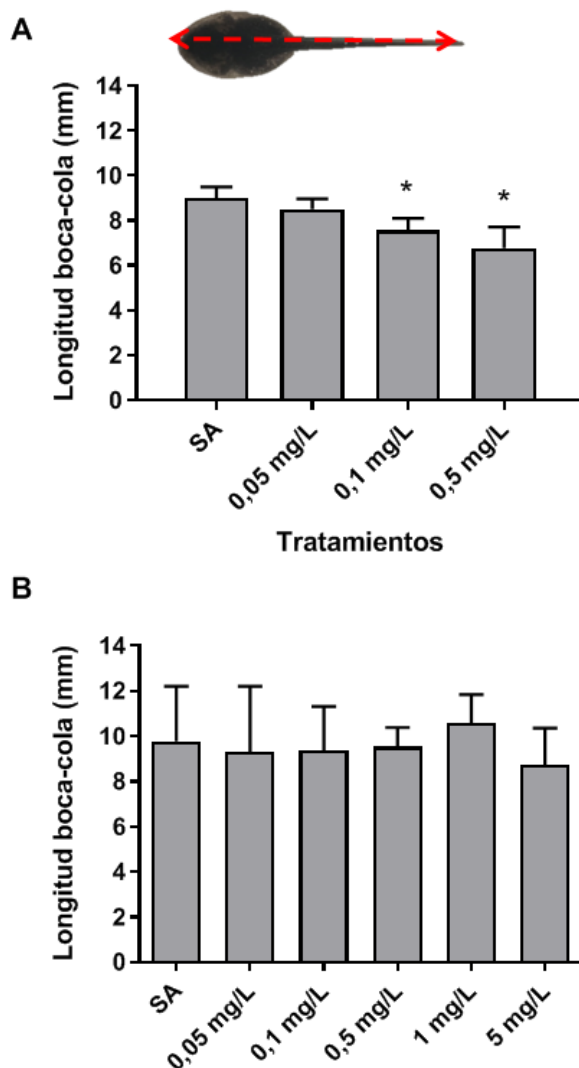


Figura 3.9 Longitud boca-cola (mm) de individuos expuestos desde (A) embriones en 2-blastómeros y (B) larvas a mancozeb durante 168 h. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$). Las barras de error indican \pm DE.

Con respecto a los individuos expuestos desde larvas la principal deformidad observada a las 168 h de exposición fue hidropesía con consecuente alteración en la pigmentación de la epidermis (Figura 3.10). El porcentaje de larvas expuestas con presencia de este efecto se incrementó a mayores concentraciones, pero solo se hallaron diferencias significativas para la concentración de 5 mg/L respecto al control SA ($p < 0,005$; Tabla 3.2). Otro efecto observado, fue la presencia de movimientos débiles en individuos expuestos a concentraciones mayores o iguales a 0,5 mg/L ($p < 0,000,5$; Tabla 3.2). A diferencia de los embriones, no se encontraron diferencias significativas en el

largo boca-cola en las larvas expuestas al MCZ respecto al control SA ($p>0,05$) (Figura 3.10 B).

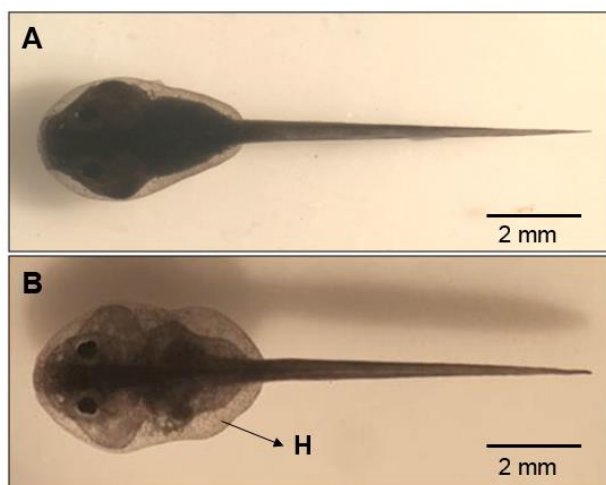


Figura 3.10 Imágenes de larvas (A) control y (B) expuesta durante 168 h a 0,5 mg/L de mancozeb exhibiendo hidropesía (H) y consecuente alteración en la pigmentación de la epidermis.

Tabla 3.2 Porcentajes de individuos (%) expuestos al mancozeb durante 168 h desde estadio larval opérculo completo (E.25) que muestran deformaciones y alteraciones en el comportamiento \pm DE.

Efectos subletales (%)	Concentraciones (mg/L)				
	SA	0,1	0,5	1	5
Hidropesía	3,70 \pm 6,42	31,67 \pm 16,07	27,38 \pm 2,06	25,19 \pm 7,14	100,00 \pm 0,00*
Movimientos débiles	-	3,33 \pm 5,77	27,50 \pm 14,76*	14,44 \pm 6,76*	100,00 \pm 0,00*

(*) Indica diferencias significativas con el control SA mediante Test de Tukey para muestras desbalanceadas.

3.4.2.2 Exposición por pulso de 24 h

La Tabla 3.3 resume los principales tipos de malformaciones observadas tras la exposición por pulsos de 24 h a las 168 h post-exposición en los 4 estadios evaluados. Al momento, todos los individuos se encontraban en estadio de opérculo completo (E.25) lo que permitió la comparación entre los tipos e incidencia de los efectos. Los valores expresados se muestran desde el valor LOEC de efectos subletales (LOEC_{SL}). Los

expuestos desde E.3 a 1 mg/L (Figura 3.11 B) presentaron edema, incurvaciones en el eje, malformaciones severas como microcefalia y reducción de la longitud de la cola. También se observaron cambios de comportamiento como nado errático (Tabla 3.3). Los porcentajes totales de individuos malformados fueron significativamente diferentes de los controles para todas las concentraciones iguales o superiores al LOEC_{SL} de 1 mg/L ($p < 0,05$).

Para los individuos expuestos en E.14 se registraron efectos subletales similares a los descritos anteriormente, como reducción de la longitud de la cola en concentraciones inferiores a E.3 (Figura 3.11 D). También se observaron malformaciones severas con una incidencia baja en los embriones expuestos a 0,5 mg/L (Tabla 3.3). El valor LOEC_{SL} para este momento del desarrollo fue 0,1 mg/L. Las concentraciones más altas, mostraron una mayor incidencia de individuos malformados. Para concentraciones iguales o superiores al LOEC_{SL}, los porcentajes de embriones anormales totales fueron significativamente mayores al control (Tabla 3.3, $p < 0,05$).

Para los embriones expuestos en E.18, las malformaciones descritas también se registraron en mayor incidencia que en los embriones expuestos desde estadios de desarrollo más tempranos (Figura 3.11 F, Tabla 3.3). Por lo que, esta etapa de desarrollo en particular, parece ser más susceptible a los efectos morfológicos y etológicos causados por la exposición por pulsos al MCZ. Al igual que en E.14, el LOEC_{SL} para E.18 fue de 0,1 mg/L y todas las concentraciones iguales o superiores mostraron un número total de embriones malformados significativamente diferente al control ($p < 0,05$).

Por último, los embriones expuestos desde E.25 fueron los menos afectados por el MCZ en términos de tipo e incidencia de anomalías, con una sensibilidad similar a la de los embriones expuestos desde E.3 ya que el LOEC_{SL} fue también de 1 mg/L. Para el caso, embriones expuestos a 0,5 y 1 mg/L de MCZ mostraron edema en una baja frecuencia (Figura 3.11 H). El porcentaje de individuos malformados totales sólo se diferenció del control en los expuestos a 1 mg/L (Tabla 1, $p < 0,05$). No se registraron alteraciones de comportamiento entre los embriones expuestos durante 24 h en esta etapa en particular

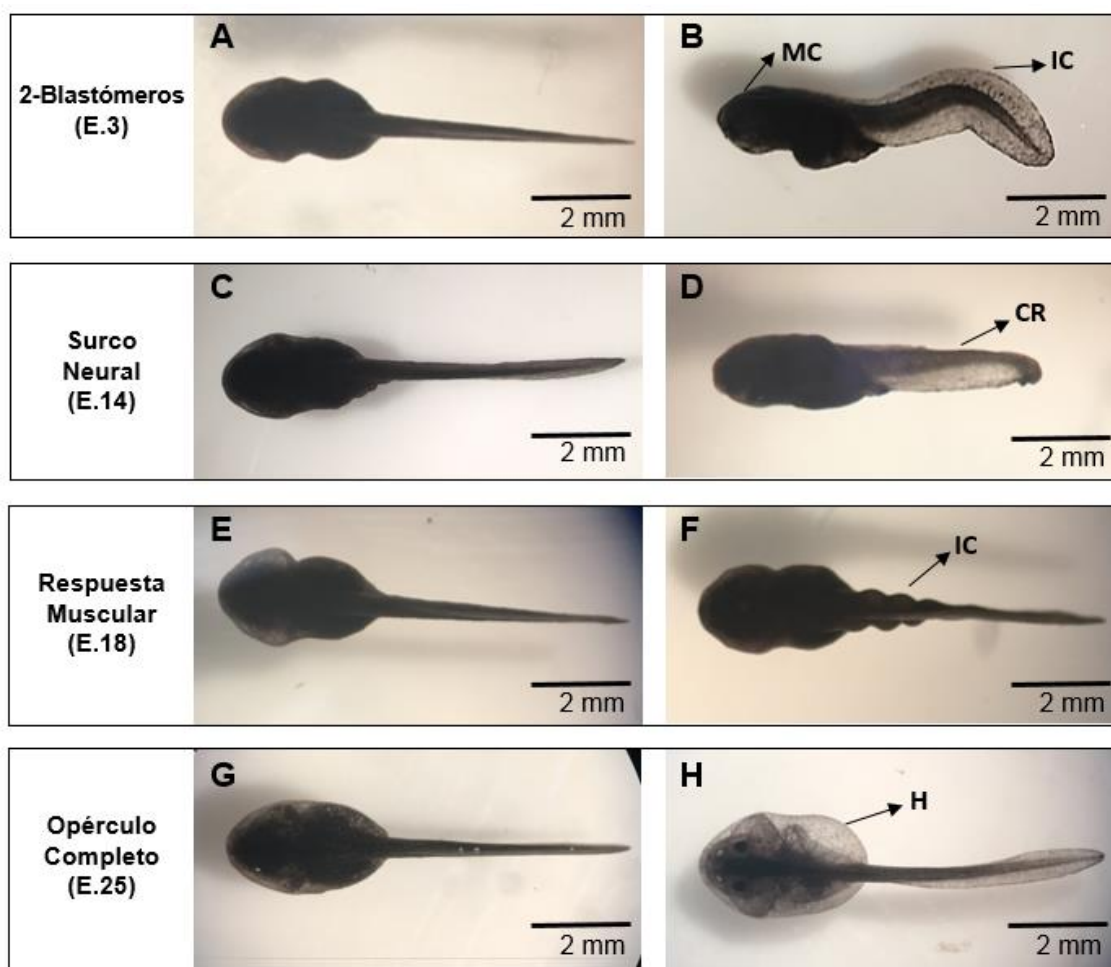


Figura 3.11 Imágenes de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a mancozeb durante diferentes estadios del desarrollo a las 168 h post-exposición. (A, C, E y G) SA: control de solución ANFITOX (B) embrión expuesto a 1 mg/L con incurvaciones en el eje de la cola (IC) y microcefalia (MC), (D) embrión expuesto a 0,5 mg/L mostrando una longitud de cola reducida (CR), (F) embrión expuesto a 0,1 mg/L con múltiples incurvaciones en el eje de la cola (IC) y (H) embrión expuesto a 1 mg/L con hidropesía (H)

Tabla 3.3 Frecuencia (%) de embriones malformados de *Rhinella arenarum* expuestos a mancozeb por un pulso de 24 h durante diferentes estadios de desarrollo, luego de 168 h. Los datos representan el porcentaje de efectos subletales (media \pm DE), (*) Significativamente diferente del control ($p < 0,05$).

Estadios														
2-Blastómeros (E.3)			Surco Neural (E.14)				Respuesta Muscular (E.18)					Opérculo Completo (E.25)		
(%) Efectos subletales	SA	1 mg/L	SA	0,1 mg/L	0,5 mg/L	5 mg/L	SA	0,1 mg/L	0,5 mg/L	1 mg/L	5 mg/L	SA	0,5 mg/L	1 mg/L
Estadio	Opérculo completo (E.25)		Opérculo completo (E.25)				Opérculo completo (E.25)					Opérculo completo (E.25)		
Hidropesía (H)	-	42,85± 23,23	-	6,67± 5,77	100,00±0,00	100,00± 0,00	-	48,14± 3,20	100,00± 0,00	100,00± 0,00	100,00± 0,00	-	-	-
Incurvaciones en la cola (IC)	-	43,33± 13,57	-	6,67± 5,77	17,50± 4,33	35,53± 14,59	-	65,55± 15,03	100,00± 0,00	100,00± 0,00	100,00± 0,00	-	6,55± 11,54	15,00± 7,07
Cola reducida (CR)	-	22,38± 10,72	-	63,33± 5,77	28,33± 20,20	77,77± 38,04	-	78,88± 21,21	100,00± 0,00	100,00± 0,00	100,00± 0,00	-	-	-
Nado errático	-	18,63± 12,21	-	10,00± 10,00	28,33± 20,20	77,77± 31,42	-	74,81± 7,14	83,33± 15,27	100,00± 0,00	100,00± 0,00	-	-	-
Malformaciones severas	-	6,67± 5,77	-	-	6,66± 23,57	-	-	7,40± 12,83	3,33± 5,77	-	-	-	-	-
Total de embriones afectados (%)	0	43,33± 13,57*	0	63,33± 5,77*	100,00± 0,00*	100,00± 0,00*	0	78,88± 21,21*	100,00± 0,00*	100,00± 0,00*	100,00± 0,00*	0	6,55± 11,54	15,00± 7,07*

3.4.3 Evaluación del riesgo ecológico

Se evaluó el riesgo ecológico (RQ) para embriones y larvas expuestas a MCZ durante períodos de exposición agudos y crónicos (Tabla 3.4). El RQ fue estimado, para tiempos agudos, como el cociente entre la concentración esperada en el ambiente (CEA) y el valor de la CL50 y para tiempos crónicos se calculó como el cociente entre la CEA y el valor NOEC_L. Por bibliografía la CEA en aguas superficiales a las 96 h es de 0,056 mg/ L y a las 504 h es de 0,017 mg/L (USEPA 2005). Los valores de RQ fueron comparados con los niveles de preocupación de USEPA (LOC) para organismos acuáticos que, para exposiciones agudas es de 0,5 y, para exposiciones crónicas es de 1. Para ambos estadios el valor de RQ es menor al valor LOC en tiempos agudos de exposición. Sin embargo, en tiempos crónicos, el RQ estimado para embriones excede el valor LOC lo que indica un potencial riesgo ecológico ante la exposición de esta etapa del desarrollo al MCZ por períodos prolongados.

Tabla 3.4 Toxicidad y Cociente de Riesgo (RQ) ecológico del mancozeb para individuos de *R. arenarum* expuestos desde estadio de embriones en 2-blastómeros (E.3) y desde opérculo completo (E.25).

Estadio	Tiempo de Exposición (h)					
	96			504		
	CL 50 (mg/L)	CEA (mg/L) Aguas superficiales	RQ	NOEC _L (mg/L)	CEA (mg/L) Aguas superficiales	RQ
Embriones (E.3)	2,29	0,056	0,02	0,01	0,016	1,60^a
Larvas (E.25)	3,71	0,056	0,015	0,05	0,016	0,32

^aRQ>1 representa un potencial riesgo crónico ante la exposición al mancozeb.

3.4.4 Efectos sobre el tiempo de desarrollo

La Figura 3.12 A muestra el tiempo que tardó el 80% de las larvas pre-metamórficas expuestas desde el estadio E.25 en alcanzar la emergencia de miembros posteriores (E.28). Los resultados indican que el 80% de los individuos pertenecientes al grupo control demoraron un promedio de 80,67±17,24 días en alcanzar el E.28. No se hallaron diferencias significativas entre las concentraciones iguales o menores a 0,05 mg/L y el control SA (p>0,05). Los individuos expuestos a concentraciones de 0,1 y 0,5

mg/L mostraron una disminución significativa del tiempo de desarrollo hasta el E.28 respecto al control SA ($p < 0,05$).

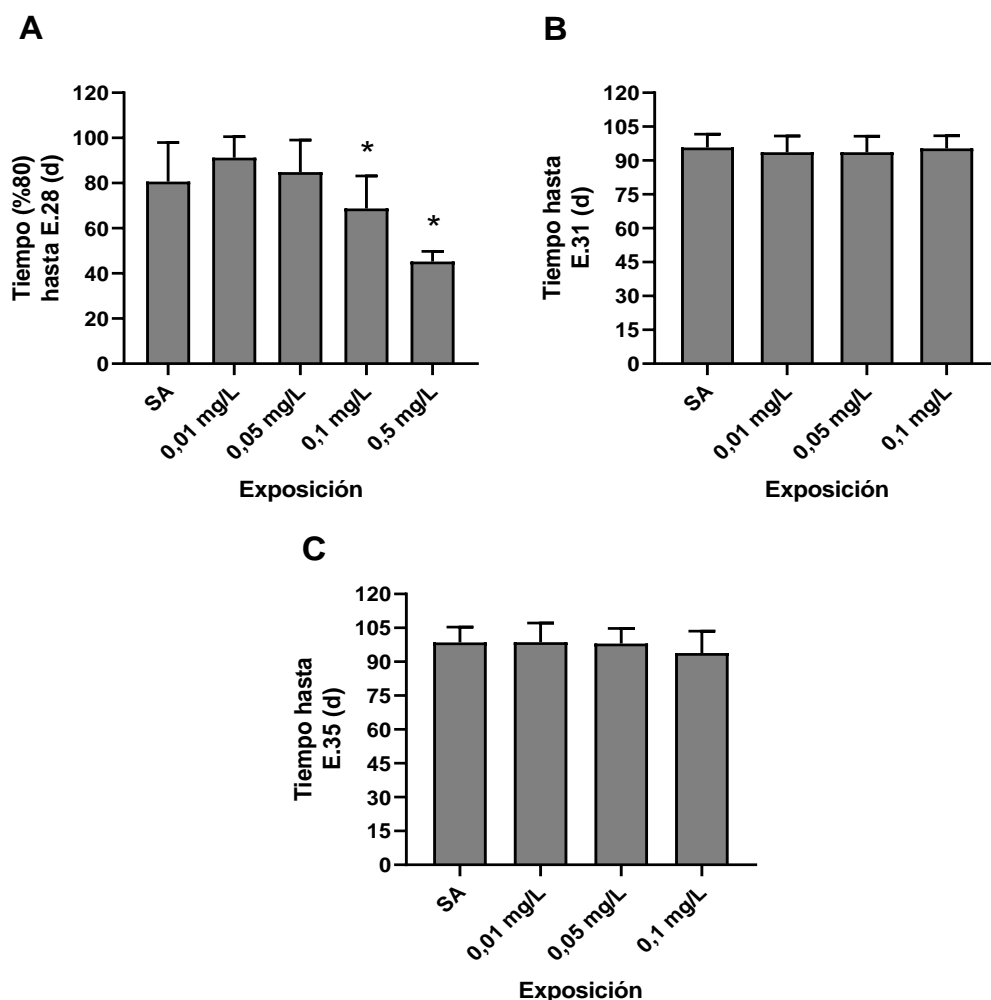


Figura 3.12 Tiempo promedio en días (d) en que (A) el 80% de los individuos expuestos alcanzan el estadio de emergencia de miembros posteriores (E.28) (B) el 100% de los individuos de cada tratamiento alcanzan el estadio de emergencia de miembros anteriores (E.31) y (C) el 100% de los individuos de cada tratamiento alcanzan el clímax metamórfico (E.35). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$). Las barras de error indican \pm DE.

Respecto a los tiempos de desarrollo hasta el estadio de emergencia de miembros anteriores (E.31) (Figura 3.12 B) y clímax metamórfico (E.35) (Figura 3.12 C) no se hallaron diferencias en el tiempo respecto al control SA ($p > 0,05$).

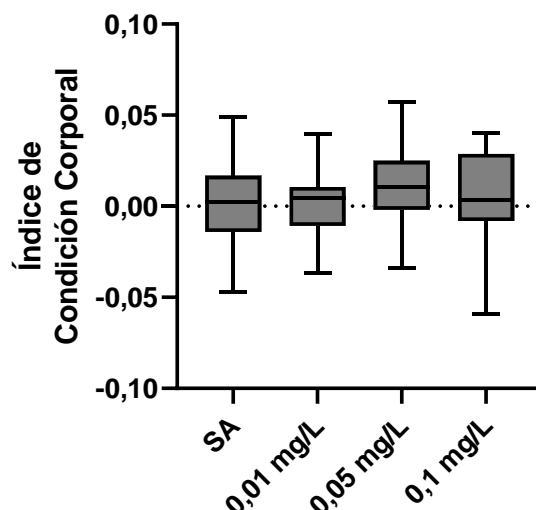


Figura 3.13 Índice de condición corporal (ICC) de los individuos al momento del clímax metamórfico calculado como la diferencia entre el peso real medido y el peso ideal teórico estimado a partir de la ecuación de la recta de regresión lineal entre el logaritmo del peso y la longitud boca-cola de los individuos del control SA. (*) Indica diferencias significativas respecto al control SA.

En cuanto a la condición corporal de los individuos al momento de la metamorfosis, no se hallaron diferencias entre los individuos tratados y los pertenecientes al grupo control ($p > 0,05$) (Figura 3.13).

3.4.5 Efectos sobre el desarrollo gonadal

A partir de la observación del complejo gónada-riñón se determinó la proporción de hembras y machos por tratamiento (Tabla 3.5). En el control, se obtuvo una cantidad similar de machos y hembras, mientras que para la concentración de 0,01 mg/L la mayoría fueron machos. En el caso de la concentración de 0,05 mg/L el 100% de los individuos obtenidos fueron hembras. Debido al bajo número de individuos en los tratamientos, y la variabilidad de los resultados, no fue posible realizar un análisis estadístico sobre el efecto en la proporción de sexos debido a la exposición temprana al MCZ.

Tabla 3.5 Proporción (%) de hembras y machos post-metamórficos expuestos en el período larvario al mancozeb.

	(%) Hembras	(%) Machos	N total
Control SA	42% (n=5)	58% (n=7)	12
0,01 mg/L	20% (n=1)	80% (n=4)	5
0,05 mg/L	100% (n=3)	-	3

En la Figura 3.14 A y B se observa la morfología de la gónada previa a la realización de los cortes histológicos de un individuo control 30-35 días post-metamorfosis, y en la Figura 3.14 D y E la de un individuo perteneciente a la concentración 0,05 mg/L con 39-42 días post-metamorfosis. Si bien el tiempo post-metamorfosis no es el mismo, la diferencia en el desarrollo es incipiente lo cual permite cierta comparación. En el individuo control se observa la presencia de la gónada izquierda y derecha a lo largo del riñón, mientras que el órgano de Bidder es visible en el lado izquierdo, pero en el lado derecho queda tapado por el mesenterio. La morfología lobulada de la gónada es coincidente con una hembra. En el caso del individuo tratado, puede distinguirse la presencia del riñón derecho e izquierdo con las gónadas lobuladas que los acompañan de manera longitudinal consistentes con la morfología gonadal de una hembra. Los órganos de Bidder se observan en posición anterior. En la Figura 3.14 C y F se observa el corte histológico de las gónadas. En el caso del control, se puede apreciar una región cortical con oogonias en maduración y una zona medular maciza con un gran número de células somáticas. Ya puede distinguirse una diferenciación sexual. En el caso de la hembra del tratamiento 0,05 mg/L, el grado de desarrollo es levemente mayor, pudiéndose apreciar nítidamente la presencia de nidos germinales periféricos compuestos por oogonias, y nidos geminales más cercanos a la región medular con una morfología distinta, compuestos por oocitos que han iniciados la meiosis I y se encuentran en la fase paquitene de la profase I. También se observa una cavidad medular incipiente. No se observan alteraciones en la morfología en este ejemplar.

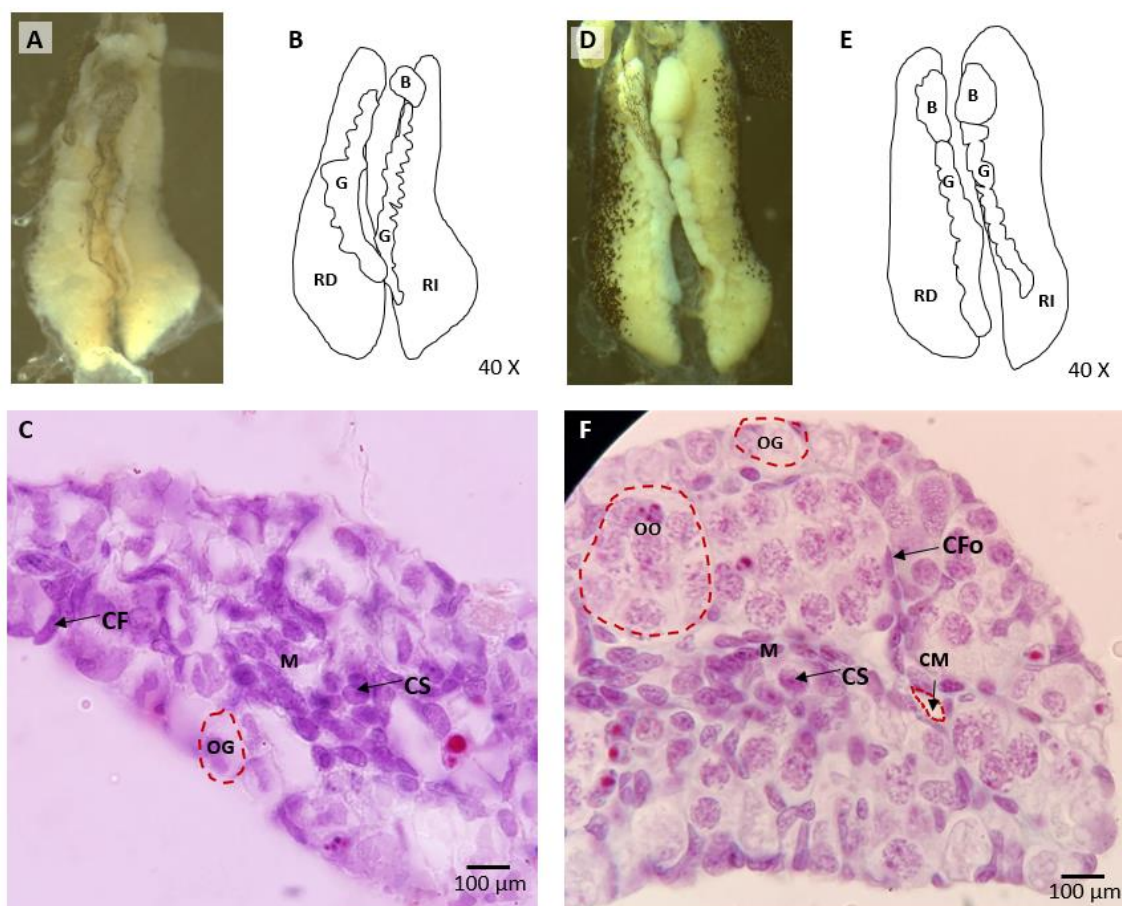


Figura 3.14 Vista del complejo gónada-riñón de (A) un individuo control con 30-35 días post-metamorfosis, (B) su dibujo y (C) el corte histológico del ovario. Vista del complejo gónada-riñón de (D) un individuo expuesto a 0,05 mg/L de mancozeb con 39-42 días post-metamorfosis, (E) su dibujo y (F) el corte histológico del ovario. **B:** órgano de Bidder, **G:** gónada, **RD:** riñón derecho, **RI:** riñón izquierdo, **OG:** oogonia, **OO:** oocito, **CM:** cavidad medular, **M:** médula, **CFo:** célula folicular, **CS:** célula somática.

En la Figura 3.15 A se observa una fotografía de un individuo control de 39-44 días post-metamorfosis y en la Figura 3.15 D la de un individuo perteneciente al tratamiento 0,01 mg/L con 45-53 días post-metamorfosis. En las Figuras 3.15 B y E se encuentran sus dibujos topográficos. Para el individuo control, pueden distinguirse los testículos a lo largo del riñón, pero no se observan los órganos de Bidder, probablemente por una falla en la técnica de disección. Para el individuo tratado, se puede distinguir la presencia de ambos riñones con las gónadas por sobre ellos de manera longitudinal, y en posición anterior se observan ambos órganos de Bidder siendo el derecho menos visible en la fotografía. La Figura 3.15 C y D muestran las imágenes de los cortes histológicos

de los testículos para el control y el individuo tratado, respectivamente. En ambos casos, se observa falta de regionalización de la estructura gonadal con presencia de células germinales rodeadas de células somáticas constituyendo un cisto testicular temprano. No se observan alteraciones en la gónada.

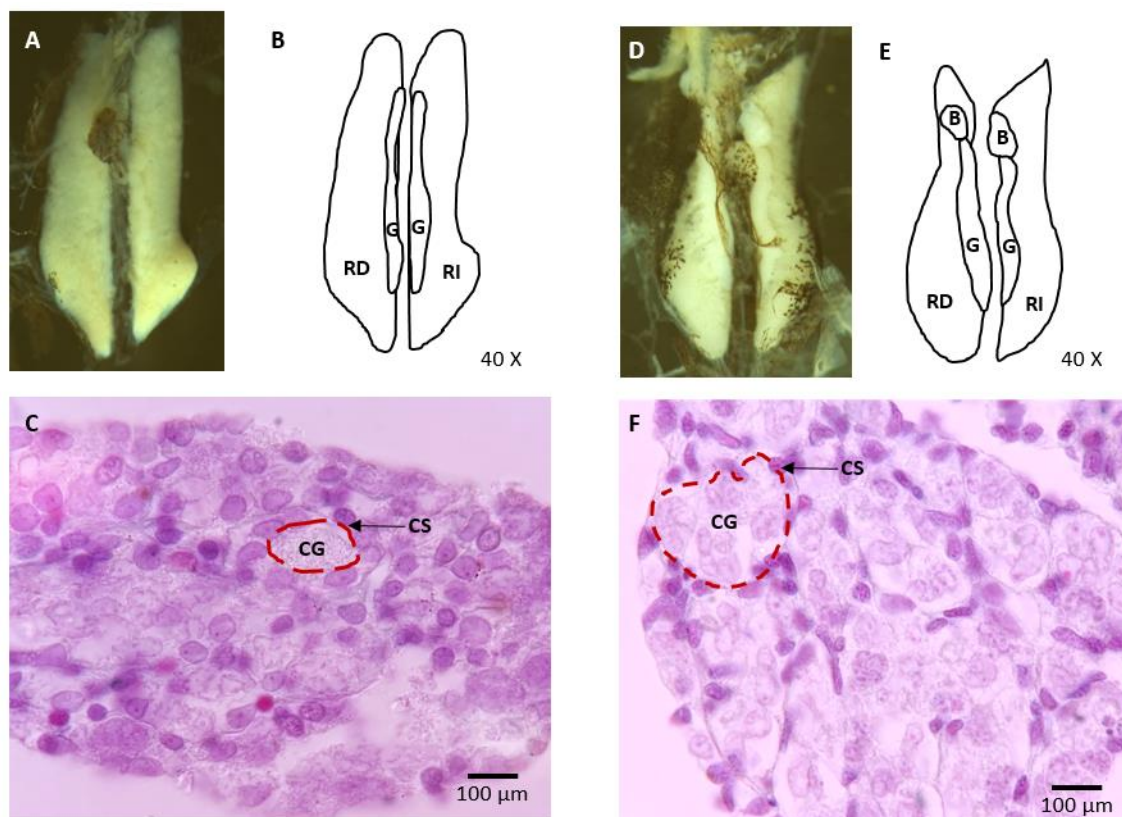


Figura 3.15 Vista del complejo gónada-riñón de (A) un individuo control con 39-44 días post-metamorfosis, (B) su dibujo y (C) el corte histológico del testículo. Vista del complejo gónada-riñón de (D) un individuo expuesto a 0,05 mg/L de mancozeb con 45-53 días post-metamorfosis, (E) su dibujo y (F) el corte histológico del ovario. **B:** órgano de Bidder, **G:** gónada, **RD:** riñón derecho, **RI:** riñón izquierdo, **CG:** célula germinal, **CS:** célula somática.

3.4.6 Actividad de la enzima *Butirilcolinesterasa*

Con respecto a la actividad de la enzima BChE, en la Figura 3.16 se muestran los valores obtenidos para las diferentes concentraciones de exposición luego de 96 h. Para la concentración de 0,05 mg/L se observa una disminución significativa de la actividad, cercana al 50%, respecto al control SA ($SA = 0,020 \pm 0,005 \text{ mM min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$; 0,05

mg/L = $0,010 \pm 0,002$ mM min⁻¹ mg⁻¹ proteína; $p < 0,05$). No se observaron diferencias en larvas expuestas a 0,0025 y 0,01 mg/L, respecto al control negativo SA ($0,0025$ mg/L = $0,015 \pm 0,002$ mM min⁻¹ mg⁻¹ proteína; $0,01$ mg/L = $0,016 \pm 0,003$ mM min⁻¹ mg⁻¹ proteína; $p > 0,05$).

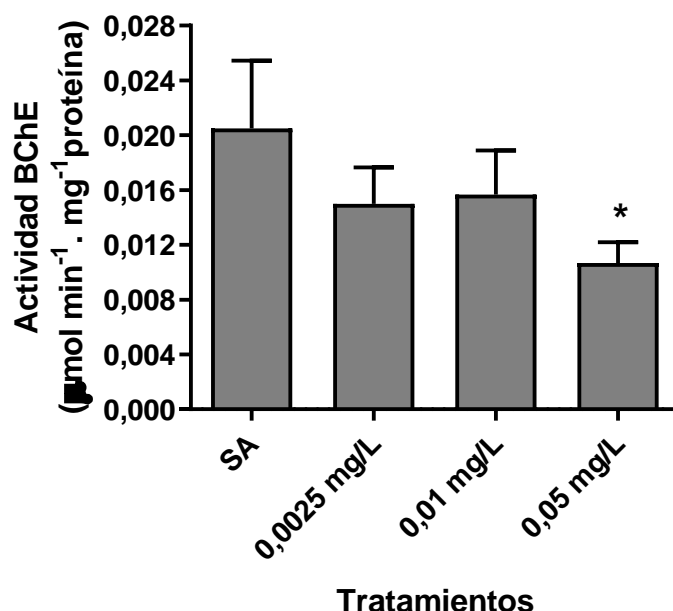


Figura 3.16 Actividad de la enzima BChE en homogenatos de larvas de *R. arenarum* luego de la exposición a diferentes concentraciones de mancozeb durante 96 h. SA: Control negativo solución ANFITOX. Las barras de error indican \pm DE. (*) Indica diferencias significativas respecto al control SA ($p < 0,05$).

3.4.7 Ensayo de micronúcleos

Los resultados del análisis de MNs en eritrocitos de *R. arenarum* expuestos a 0,0025, 0,01 y 0,05 mg/L MCZ en su formulado comercial Candil® se muestran en la Figura 3.17. Luego de 48 h, la exposición al MCZ indujo un incremento significativo en la frecuencia de MNs en los eritrocitos de los individuos expuestos a 0,05 mg/L respecto al control negativo SA ($p < 0,05$) (Figura 3.17 A) ($0,05$ mg/L = $3,15 \pm 1,28$; SA = $1,00 \pm 0,82$). Individuos expuestos a los tratamientos 0,0025 mg/L y 0,01 mg/L no mostraron diferencias respecto al control negativo ($0,0025$ mg/L = $2,22 \pm 1,20$); $0,01$ mg/L = $2,36 \pm 0,93$).

En cambio, a las 96 h, la genotoxicidad del MCZ se incrementó observándose efectos significativos en la frecuencia de MNs respecto al control negativo SA, a partir de 0,01 mg/L ($p < 0,05$) (Figura 3.17 B; Figura 3.18) ($0,01 \text{ mg/L} = 5,62 \pm 1,04$; $0,05 \text{ mg/L} = 8,60 \pm 2,22$; $\text{SA} = 2,57 \pm 1,01$).

Las larvas expuestas al control positivo CF, mostraron un aumento significativo de eritrocitos micronucleados para ambos tiempos de exposición ($\text{CF}_{48\text{h}} = 3,00 \pm 0,82$ ($n=13$), $\text{CF}_{96\text{h}} = 6,40 \pm 1,71$ ($n=10$), $p < 0,05$).

Si se compara la toxicidad obtenida para los distintos tratamientos en los dos tiempos de exposición evaluados, se observa un mayor daño cromosómico, entendido como una mayor incidencia de MNs, a las 96 h en todos los tratamientos. Por ejemplo, para la concentración 0,05 mg/L, el incremento de la frecuencia observada de MNs fue de un 234%.

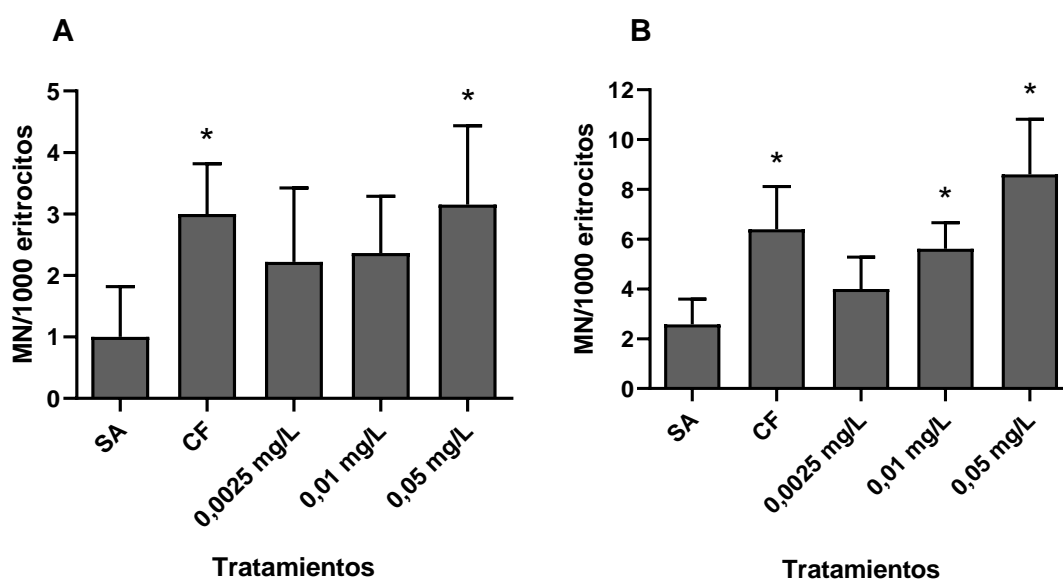


Figura 3.17 Frecuencia de MNs en eritrocitos de larvas de *R. arenarum* expuestas a diferentes concentraciones de mancozeb luego de (A) 48 h y (B) 96 h. SA: Control negativo solución ANFITOX; CF: Control positivo ciclofosfamida 40 mg/L. Las barras de error indican \pm DE. (*) Indica diferencias significativas respecto al control negativo SA ($p < 0,05$).

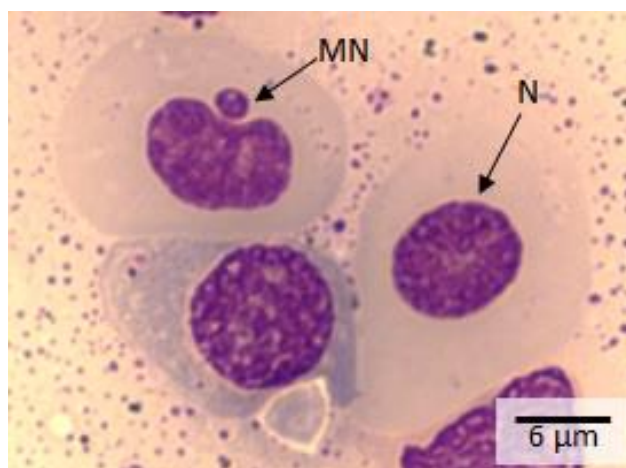


Figura 3.18 Frotis de sangre de una larva pre-metamorfica expuesta a 0,01 mg/L de mancozeb durante 96 h. (N) indica el núcleo principal y (MN) un micronúcleo.

3.5 Discusión

Debido a la escasa información disponible sobre el impacto del MCZ en anfibios, los resultados obtenidos contribuyen a dilucidar el perfil toxicológico de dicha sustancia para los estadios embrionarios y larvales de *Rhinella arenarum*.

El MCZ causó efectos letales y severos efectos subletales en *Rhinella arenarum* durante el período del desarrollo embrio-larval. Al observar las figuras de sobrevivencia (Figura 3.4 A y B) y las curvas TOP (Figura 3.5 A y B) para embriones y larvas se evidencia que, a mayor tiempo de exposición, mayor fue la toxicidad del fungicida. Esto resalta la importancia de realizar ensayos toxicológicos a largo plazo puesto que la toxicidad de una sustancia puede no manifestarse en tiempos agudos de exposición. Por otro lado, respecto a la sensibilidad comparada entre ambos períodos de desarrollo se observó que, prácticamente para todos los tiempos, el MCZ fue más tóxico para embriones que para larvas. Por ejemplo, para los primeros la Concentración Letal 50 (CL50) a las 96 h fue 2,3 mg/L y a las 504h fue de 0,7 mg/L mientras que, para los segundos, la CL50_{96h} fue 3,7 mg/L y la CL50_{504h} fue 1,1 mg/L. Asimismo, comparando la Máxima concentración que no se observa efecto letal (NOEC_L) para las 504 h, los embriones mostraron una sensibilidad 5 veces mayor que las larvas. Si particularmente se observa el patrón de respuesta de los embriones se ve un aumento importante de la toxicidad luego de las 168 h de exposición. Este tiempo, coincide con el arribo de los

individuos al estadio larval. La sensibilidad diferencial de los embriones expuestos desde 2-blastómeros o desde larvas puede deberse mayormente a los diferentes procesos biológicos asociados al desarrollo que se están llevando a cabo en los organismos. Durante la etapa de segmentación, el metabolismo del organismo está principalmente abocado a la división celular y por tanto la síntesis de ADN, proteínas, y demás componentes celulares (Amestoy, 1958). Los requerimientos energéticos de los huevos son muy bajos pudiendo desarrollarse incluso en anaerobiosis, situación que cambia radicalmente al llegar a la etapa de gástrula dónde incrementa sustancialmente la glucólisis y en consecuencia el intercambio gaseoso con el medio (Amestoy, 1958). Una vez que los organismos alcanzan el período larval, comienzan a desplazarse activamente y a alimentarse, al tiempo que sus branquias (inicialmente externas, luego internas) están en directo contacto con el medio (Amestoy, 1958). Estos dos factores, sumado a la mayor relación superficie-volumen que poseen habilitan mayores vías de ingreso para los contaminantes por lo cual, los efectos tóxicos asociados pueden ser mayores.

El índice teratogénico (IT), indica la capacidad de una sustancia de generar efectos teratogénicos en las etapas iniciales del desarrollo. El IT calculado para *R. arenarum* a las 168 h superó más de 14 veces el valor umbral lo que indica que el MCZ es una sustancia con gran potencial teratogénico.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en otras especies de anfibios, podemos encontrar respuestas toxicológicas similares, por ejemplo, entre embriones de *R. arenarum* y *Rana clamitans*. Como mencioné anteriormente, la CL50_{96h} para *R. arenarum* fue de 2,3 mg/L mientras que para *R. clamitans* es 2,2 mg/L (Harris et al. 1998). Sin embargo, los embriones de *R. arenarum* resultaron 1,6 veces más resistentes que los de *Bufo americanus* cuya CL50_{96h} es de 1,1 mg/L (Harris et al. 2000).

La exposición al MCZ también causó un amplio espectro de malformaciones en los embriones de *R. arenarum* en concentraciones que pueden ser encontradas en cuerpos de agua cercanos a campos destinados a la agricultura (USEPA, 2005). Las malformaciones descritas en el presente trabajo resultan consistentes con aquellas reportadas previamente en embriones de *R. clamitans* luego de 312 h de exposición al formulado comercial de MCZ Dithane DG® (76-80% ingrediente activo) (Harris et al. 1998). También embriones de *B. americanus* expuestos a 0,078 mg/L de MCZ desarrollaron malformaciones similares a las observadas en el presente trabajo para *R.*

arenarum tales como incurvaciones dorsales o laterales de la cola e hidropesía corporal (Harris et al. 2000).

En este trabajo se realizó un análisis completo que no sólo incluyó la evaluación de los efectos letales y subletales en tiempos agudos y subcrónicos sino que abarcó también tiempos crónicos de exposición, lo que permitió que los individuos alcancen el estadio larval y que se manifiesten efectos no detectables en menores tiempos de exposición. En este sentido, aquí se observa que individuos expuestos desde embriones a concentraciones iguales o mayores a 0,1 mg/L mostraron una disminución significativa del tamaño corporal respecto a los controles (Figura 3.9). Este efecto ha sido previamente descrito en larvas de *R. clamitans* expuestas a concentraciones mayores o iguales a 0,078 mg/L MCZ y cuya reducción demostró ser mayor a concentraciones crecientes (Harris et al. 1998). Shenoy et al. (2009) también reportaron una disminución significativa de la longitud de larvas expuestas en el rango de concentraciones de MCZ entre 0,016 y 0,4 mg/L luego de 6 semanas de exposición. Es claro que la disminución del tamaño corporal en las larvas de los anfibios puede tener consecuencias perjudiciales ya que presentarán, por ejemplo, una mayor susceptibilidad a la predación lo que podría provocar una disminución de los individuos de la población (Diana et al. 2000).

Respecto a los efectos de la exposición al fungicida en los períodos de desarrollo pre-metamórficos y clímax, se encontró una disminución significativa del tiempo en llegar al estadio de emergencia de miembros posteriores (E.28) en los individuos expuestos en el rango de concentraciones entre 0,1 y 0,5 mg/L. Sin embargo, esta aceleración no se mantuvo en los tiempos requeridos para alcanzar el estadio de emergencia de miembros anteriores (E.31) y clímax metamórfico (E.35). Estos últimos, son resultados coincidentes con los reportados por Harris et al. (2000) para individuos de las especies *B. americanus* y *Rana pipiens* expuestos al fungicida, aunque, en este trabajo, la exposición se realizó durante sólo 96 h al inicio de la etapa embrionaria, y nuevamente desde la emergencia de los miembros anteriores. A partir de los resultados aquí obtenidos para *R. arenarum*, se calculó un índice de condición corporal (ICC) de los individuos al momento del clímax metamórfico basado en la longitud y peso corporal, no observándose diferencias entre los tratamientos. Sin embargo, es interesante destacar la morfología de 2 individuos metamórficos pertenecientes al tratamiento 0,5 mg/L, cuyos valores de peso y longitud no fueron incorporados al ICC debido al bajo número de réplicas. Si se observa la Figura 3.19 pueden verse individuos metamórficos con una escoliosis notoria,

alteraciones esqueléticas que también fueron observadas en la exposición temprana de embriones (ejemplo: Figura 3.8 C).

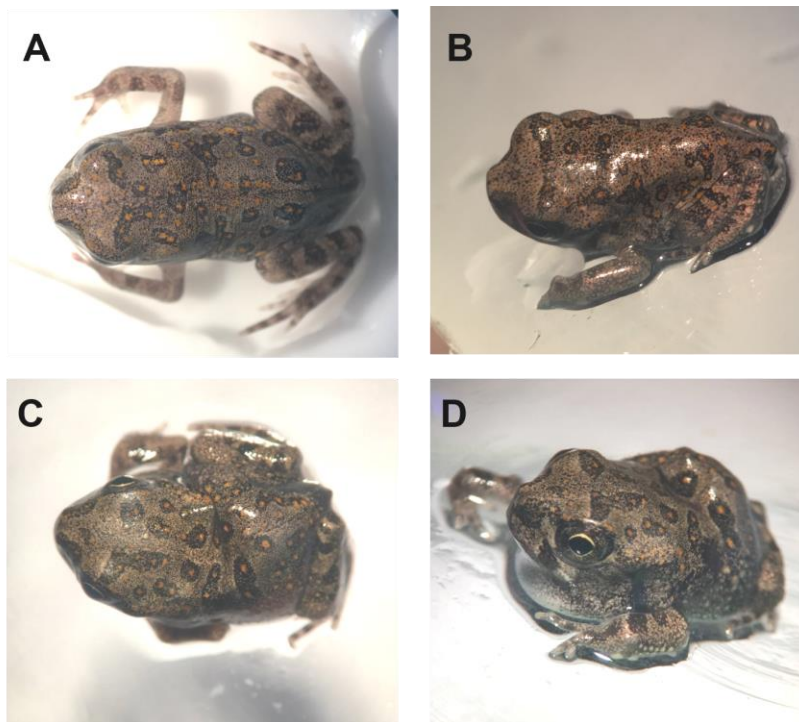


Figura 3.19: Vista dorsal (A) y lateral (B) de un individuo control. Vista dorsal (C) y lateral (D) de individuo post-metamórfico expuesto durante el período larval a 0,5 mg/L de mancozeb. Nótese la persistencia de escoliosis.

Respecto al estudio gonadal, se presentaron numerosas dificultades que impidieron un análisis exhaustivo de un mayor número de gónadas. Los individuos juveniles, suelen tener una alta tasa de mortalidad espontánea, por lo que, si bien el número de individuos inicial fue muy grande, la cantidad de individuos post-metamórficos se redujo significativamente afectando el número de réplicas disponible para el análisis. Por otro lado, se debe tener en cuenta que por dificultades asociadas a la pandemia por COVID-19, no se pudo proseguir con el análisis histológico de todos los complejos gónada-riñón que se diseccionaron. Los resultados obtenidos de los preparados disponibles no muestran alteraciones en la morfología gonadal. Sin embargo, por todo lo anteriormente detallado, éstos deben ser tomados como preliminares, no pudiendo realizar conclusiones sobre el efecto del MCZ en el desarrollo gonadal de *R. arenarum*, siendo necesario continuar con el estudio.

Otra importante contribución de este trabajo es el estudio del riesgo ecológico del MCZ en *R. arenarum*. Los resultados indican que el fungicida no constituye un potencial riesgo para los anfibios en tiempos agudos de exposición en los períodos de desarrollo embrio-larval estudiados. Sin embargo, en tiempos crónicos, el valor de RQ en embriones superó los niveles de preocupación establecidos por la USEPA (LOC) lo que indica que el MCZ es capaz de inducir efectos adversos durante el desarrollo de individuos de la especie *R. arenarum*.

Por otro lado, también se evaluó la respuesta de biomarcadores de neuroprotección y genotoxicidad frente a la exposición al MCZ en concentraciones ambientalmente esperadas. Actualmente, existe muy poca información sobre los efectos genotóxicos de este plaguicida sobre especies que viven en entornos afectados por su aplicación. Por tanto, los resultados aquí encontrados proveen información muy importante a la hora de la toma de decisiones referidas al tipo de agroquímicos usados en los cultivos. Luego de 96 h de su aplicación en los campos, el MCZ puede alcanzar en aguas superficiales concentraciones entre 0,013 y 0,05 mg/L (USEPA, 2005). En este trabajo, concentraciones en este rango han generado daño cromosómico y alteraciones en la enzima neuroprotectora BChE en *R. arenarum*, lo que coloca a esta especie en un sitio de vulnerabilidad. La genotoxicidad del MCZ también se ha demostrado en células sanguíneas de peces de la especie *Clarias batrachus* expuestos a 2,2 mg/L (Shahi & Sigh, 2014). El potencial oxidativo de este fungicida ha sido propuesto como mecanismo explicatorio de su genotoxicidad. En *Anguilla anguilla* L. se encontró daño cromosómico luego de 96 h de exposición a 2,9 µg/L de Mancozan®, otro formulado comercial de MCZ (Marques et al. 2016). Las rupturas del ADN, en este caso, fueron causadas por oxidación de las purinas y pirimidinas. Srivastava y colaboradores (2012) también proponen que las aberraciones cromosómicas y MNs observados en células de mamíferos expuestas a 0,5, 2 y 5 µg/mL probablemente se deban a daño oxidativo por EROs. La capacidad oxidante del MCZ probablemente se deba a su estructura química que contiene zinc. Al ocurrir la metabolización del fungicida, esos metales son liberados (Calviello et al. 2006). Aunque el zinc y el manganeso son elementos esenciales en los organismos, incluso para el funcionamiento de enzimas con capacidad antioxidante, en exceso pueden causar estrés oxidativo debido a la alteración de la homeostasis y la interacción entre los metales y macromoléculas (Zatta et al. 2003; Valko et al. 2005). Las células que resultan expuestas a un estrés oxidativo crónico pueden tener un metabolismo completamente alterado, lo

que puede llevar a cambios permanentes en la estructura del ADN, ARN, proteínas, lípidos y azúcares, con consecuente pérdida de función, alterando el desarrollo de procesos patológicos en el organismo.

Con respecto a la capacidad de afectar mecanismos implicados en la neuroprotección, el MCZ causó inhibición de la función enzimática de la BChE. Este efecto puede explicarse debido a que afecta al sistema nervioso de manera similar que los insecticidas de la familia de los cabamatos, es decir, a través de sus principales metabolitos, etilentiourea y sulfuro de carbono (Srivastava & Singh, 2013). Aunque este fungicida es aún muy utilizado en muchos países, hay muy poca información sobre los efectos neurotóxicos que puede causar, no sólo en anfibios, sino en cualquier otra especie acuática. Si bien estudios llevados a cabo en individuos de *Rana ridibunda* expuestos a 0,091 mg/L no mostraron cambios en la actividad de la AChE (Falfushinska et al. 2008) aquí queda demostrado que el MCZ puede afectar el funcionamiento de otra enzima colinesterasa con función neuroprotectora lo que remarca la utilidad de este biomarcador como un indicador temprano de exposición. En humanos, que debido a su profesión de trabajadores rurales fueron crónicamente expuestos a fungicidas de la familia de los ditiocarbamatos, se observó la manifestación de síntomas típicos de la enfermedad de Parkinson (Drechsel & Patel, 2008). Domico et al. (2007) han sugerido que la neurotoxicidad del MCZ podría estar asociada a la alteración de la función mitocondrial ya que el fungicida actuaría causando desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones. En resumen, los mecanismos que explican la toxicidad del MCZ no fueron totalmente explicados. Sin embargo, existen múltiples posibles explicaciones, todas igualmente bien fundamentadas que explicarían el daño neuronal.

Un aspecto a destacar de la presente investigación es que, si bien la mayoría de los efectos tóxicos tanto letales como subletales, fueron observados en concentraciones mayores a las medidas empíricamente en muestras de agua de distintos ambientes (e.g Venezuela, 1,27 µg/L y Costa Rica 0,15-0,25 µg/L) o incluso de las esperadas por los organismos oficiales de protección ambiental como la USEPA (0,013-0,05 mg/L agudo y 0,004-0,017 mg/L crónico) es importante resaltar dos factores: en primer lugar, concentraciones dentro del rango del esperado por la USEPA pueden causar alteraciones en la respuesta de los biomarcadores de neuroprotección y genotoxicidad. En segundo lugar, no se puede descartar que se alcancen concentraciones similares a las del rango ensayado bajo accidentes que provoquen derrames, o mal manejo de la maquinaria de

aplicación y disposición final de los recipientes de los formulados. Por esa razón, evaluar concentraciones fuera de lo ambientalmente relevante es de suma importancia de manera tal de poder predecir los efectos perjudiciales de estos eventos en los organismos.

Si bien, este fungicida sigue siendo extensamente utilizado, recientemente la Unión Europea ha decidió retirar la aprobación para el uso y comercialización de fitosanitarios que contengan MCZ (EU Commission, 2020). En síntesis, los resultados presentados promueven la alerta sobre la elección y continuidad del uso del MCZ en cultivos ya que causa efectos tóxicos en distintos niveles en organismos, particularmente anfibios, expuestos a concentraciones ambientales durante el período más susceptible de su desarrollo.

3.6 Conclusiones

- La exposición al MCZ causó efectos letales en embriones y larvas en el rango de las concentraciones estudiadas siendo los embriones los más sensibles.
- La toxicidad fue concentración y tiempo dependiente.
- El MCZ generó numerosos efectos subletales en embriones (retraso en el desarrollo, hidropesía, incurvaciones, movimientos débiles, etc.), con un valor de IT de 21,09 lo que indica un alto potencial teratogénico.
- En larvas, el MCZ causó una menor incidencia de efectos subletales, principalmente hidropesía.
- El MCZ causó una aceleración significativa en el tiempo de desarrollo de los miembros posteriores.
- La evaluación de riesgo ecológica realizada mediante el cálculo del coeficiente RQ indica un potencial riesgo para embriones expuestos durante períodos crónicos.
- El MCZ causó genotoxicidad en concentraciones ambientalmente relevantes siendo mayor el efecto a las 96 h que a las 48 h de exposición.
- El MCZ causa alteraciones de mecanismos neuroprotectores mediante la inhibición de la actividad de la enzima neuroprotectora BChE.

Capítulo 4

Evaluación de la toxicidad de un formulado comercial de imidacloprid sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*

4.1 Introducción

Los insecticidas neonicotinoides comprenden una familia de sustancias muy utilizadas en la industria agrícola para prevenir numerosas plagas como hormigas, ácaros, cucarachas, etc., y también con fines veterinarios (Chagnon et al. 2015). En la década de su lanzamiento, en 1980, la existencia de plagas resistentes a insecticidas carbamatos, organofosforados y piretroides, convirtieron a los neonicotinoides en los plaguicidas más elegidos debido a su alta eficacia, elevada selectividad por artrópodos, gran persistencia en ambiente y solubilidad en agua. También, por su versatilidad de aplicación y leve impacto sobre peces y otros vertebrados (Georghiou & Mellon, 1983; Simon-Delso et al. 2015).

Entre los neonicotinoides, el imidacloprid (IMI) fue, y continúa siendo, uno de los insecticidas más utilizados en todo el mundo. Se lanzó al mercado por primera vez en 1990 y su uso siguió aumentando hasta convertirse en 2010 en el insecticida más vendido del mundo (Jeschke et al. 2011).

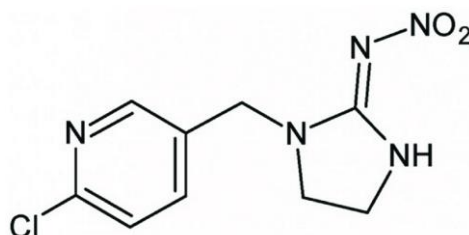


Figura 4.1 Estructura química del imidacloprid (IMI).

Dentro de los neonicotinoides, el IMI se encuentra en el grupo de aquellos que contienen un grupo nitro junto con otros como la clotianidina, nitenpiram, tiametoxam y dinotefuran (Pisa et al. 2015). La estructura química consiste en 1-(6-cloro-3-piridil-metil)-N-nitroimidazolidina-2-ilidenoamina (Figura 4.1). En cuanto a su apariencia, Tomlin (2009) lo describe como cristales incoloros con un débil aroma característico. Es soluble en agua y también estable en un pH entre 5 y 11, con una vida media mayor a 30 días a 25°C y pH 7 (Wagner, 2016). En sedimentos, es muy persistente alcanzando una vida media de 420 días (Meylan & Howard, 2000). En cuanto a su capacidad de bioacumularse, tiene un alto valor del coeficiente de partición octanol-agua ($K_{ow} = 3,7$) (Tomlin, 2009).

El IMI es un insecticida sistémico que se puede aplicar de distintas formas ya sea por pulverización de las hojas, aplicación granular, inmersión de plántulas, inyecciones en el tronco, entre otros, siendo el tratamiento de semillas y suelos las aplicaciones de mayor uso (Jeschke et al. 2011; Simon-Delso et al. 2015). Una vez que el IMI está en contacto con la planta o semilla, entra a través de los tejidos y se distribuye por toda ella causando toxicidad a los insectos fitófagos (Simon-Delso et al. 2015). Una de las razones que hacen del IMI uno de los insecticidas más vendidos y utilizados es su alta selectividad para el sistema nervioso de los insectos, lo que lo hace menos peligroso para los vertebrados (Badgujar et al. 2013). Su mecanismo de acción implica la unión agonística a los receptores nicotínicos de acetilcolina de los insectos provocando la apertura del canal, el ingreso de Na^+ extracelular y el egreso de K^+ intracelular (Casida & Durkin, 2013). Como consecuencia, las células son estimuladas continuamente, los depósitos de energía se vacían y la transmisión de potencial de acción falla conduciendo a la parálisis (Simon-Delso et al. 2015). La diferencia en la selectividad entre receptores de insectos y de mamíferos se debe a diferencias en los aminoácidos que conforman el sitio de unión de la acetilcolina en el receptor (Tomizawa & Casida, 2009).

Como otros plaguicidas, el IMI puede alcanzar ecosistemas acuáticos ya sea durante o después de su aplicación en el campo. En muestras de agua superficial, se han encontrado residuos de IMI en diferentes países en concentraciones que van de 0,001 a 320 $\mu\text{g/L}$ (Morrissey et al. 2015). Por ejemplo, en Sidney, Australia, el valor medido fue de 4,6 $\mu\text{g/L}$ (Sánchez-Bayo & Hyne, 2014). En California, EEUU, los valores de IMI presentes alcanzaron valores máximos de 3,29 $\mu\text{g/L}$ (Starner & Goh, 2012). En Argentina existen reportes en muestras de agua superficial del arroyo El Crespo (Buenos Aires, partido de Balcarce), y de la cuenca Tapalqué (Buenos Aires, partido de Olavarría) con valores de 0,04 y 0,054 $\mu\text{g/L}$, respectivamente (Pérez et al. 2017; Pérez et al. 2021). Sin embargo, según la USEPA, la Concentración Ambiental Esperada (EEC) de este insecticida en aguas superficiales en tiempos agudos post-aplicación es de 0,036 mg/L y para tiempos crónicos post-aplicación la concentración ambiental puede alcanzar un valor de 0,017 mg/L (USEPA, 2004). Asimismo, se estima que luego de derrames accidentales se pueden encontrar concentraciones en aguas superficiales entre 0,18 y 18 mg/L (SERA, 2005). Aunque estas concentraciones están en su mayoría por encima de las encontradas en las muestras de agua y del valor de las CEAs, y por lo tanto es poco probable que se produzca una mortalidad significativa en las concentraciones ambientales, hay varios

aspectos que no deben subestimarse. En primer lugar, que su elevada persistencia puede dar lugar a una acumulación ante repetidas aplicaciones (Chagnon et al. 2015) y, en consecuencia, causar efectos en los organismos de la biota acuática sobre el desarrollo, daños fisiológicos, morfológicos, etológicos, en el ADN y neuronales. En segundo lugar, se debe tener en cuenta la susceptibilidad diferencial entre las etapas de desarrollo de los organismos, evidenciándose la importancia de este aspecto en diversos estudios con anfibios (Pérez Coll & Herkovits, 1990, Aronzon et al. 2011; Svartz et al. 2014) y, en tercer lugar, la ocurrencia de derrames durante la manipulación, almacenamiento, descarte y aplicación de agroquímicos por ejemplo debido al mal funcionamiento de la maquinaria.

La USEPA ubica al IMI en la Clase II-IV según su vía de exposición y, en cuanto a su potencial carcinógeno dentro del Grupo E (evidencia de no carcinogenicidad para humanos) (USEPA, 2020). Aunque se plantea la alta selectividad del IMI para los receptores de los insectos, existen evidencias científicas que sugieren que este plaguicida también puede causar toxicidad en vertebrados (Gibbons et al. 2015).

Estudios recientes han demostrado que tras 48 h de exposición a concentraciones iguales o superiores a 100 µg/L de IMI, el insecticida se acumula en diferentes tejidos del pez *Australoheros facetus* (Iturburu et al. 2016). En cuanto a su toxicidad en anfibios, la concentración letal media (CL50) reportada en larvas de diferentes especies varía entre 82 a 333 µg/L (para una revisión, ver Gibbons et al. 2015 y referencias detalladas).

Muy pocos estudios evaluaron la inducción de malformaciones por la exposición a IMI en organismos acuáticos. Islam et al. (2019) demostraron recientemente que la exposición de la carpa común *Cyprinus Carpio* a 1 mg/L de IMI durante 48 y 72 h, causa malformaciones en los embriones y larvas. Particularmente en anfibios, la información disponible es realmente escasa. Howard et al. (2002) estudiaron los efectos de la exposición al IMI en la tasa de eclosión de diferentes especies (*Rana Pipiens*, *Bufo americanus* y *Ambystoma jeffersonianum*) sin encontrar efectos. Asimismo, en el caso de las larvas de *B. americanus*, los autores no detectaron efectos sobre el desarrollo y crecimiento en un rango de concentración de exposición de 4,6 a 46 µg/L de IMI.

En este sentido, existen estudios *in vitro* e *in vivo* que alertan sobre su toxicidad mediante el estudio de diferentes respuestas de biomarcadores. En eritrocitos de *Rana*

nigromaculata Hallowell expuestos a un rango de 0,05 a 0,5 mg/L de IMI, se observó un aumento significativo de la fragmentación del ADN evaluado mediante el ensayo cometa (Feng et al. 2004). En la misma investigación, las larvas expuestas *in vivo* a 8 y 32 mg/L de IMI durante 7 días mostraron un incremento significativo de eritrocitos micronucleados. Resultados similares se obtuvieron en larvas de *Hypsiboas pullchellus* expuestas a 15, 25 y 30 mg/L de IMI (Ruiz de Arcaute et al. 2014, Pérez-Iglesias et al. 2014).

En cuanto a la modificación de la actividad del biomarcador enzimático, algunos investigadores informaron de los efectos perjudiciales sobre el sistema nervioso de los peces. En *Astyanax altiparanae*, tras la exposición de 5,94 y 53,95 µg/L de IMI, se reportó una inhibición significativa de la actividad de la AChE en músculo (Almeida et al. 2021). En el tejido cerebral de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, se determinó una disminución significativa de la actividad AChE después de 21 días de exposición a 10 y 20 mg/L (Topal et al. 2017). Sin embargo, en el caso de los anfibios, no hay evidencia del efecto neurotóxico causado por el IMI. Rios et al. (2017) no encontraron cambios en la actividad AChE de las larvas de *Rana catesbeiana* después de 8 semanas de exposición a 100 ng/L.

Como se mencionó anteriormente el IMI es uno de los insecticidas más relevantes en el mercado mundial. Su uso se ha registrado en al menos 120 países para más de 140 usos, bajo formulados comerciales de nombre Confidor®, Admire® y Gaucho®, principalmente (Jeschke et al. 2011). En cuanto a la cantidad de IMI utilizado en los campos de cultivo argentinos, no existe información fehaciente al respecto. Sin embargo, podemos analizar los volúmenes utilizados en otros países como EEUU donde se estima que entre 2005 y 2015 se utilizaron más de 317 toneladas de IMI al año para el tratamiento de semillas de cultivos de maíz, algodón, soja, papa y trigo (USEPA, 2020). Para el caso de la aplicación en suelo y por aspersión foliar se estima que entre 2007 y 2017 la cantidad utilizada fue 362 toneladas sobre una superficie aproximada de 2,2 millones de hectáreas (USEPA, 2020). En Argentina, la cantidad de IMI importada anualmente muestra una tendencia ascendente, alcanzando un valor de 757 toneladas en el año 2020, lo que representa un incremento cercano a 5 veces la cantidad importada en el año 2006 (SENASA, 2020).

Para evaluar la toxicidad del IMI en el presente trabajo, se utilizó el formulado comercial Confidor 70 WG® de la empresa Bayer CropScience cuyo porcentaje de ingrediente activo es 70%. El Confidor, puede ser aplicado por riego por goteo, mochila y aspersión foliar. Está indicado para el control de plagas como áfidos, aleuródidos, gusano minador, mosca blanca, pulgones y trips en una gran cantidad de cultivos (i.e berenjena, alcauciles, repollos, ciruelas, naranjas, etc.). En cuanto a las indicaciones de uso, los fabricantes advierten el empleo de protección corporal y no ingresar a la zona tratada durante las 24 h posteriores a la aplicación. El formulado Confidor 70 WG® se trata de un granulado que puede ser adquirido fácilmente en el mercado fitosanitario argentino sin ningún tipo de restricción.

Teniendo en cuenta la escasa y dispersa información sobre los efectos del IMI en anfibios y su importancia como indicadores de la salud de los ecosistemas (Waddle, 2006), el objetivo del presente capítulo fue realizar una exhaustiva evaluación de los efectos letales y subletales de un formulado comercial de este insecticida en diferentes estadios del desarrollo temprano de la especie de anfibio sudamericano *Rhinella arenarum*. Dado que los efectos tóxicos del IMI pueden producirse a nivel bioquímico sin efectos morfológicos observables, se integró el uso de biomarcadores de neuroprotección y genotoxicidad, mediante la medición de la actividad butirilcolinesterasa (BChE) y el ensayo de micronúcleos (MN), respectivamente, como indicadores de los efectos perjudiciales producidos a concentraciones inferiores a la máxima concentración a la que no se observa efecto letal (NOEC_L).

4.2 Objetivos e hipótesis

4.2.1 Objetivos generales

En base a las inquietudes anteriormente planteadas se propone:

Caracterizar la toxicidad de un formulado comercial a base del principio activo imidacloprid (Confidor 70 WG®, 70% ingrediente activo) en el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*, evaluando los efectos letales, malformaciones embrionarias y deformidades larvarias, así como también alteraciones en el comportamiento y en la respuesta de biomarcadores de neuroprotección y genotoxicidad.

4.2.2 Objetivos específicos

- Obtener el perfil de toxicidad del Confidor 70 WG ® (curvas TOP) para embriones y larvas de *R. arenarum* en base al cálculo de las concentraciones letales (CLs) 10, 50 y 90 para períodos de exposición agudos (48-96 h), subcrónico (168 h) y crónicos (336-504 h)
- Evaluar los efectos teratogénicos, índice teratogénico (IT), y alteraciones en el comportamiento de embriones de *R. arenarum* por exposición continua.
- Evaluar los efectos en el desarrollo, deformidades y alteraciones en el comportamiento de larvas de *R. arenarum* por exposición continua.
- Realizar una evaluación del riesgo ecológico mediante la estimación del coeficiente de riesgo (RQ) para períodos de exposición aguda y crónica.
- Determinar el potencial del formulado comercial del insecticida de modificar la respuesta de biomarcadores de neuroprotección y genotoxicidad.

4.2.3 Hipótesis

- La exposición a Confidor 70 WG ®, produce letalidad en embriones y larvas de *R. arenarum* de forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.
- La exposición continua a IMI, causa malformaciones durante el desarrollo embrionario (hidropesía, retraso en el desarrollo, incurvaciones en el eje de la cola, cambios en el comportamiento etc.) y un IT >1,5.
- El IMI causa deformidades durante el desarrollo larval ante una exposición continua.
- La magnitud de los efectos letales y subletales por exposición al IMI dependen del estadio de desarrollo en el que se encuentre el individuo.
- El IMI causa inhibición de la enzima butirilcolinesterasa.
- La exposición al IMI provoca un incremento de células con micronúcleos en larvas expuestas.
- La presencia de IMI en los cuerpos acuáticos constituye un posible riesgo ecológico para las poblaciones de *R. arenarum*.

4.3 Materiales y Métodos

4.3.1 Preparación de las soluciones de exposición

Para la evaluación de la toxicidad del IMI, se utilizó el formulado comercial Confidor 70 WG® (70% principio activo) comercializado por Bayer CropScience. Las concentraciones del formulado comercial y de la solución madre se confirmaron con un HPLC Waters 2695 equipado con una columna Phenomenex Gemini C18 (150 x 4,6 mm i.d; tamaño de partícula, 5 mm; y tamaño de poro, 110 Å) y un detector Water 2487. La fase móvil fue acetonitrilo-agua en una proporción 30:70. Así, el porcentaje de principio activo obtenido en la muestra fue del 67,37%, por lo que la diferencia entre las concentraciones nominales y las medidas fue de sólo un 2,63%.

Para la preparación de las soluciones a evaluar, primeramente se realizó una solución madre de concentración 1000 mg/L de ingrediente activo (i.a) mediante dilución del formulado sólido en solución ANFITOX (SA). A partir de esta solución se realizaron las diluciones seriadas para la obtención de las soluciones de ensayo. Las concentraciones utilizadas a lo largo del presente capítulo se encuentran expresadas en mg/L (i.a). Todas las soluciones de exposición fueron preparadas inmediatamente antes de su uso.

4.3.2 Bioensayos de toxicidad

Se realizaron 3 tipos de bioensayos:

1) Exposición continua de embriones y larvas:

La metodología general del ensayo se realizó de acuerdo a la sección 2.3.2 del Capítulo 2. Los estadios evaluados fueron embriones en estadio 2-blastómeros (E.3) y larvas en opérculo completo (E.25). Para establecer el rango de concentración para evaluar los efectos letales, malformaciones y deformidades por exposición al IMI en los bioensayos de toxicidad, se eligió como concentración máxima la de aplicación de 1000 mg/L sugerida por la etiqueta del producto. De esta manera, las concentraciones empleadas fueron 100, 250, 500, 750 y 1000 mg/L de i.a.

Diariamente, se registró mortalidad y presencia de malformaciones, alteraciones en el desarrollo, cambios en el comportamiento en los embriones a las 24, 72, y 168 h de exposición. Para embriones se estimó el IT a las 168 h. En larvas, se registró mortalidad

diaria, y deformaciones y alteraciones etológicas a las 168 h de exposición. Para ambos estadios de desarrollo se calculó el RQ por exposición aguda y crónica.

2) Exposición aguda para la evaluación del biomarcador neuroprotector:

La exposición se realizó de acuerdo a la *sección 2.3.3* del Capítulo 2. Las concentraciones seleccionadas se definieron en base al valor NOEC (100 mg/L), de efectos subletales. Así, las concentraciones fueron de 1, 30, 60 y 100 mg/L. Teniendo en cuenta que las concentraciones de IMI tras un vertido accidental en un pequeño estanque oscilan entre 0,18 y 18 mg/L (SERA 2005), la concentración mínima evaluada en este experimento (1 mg/L) se encuentra, efectivamente, en ese rango.

3) Exposición aguda para la evaluación del biomarcador de genotoxicidad:

El protocolo experimental se desarrolló de acuerdo a la *sección 2.3.4* del Capítulo 2. Las concentraciones evaluadas fueron 1, 30, 60 y 100 mg/L, al igual que en el inciso anterior.

4.4 Resultados

4.4.1 Efectos letales

La exposición a IMI causó mortalidad en embriones y larvas de *R. arenarum* en forma dependiente de la concentración y del tiempo.

Los resultados de sobrevida para embriones se encuentran representados en la Figura 4.2 A. Hasta las 48 h, no hubo mortalidad significativa en los tratamientos. A las 96 h, se observó una disminución de la sobrevida a partir de la concentración 750 mg/L ($\text{NOEC}_{\text{L-96 h}} = 500 \text{ mg/L}$ ($p > 0,05$)). Un mayor impacto en la sobrevida fue visible en tiempos crónicos de exposición. A las 336 h a partir del tratamiento de 500 mg/L hubo un 100% de mortalidad. Similares resultados se observaron a las 504 h de exposición ($\text{NOEC}_{\text{L-504 h}} = 100 \text{ mg/L}$ ($p > 0,05$))

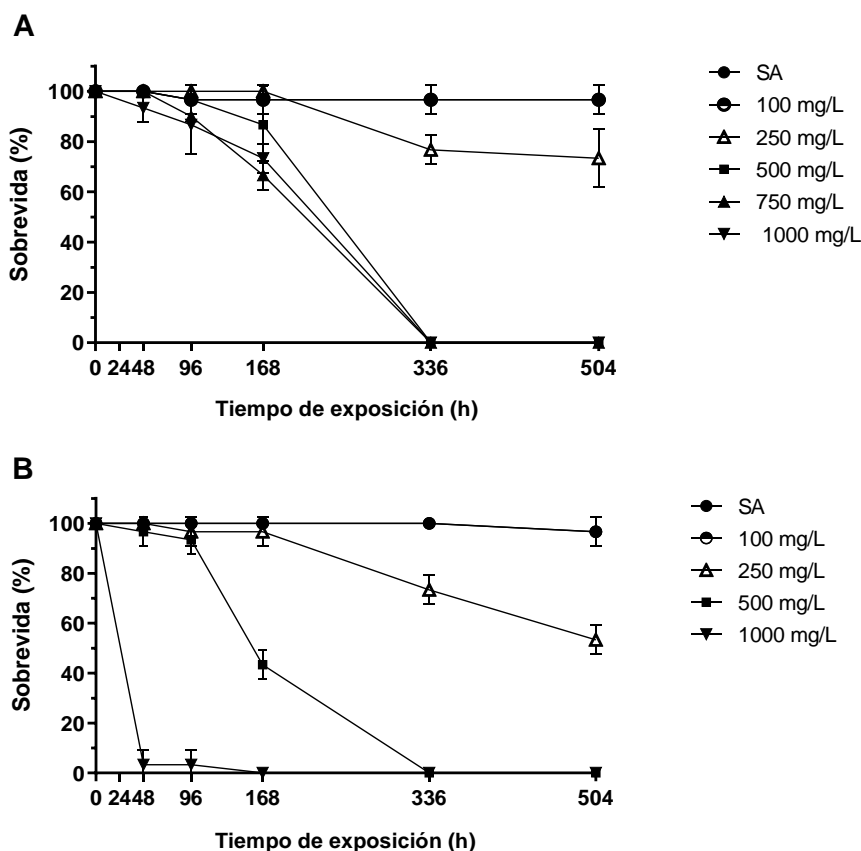


Figura 4.2 Porcentajes de sobrevivencia (%) de *R. arenarum* expuestos a imidacloprid a partir de los estadios de (A) embriones en 2-blastómeros (E.3) y (B) opérculo completo (E.25). Las barras de error indican \pm DE.

Por otro lado, las curvas de sobrevivencia de larvas se encuentran representadas en la Figura 4.2 B. A las 48 h de exposición, sólo un 3% de las larvas expuestas a 1000 mg/L sobrevivió. A las 96 h, la mortalidad aumentó ligeramente ($\text{NOEC}_{L-96 \text{ h}} = 250 \text{ mg/L}$ ($p > 0,05$)). A las 168 h, en la concentración de 500 mg/L sólo sobrevivió el 43% de los individuos mientras que la mortalidad en 1000 mg/L fue total. A las 336 h hubo un marcado incremento de la mortalidad ya que la sobrevivencia de los individuos expuestos a 250 mg/L disminuyó a un 73% y no hubo sobrevivencia en la concentración de 500 mg/L. A las 504 h el valor de sobrevivencia en 250 mg/L fue aun significativamente menor ($\text{NOEC}_{L504 \text{ h}} = 100 \text{ mg/L}$ ($p > 0,05$)).

En cuanto a los perfiles de toxicidad, la Figura 4.3 A muestra las curvas TOP de los individuos expuestos al IMI desde embriones tempranos (E.3) hasta las 504 h. Las CL_{10} , 50 y 90 a las 48 h fueron 1265,6 mg/L, 2235,1 mg/L y 3204,6 mg/L

respectivamente. La toxicidad aumentó ligeramente tras 96 h de exposición. Entonces, los valores fueron 1261,1 mg/L, 2008,8 mg/L y 2756,8 mg/L para CL10, CL50 y CL90 respectivamente. Luego de las 96 h de exposición, la sobrevivencia disminuyó bruscamente. Los valores de CLs a las 168 h fueron CL10=385,0 mg/L, CL50 = 1114,9 mg/L y CL90 = 1904,9 mg/L. A partir de las 336 h, la toxicidad continuó en aumento alcanzando valores de CL10 = 195,7 mg/L, CL50 = 337,5 mg/L y CL90 = 479,4 mg/L. A las 504 h la toxicidad se incrementó pero con un ritmo de aumento menor, con valores de CL10, 50 y 90 de 188,0 mg/L, 316,7 mg/L y 445,4 mg/L respectivamente. Al comparar los valores de CL50 al principio (48 h) y al final (504 h) de la exposición, la toxicidad del IMI aumentó 7 veces.

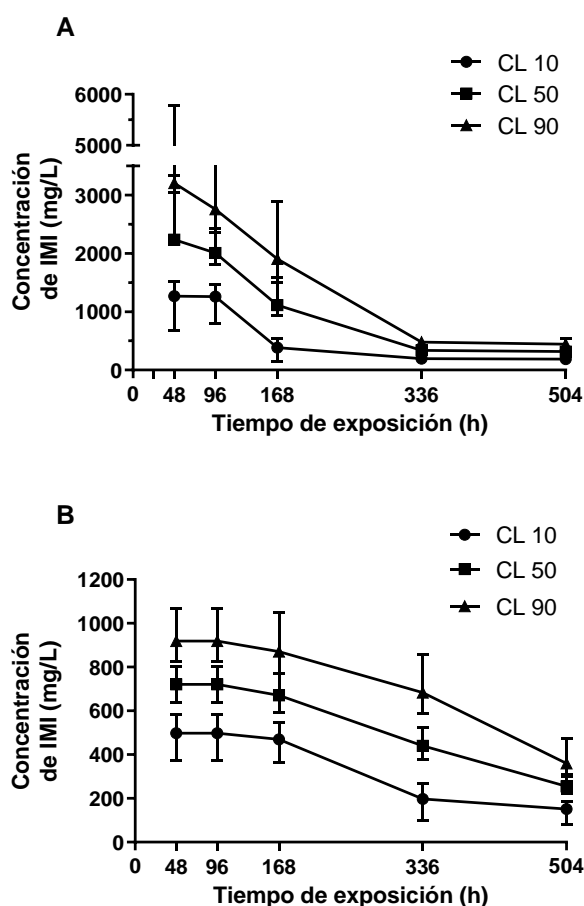


Figura 4.3 Perfiles de toxicidad de individuos de *R. arenarum* expuestos a imidacloprid (A) desde 2-blastómeros (E.3) y (B) desde larvas (estadio de opérculo completo, E.25) durante 504 h. Las barras de error indican intervalos de confianza del 95%.

Las curvas TOP para las larvas se representan en la Figura 4.3 B. Las CL10, 50 y 90 para 48 y 96 h no difirieron y alcanzaron valores de 497,7 mg/L, 720,6 mg/L y 943,5

mg/L, respectivamente. A partir de las 96 h la toxicidad aumentó ligeramente alcanzando a las 168 h valores de CL10= 469,7 mg/L, CL50=670,27 mg/L y CL90= 870,9 mg/L. Al llegar al período crónico (336 h), se registró un marcado aumento de la toxicidad del insecticida (CL10 = 197,15 mg/L, CL50 = 440,2 mg/L y CL90 = 683,3 mg/L). Hacia el final del bioensayo (504 h), se observó una tendencia similar de la toxicidad pero sin cambios significativos, siendo los valores obtenidos CL10 = 150,9 mg/L, CL50 = 255,1 mg/L y CL90 = 359,2 mg/L. Comparando los valores de CL50 a las 48 h y a las 504 h de exposición, la toxicidad del IMI para las larvas aumentó aproximadamente 2,8 veces.

Por otra parte, es interesante comparar también la sensibilidad del período embrionario y larval en términos de CL50. Tras 48 h de exposición al IMI, las larvas fueron 3 veces más susceptibles al insecticida que los embriones, mientras que en la exposición crónica los valores de CL50 para ambos estadios no difirieron ($p>0,05$).

4.4.2 Alteraciones morfológicas y etológicas

Para todos los tiempos de exposición, los individuos del grupo control no presentaron efectos subletales como malformaciones embrionarias, deformidades larvales ni alteraciones etológicas.

Tampoco se observaron alteraciones en los embriones expuestos a 100 mg/L a lo largo de todo el bioensayo, por lo que este valor se consideró el NOEC_{SL} ($p>0,05$).

Teniendo en cuenta que los efectos causados por los tratamientos de exposición a 500 y 750 mg/L en los embriones fueron similares sin diferencias significativas entre ellos, y que los embriones expuestos a concentraciones superiores a 1500 mg/L no sobrevivieron, en la Tabla 4.1 sólo se muestran los efectos subletales de los embriones expuestos a 250, 750 y 1000 mg/L de IMI. Durante las primeras 24 h, los embriones alcanzaron el estadio de gástrula tardía (E.12) (Figura 4.4 A). De estos, un 6,67% de los embriones expuestos a 250 mg/L mostraron persistencia del tapón vitelino y descamación celular (Figura 4.4 B) mientras que todos los individuos expuestos a 750 y 1000 mg/L mostraron este último efecto (Figura 4.4 C y D, Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Frecuencia (%) de embriones de *R. arenarum* con efectos subletales (malformaciones y alteraciones etológicas) luego de 24, 72 y 168 h de exposición a imidacloprid. Los datos representan el porcentaje de efectos subletales (media \pm DE). (*) Indica diferencias significativas respecto al control SA ($p < 0,05$).

(%) Efectos subletales	Tiempo de exposición (h)											
	24				72				168			
	SA	250 mg/L	750 mg/L	1000 mg/L	SA	250 mg/L	750 mg/L	1000 mg/L	SA	250 mg/L	750 mg/L	1000 mg/L
Estadio		Gástrula tardía (E.12)				Respuesta Muscular (E.18)		Inicio de Respuesta Muscular (E.18')	Brote Caudal (E.17)	Opérculo Completo (E.25)		
Retraso en el desarrollo (RD)	-	-	-	-	-	-	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	-	-	-	-
Tapón vitelino persistente	-	6,67 \pm 5,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descamación celular (DC)	-	6,67 \pm 5,77	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrusión de células vitelinas	-	-	6,67 \pm 5,77	13,33 \pm 5,77	-	-	-	-	-	-	-	-
Malformaciones severas	-	-	-	-	-	3,33 \pm 5,77	36,00 \pm 13,86	32,33 \pm 14,36	-	-	17,86 \pm 6,19	39,05 \pm 18,15
Hidropesía (H)	-	-	-	-	-	20,00 \pm 10,00	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	-	24,44 \pm 7,70	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00
Incurvaciones en la cola (IC)	-	-	-	-	-	26,67 \pm 5,77	60,67 \pm 9,24	100,00 \pm 0,00	-	7,41 \pm 12,83	95,24 \pm 8,25	89,68 \pm 9,01
Ausencia de movimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00
Total de embriones afectados (%)	0	6,67 \pm 5,77*	100,00 \pm 0,00*	100,00 \pm 0,00*	0	26,67 \pm 5,77*	100,00 \pm 0,00*	100,00 \pm 0,00*	0	27,67 \pm 4,22*	100,00 \pm 0,00*	100,00 \pm 0,00*

A las 72 h tanto los embriones del grupo control como los expuestos a 250 mg/L alcanzaron el estadio de respuesta muscular (E.18) (Figura 4.4 E y F). Sin embargo, el 100% de los individuos expuestos a concentraciones superiores mostraron un retraso en el desarrollo encontrándose los expuestos a 750 mg/L en el inicio del estadio de respuesta muscular (E.18⁻) (Figura 4.4 G, Tabla 4.1). Además, aquellos expuestos a 1000 mg/L IMI sólo alcanzaron el estadio de brote caudal (E.17) (Figura 4.4 H, Tabla 4.1). Por otro lado, el 20% de los individuos expuestos a 250 mg/L y el 100% de los expuestos a 750 y 1000 mg/L desarrollaron hidropesía (Tabla 4.1). Otra malformación visible a partir de las 72 h fue la incurvación en el eje de la cola (Figura 4.4 F) que también afectó el nado de los individuos. La frecuencia fue mayor en las concentraciones más altas (Tabla 4.1). En este período de exposición también se registraron múltiples malformaciones severas en el 36% y el 32,33% de los embriones expuestos a 750 y 1000 mg/L, respectivamente.

A las 96 h, el IT (CL50/CE50=2008,78 mg/L/186,6 mg/L) fue de 10,76 lo que indica un alto riesgo de malformaciones embrionarias en ausencia de una mortalidad significativa (ASTM, 1993).

A las 168 h, el retraso en el desarrollo registrado a las 72 h se revirtió ya que todos los tratamientos alcanzaron el estadio de opérculo completo (E.25) (Figura 4.4 I-L; Tabla 4.1). Sin embargo, se observó una notable persistencia de los efectos subletales anteriormente descritos como la hidropesía y la incurvación en el eje de la cola (Figura 4.4 J- L) y también se registraron individuos con acefalia (Figura 4.3 L). En cuanto a los efectos sobre el comportamiento, los individuos expuestos a 750 mg/L y 1000 mg/L mostraron ausencia total de movimientos (Tabla 4.1).

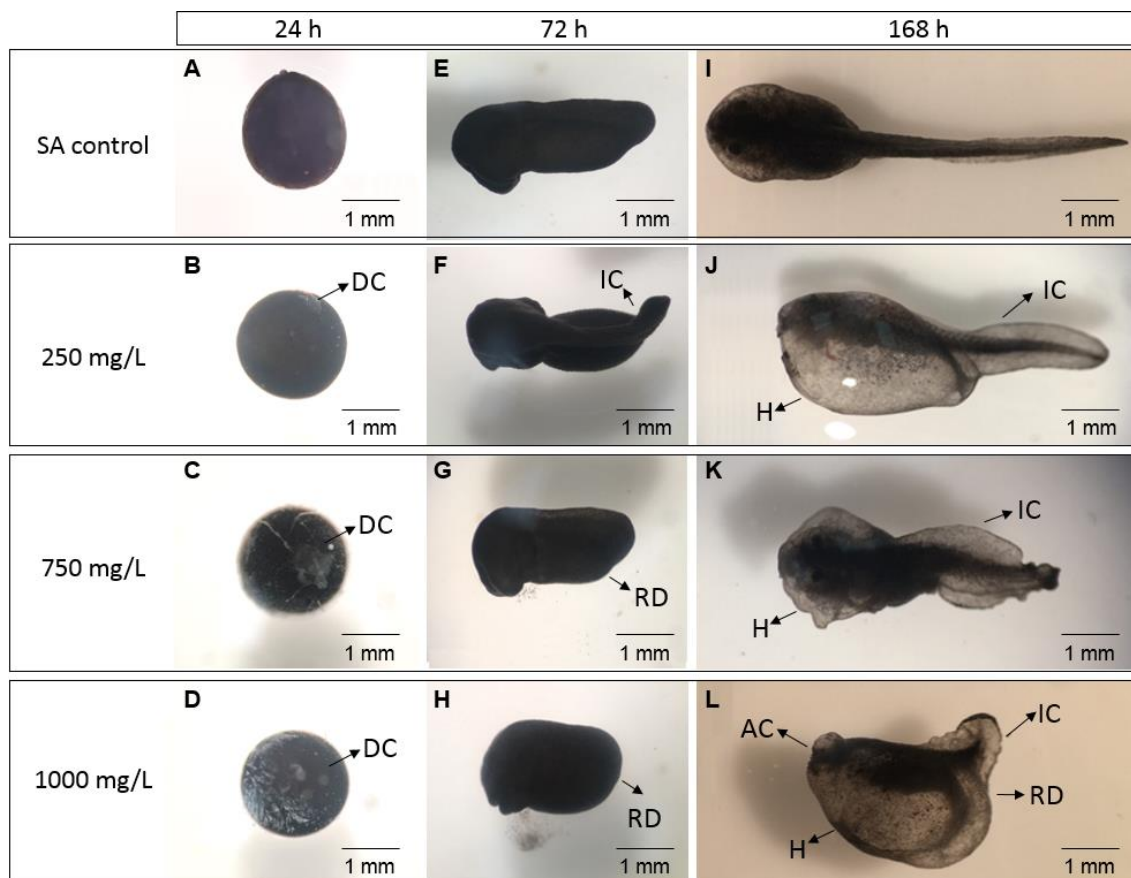


Figura 4.4 Imágenes de individuos de *R. arenarum* expuestos a imidacloprid desde el estadio de blástula temprana (E.3) a las 24, 72 y 168 h. DC: descamación celular; RD: retraso en el desarrollo; H: hidropesía; AC: acefalia; IC: incurvación en el eje de la cola.

Respecto a las alteraciones en larvas, a las 168 h de exposición los principales efectos subletales fueron hidropesía y, en consecuencia, distribución anómala del pigmento con una incidencia del $43,3 \pm 5,8\%$ en los individuos de la concentración sobreviviente más alta (500 mg/L) (Figura 4.5 B). Así mismo, se observaron modificaciones etológicas tal como movimientos débiles en una proporción del $42,5 \pm 6,6\%$.

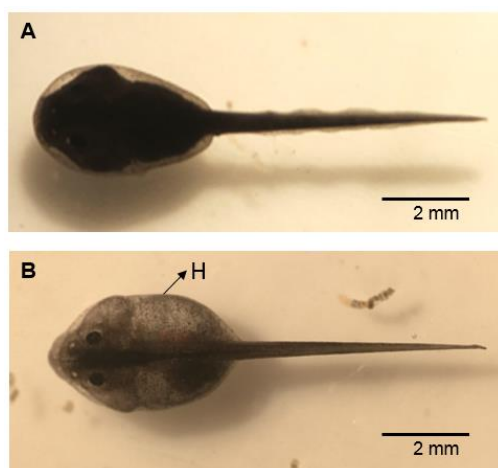


Figura 4. Imágenes de larvas de *R. arenarum* expuestas a partir del estadio de opérculo completo (E.25) a las 168 h de exposición (A) control, (B) larva expuesta a 500 mg/L de imidacloprid con hidropesía (H).

4.4.3 Evaluación del riesgo ecológico

Se evaluó el riesgo ecológico (RQ) para embriones y larvas expuestas a IMI durante períodos de exposición agudos y crónicos (Tabla 4.2). El RQ fue estimado, para tiempos agudos, como el cociente entre la concentración esperada en el ambiente (CEA) y el valor de la CL50 y, para tiempos crónicos se calculó como el cociente entre la CEA y el valor NOEC_L. Por bibliografía la CEA en aguas superficiales a las 96 h es de 0,036 mg/L y a las 504 h es de 0,017 mg/L (SERA 2005). Los valores de RQ fueron comparados con los niveles de preocupación de USEPA (LOC) para organismos acuáticos que, para exposiciones agudas es de 0,5 y, para exposiciones crónicas es de 1. Para ambos estadios, ya sea por exposición aguda o crónica, los valores de RQ fueron menores que el valor LOC.

Tabla 4.2 Toxicidad y Cociente de Riesgo (RQ) ecológico del imidacloprid para individuos de *R. arenarum* expuestos desde estadio de embriones en 2-blatómeros (E.3) y desde opérculo completo (E.25).

Estadio	Tiempo de Exposición (h)					
	96			504		
	CL 50 (mg/L)	CEA (mg/L) Aguas superficiales	RQ	NOEC (mg/L)	CEA (mg/L) Aguas superficiales	RQ
Embriones (E.3)	2008,78	0,036	$1,79 \times 10^{-5}$	100	0,017	$1,7 \times 10^{-4}$
Larvas (E.25)	720,58	0,036	$4,99 \times 10^{-5}$	100	0,017	$1,7 \times 10^{-4}$

4.4.4 Actividad de Butirilcolinesterasa

La actividad de la enzima BChE de los homogenatos de larvas expuestas durante 96 h a 60 y 100 mg/L de IMI mostraron una disminución significativa, de un 35% y un 65%, respectivamente, en comparación al control SA ($p < 0,05$). Por otra parte, la actividad enzimática en los individuos expuestos a 1 y 30 mg/L no mostró diferencias ($p > 0,05$) (Figura 4.6).

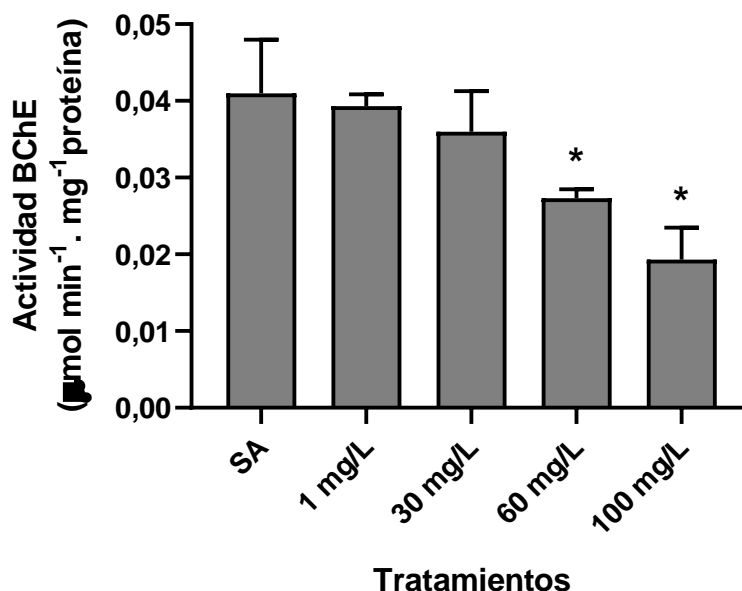


Figura 4.6 Actividad de la enzima BChE de larvas de *R. arenarum* expuestas a imidacloprid durante 96 h. SA: Control negativo solución ANFITOX. Las barras de error indican \pm DE. (*) Indica diferencias significativas respecto al control SA ($p < 0,05$).

4.4.5 Ensayo de micronúcleos

En ambos tiempos de exposición evaluados, el IMI causó daño en el ADN de las larvas en todas las concentraciones ensayadas. Después de 48 h, el insecticida indujo un aumento significativo de eritrocitos micronucleados de los individuos expuestos a 1, 30, 60 y 100 mg/L ($p<0,05$) (Figura 4.7 A). Comparando la frecuencia basal del control con la observada en la concentración más baja ensayada (1 mg/L), la exposición al IMI duplicó la incidencia de MNs.

Las larvas expuestas durante 96 h al insecticida también mostraron un aumento significativo en el número de eritrocitos micronucleados en comparación con el control SA en todos los tratamientos ($p<0,05$) (Figura 4.7 B). La frecuencia de MNs observada en 1 mg/L fue aproximadamente 1,6 veces mayor que la frecuencia basal del control SA.

Para todos los ensayos, la ciclofosfamida (CF) demostró ser un control positivo eficaz ya que causó un aumento significativo de la frecuencia de eritrocitos micronucleados ($p<0,05$).

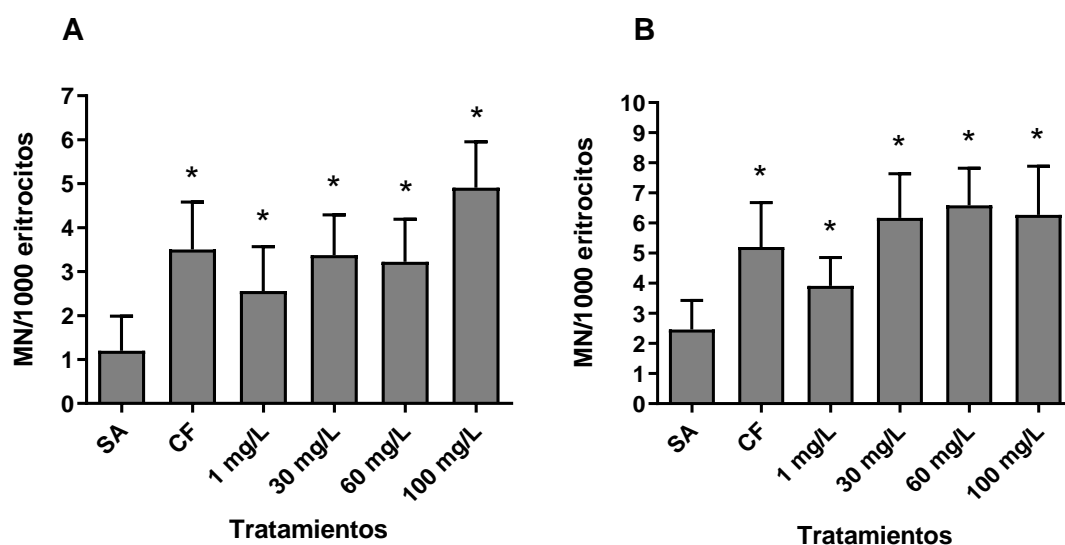


Figura 4.7 Frecuencia de micronúcleos (MNs) en eritrocitos de larvas de *R. arenarum* expuestas a diferentes concentraciones de imidacloprid durante **(A)** 48 h y **(B)** 96 h. SA: Control negativo solución ANFITOX; CF: Control positivo ciclofosfamida 40 mg/L. Las barras de error indican \pm DE. (*) Indica diferencias significativas respecto al control negativo SA ($p<0,05$).

4.5 Discusión

El presente estudio aborda la evaluación de la toxicidad del IMI durante el desarrollo embrio-larval del anfibio autóctono *Rhinella arenarum* de una manera integral. Mediante la combinación de bioensayos de toxicidad estandarizados y la evaluación de biomarcadores de efecto, se determinó que el IMI es una sustancia que causa efectos perjudiciales en esta especie.

No sólo se analizaron los efectos letales, sino que también se realizó una descripción detallada de las alteraciones producidas por la exposición de los estadios de desarrollo temprano (E.3 y E.25) al IMI en combinación con el uso de pruebas de alteración de una enzima neuroprotectora y genotoxicidad en un rango de concentraciones subletales.

En los embriones, la tendencia observada en las curvas TOP indica un marcado aumento de la toxicidad en relación al tiempo de exposición durante las primeras 336 h. Luego, la toxicidad permaneció prácticamente constante (Figura 4.3). Al contrastar la CL de las primeras 48 h con respecto a la CL al final de la exposición, la toxicidad del IMI se incrementó 7 veces ($CL_{50_{48h}} = 2235,1 \text{ mg/L}$; $CL_{50_{504h}} = 316,7 \text{ mg/L}$). Esta comparación pone de manifiesto la importancia de incluir tiempos de exposición crónica en el estudio del perfil de toxicidad de una sustancia, ya que los efectos pueden demorar en ser detectados. No se cuenta con bibliografía disponible sobre la toxicidad del IMI en embriones de anfibios que nos permitan comparar la sensibilidad de *R. arenarum* en este periodo de desarrollo con otras especies. En cambio, sólo hay estudios de toxicidad en peces. Por ejemplo, en embriones de la carpa común *Cyprinus carpio* (Linnaeus) la $CL_{50_{48h}}$ fue de 78 mg/L (Tyor et al. 2016) y para el pez cebra *Danio rerio* la $CL_{50_{96h}}$ fue de 121,6 mg/L (Wu et al. 2018). Entonces, los embriones de *R. arenarum* parecen ser más resistentes a la exposición al IMI que otras especies de vertebrados acuáticos. La escasez de trabajos que analicen las primeras etapas del desarrollo de los anfibios resalta la importancia de este trabajo como una contribución fundamental para entender la susceptibilidad de los anfibios a uno de los insecticidas más utilizados en el mundo.

Por otro lado, las malformaciones embrionarias y deformidades larvarias por exposición a IMI no se han estudiado suficientemente en los vertebrados acuáticos. Howard et al. (2002) analizaron la exposición de embriones de diferentes especies de anfibios (*Rana Pipiens*, *Bufo americanus* y *Ambystoma jeffersonianum*) al insecticida

pero no observaron ninguna alteración tras la exposición a diluciones seriadas de la CL50 de cada especie. Sin embargo, estudios recientes en embriones de *C. carpio* expuestos durante diferentes tiempos de exposición han encontrado resultados interesantes. Los individuos expuestos a 1 mg/L del insecticida presentaron subdesarrollo de la cola luego de 48 h de exposición y, también malformaciones del cuerpo y cabeza e hidropesía tras 72 h de exposición (Islam et al. 2019). En el caso de *R. arenarum*, se observaron algunos efectos similares, ya que los embriones también presentaron anomalías en la región de la cola, como incurvaciones, malformaciones severas de la estructura corporal, incluso individuos acefálicos e importante incidencia de hidropesía

A diferencia de los embriones, las larvas de anfibios son utilizadas con mayor frecuencia en los estudios de toxicidad de este plaguicida. En larvas de *Rana nigromaculata* Hallowell, la CL50_{48h} reportada fue de 219 mg/L (Feng et al. 2004) y para *Rana limnocharis* fue de 307,70 mg/L (Nian et al. 2009). Comparando la CL50_{48h} de larvas del sapo *Bufo americanus* cuyo valor es 468 mg/L (Howard et al. 2002) con la CL50_{48h} de larvas de *R. arenarum* de valor 720,6 mg/L, ésta especie es 1,5 veces más resistente al IMI. Howard et al. (2002) también evaluaron la alteración del crecimiento de las larvas de *B. americanus* expuestas a 0,0046-0,234 mg/L de IMI, pero no detectaron ningún efecto. En cuanto a los efectos subletales, hay poca información sobre anfibios que permita la comparación con los resultados aquí presentados. En el pez *C. carpio* Islam et al. (2019) informaron entre otros efectos, presencia de hidropesía en larvas expuestas a 1 mg/L de IMI después de 24 h y 96 h. En las concentraciones evaluadas en el presente trabajo, la presencia de individuos con hidropesía se registró en la concentración de 500 mg/L. Las larvas de anfibios tienen que mantener un equilibrio osmótico y electrolítico constante entre su fluido corporal y el medio circundante. La distensión de la cavidad corporal por los fluidos (hidropesía) en las larvas expuestas representa una perturbación de dicho sistema de regulación osmótica.

Por otra parte, comparando los dos estadios de desarrollo de *R. arenarum* aquí evaluados (es decir, E.3 y E.25), las larvas son aproximadamente 3 veces más susceptibles a la exposición a IMI que los embriones en tiempos de exposición aguda (48 h) (CL50_{48h} embriones = 2235,1mg/L vs. CL50_{48h} larvas = 720,6 mg/L). Esta diferencia podría deberse a que las larvas tienen el sistema nervioso mucho más desarrollado que los embriones, sistema *blanco* de los insecticidas neonicotinoides. Además, las larvas recién eclosionadas representan una etapa especialmente crítica y sensible, ya que al eclosionar

pierden su membrana embrionaria que actúa como barrera física por lo que están directamente en contacto con el medio contaminado e incluso comienzan a alimentarse y respirar a través de las branquias, por lo que presentan más vías de ingreso para el insecticida. Una vez que los individuos expuestos desde E.3 alcanzan el estadio larval, las diferencias de toxicidad disminuyen. Esto se evidencia en que a las 504 h no existe diferencia significativa en la susceptibilidad de los individuos expuestos desde embriones tempranos y desde larvas ($CL_{50_{504h}}$ embriones = 316,7 mg/L vs. $CL_{50_{504h}}$ larvas = 255,1 mg/L; $p > 0,05$).

Aunque las CL_{50} s acá reportadas, así como las concentraciones a las que se observaron malformaciones exceden los valores de IMI esperados en aguas superficiales ($CEA = 0,036$ mg/L agudo y $0,017$ mg/L crónico, USEPA 2013), es importante realizar evaluaciones de toxicidad en un rango de concentraciones no ambientales para entender el alcance de la toxicidad de esta sustancia y ya que también pueden darse en cuerpos de agua someros como consecuencia de almacenaje, disposición y manipulación inadecuada de los agroquímicos así como también por derrames accidentales.

Teniendo en cuenta que el mecanismo de acción del IMI implica efectos tóxicos sobre el sistema nervioso y que se considera seguro para los vertebrados por su selectividad por receptores de insectos (Badgujar et al. 2013), es de gran relevancia estudiar el efecto sobre mecanismos neuroprotectores del sistema nervioso de vertebrados pequeños como lo son los anfibios. Sin embargo, hasta el momento, no hay bibliografía disponible que demuestre efectos neurotóxicos de esta sustancia en anfibios ya que el análisis de la actividad de la enzima AChE en larvas de *Rana catesbeiana* expuestas a 100 ng/L durante 8 semanas no mostró ningún cambio (Ríos et al. 2017). Para otros vertebrados acuáticos como *Oncorhynchus mykiss*, la actividad cerebral de la AChE disminuyó después de 21 días de exposición a 10 y 20 mg/L (Topal et al. 2017) y en músculo de *Astyanax altiparanae* se observaron resultados similares después de 96 h de exposición a concentraciones ambientales de 5,94 y 53,95 μ g/L de IMI (Almeida et al. 2021). Por lo tanto, estos antecedentes sugieren que este insecticida puede afectar el sistema nervioso de los vertebrados a concentraciones ambientales y no ambientales. Por otro lado, se sabe que la enzima BChE tiene un importante papel neuroprotector porque puede hidrolizar compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos que contienen ésteres de ácido carboxílico o fosfórico desintoxicando los compuestos anticolinesterásicos antes de que inhiban a la enzima AChE en sitios con una función biológica crucial como el cerebro,

donde se localiza principalmente (Çokuğraş, 2003). Por esta razón, es de interés estudiar si la BChE también puede verse afectada por la presencia de plaguicidas como el IMI en el ambiente. Los resultados aquí presentados evidencian que tras 96 h de exposición a 60 y 100 mg/L de IMI, la actividad BChE de las larvas de *R. arenarum* disminuye en un 34% y 53% respectivamente en comparación con el control SA ($p < 0,05$) (Figura 4.6). Estos resultados sugieren que la BChE también es sensible a los insecticidas neonicotinoides y puede ser considerada como una herramienta útil para detectar efectos tempranos de la exposición al IMI. Por otro lado, es interesante relacionar la inhibición de la actividad de esta enzima con los efectos subletales observados en los individuos expuestos a partir de embriones y larvas a las 168 h. Como se ha mencionado anteriormente, en este momento, los individuos expuestos a partir de embriones han alcanzado el periodo larval y su sistema nervioso está completamente desarrollado. Como se pudo observar, a las concentraciones de 750 y 1000 mg/L, todos los individuos presentan ausencia total de movimiento (Tabla 4.1). En el caso de las larvas expuestas a 500 mg/L, hubo un gran porcentaje de individuos con movimientos débiles.

Por último, para evaluar el daño en el ADN se estudió la respuesta de un biomarcador comúnmente utilizado, el ensayo de micronúcleos (MNs), tras 2 tiempos de exposición aguda (48 y 96 h). El ensayo de MNs es una herramienta muy útil que puede detectar el potencial efecto genotóxico de sustancias que alteran la estructura cromosómica o su segregación durante la anafase (Savage 1988). Los resultados aquí presentados proporcionan información útil sobre la genotoxicidad del IMI. Independientemente del tiempo de exposición, se demostró que este insecticida es capaz de aumentar el número de eritrocitos micronucleados de las larvas de *R. arenarum* para todas las concentraciones probadas en este estudio (Figura 4.7). Esto significa que el efecto genotóxico del IMI puede ser detectado después de un tiempo de exposición muy corto de 48 h. La genotoxicidad de este insecticida ha sido reportada para larvas de *Rana nigromaculata* Hallowell expuestas durante 7 días en concentraciones entre 8 y 32 mg/L (Feng et al. 2004). En *Hypsiboas pullchellus*, se observó un aumento en el número de MNs en los eritrocitos de las larvas expuestas a 15 y 30 mg/L durante 48 h, pero a las 96 h, el incremento sólo se observó para 30 mg/L (Ruiz de Arcaute et al. 2014). En contraste con estos hallazgos, los resultados de esta tesis aportan información adicional relevante porque muestran que el IMI incluso a una concentración mucho menor (1 mg/L) y posible bajo condiciones de derrame en el ambiente, causó un aumento del daño cromosómico.

Teniendo en cuenta que una utilidad de este biomarcador es la predicción del riesgo carcinogénico, ya que se ha demostrado una correlación positiva entre ambos, no se puede descartar este posible efecto relacionado con la exposición a IMI (Duffaud et al. 1999).

Un punto interesante a destacar es que los valores del coeficiente de riesgo (RQ) aquí estimados para embriones y larvas tanto en exposición aguda o crónica arrojaron valores por debajo del valor de preocupación (LOC) (Tabla 4.2) lo cual indica que bajo este parámetro el IMI no constituiría un riesgo para el período embrio-larval de la especie. Sin embargo, aquí se demostró que el IMI podría afectar directamente a diferentes etapas del desarrollo de *R. arenarum* causando letalidad, y también efectos subletales como malformaciones, alteración de mecanismos neuroprotectores y efectos genotóxicos, que podrían influir indirectamente en la aptitud y la supervivencia, y posiblemente reducir la salud, densidad y distribución de la población con el tiempo. Teniendo en cuenta que el IMI se ha introducido en el mercado como sustituto de antiguos insecticidas como los organofosforados y los organoclorados, se espera que su uso tenga un aumento exponencial (Bagri et al. 2016) y por lo tanto los anfibios estarán más expuestos a él incrementando el riesgo. Este trabajo contribuye no solo a entender cómo esta sustancia puede afectar a los anfibios, sino que también ayuda a desarrollar estrategias de gestión para resolver complejos problemas de conservación teniendo en cuenta que su situación ecológica es alarmante.

4.6 Conclusiones

- La exposición a Confidor 70 WG® causó mortalidad en embriones y larvas de *R. arenarum* con un patrón de respuesta dependiente del tiempo y de la concentración de exposición.
- La exposición continua a IMI causó malformaciones durante el desarrollo embrionario, retraso en el desarrollo en la exposición aguda, incurvaciones, etc. El IT fue >1,5 lo que indica una gran capacidad teratogénica del insecticida.
- El IMI causó hidropesía en larvas expuestas de manera continua.
- La magnitud de los efectos letales y subletales por exposición al IMI fueron dependientes del estadio de desarrollo. En períodos agudos de exposición el período de desarrollo embrionario fue más sensible que el larval pero una vez que los embriones alcanzaron el estadio de larva, no se observaron diferencias en la susceptibilidad.

- El IMI causó inhibición de la enzima BChE en las larvas expuestas a concentraciones de 60 y 100 mg/L.
- La exposición al IMI causó un incremento de células con MNs en larvas expuestas en todo el rango de concentraciones evaluadas luego de 48 y 96 h de exposición.
- El valor de RQ no indica riesgo del IMI para las poblaciones de *R. arenarum*. Sin embargo, la magnitud de los efectos observados, especialmente la respuesta de los biomarcadores de neuro y genotoxicidad en concentraciones esperables en el ambiente demuestra que este plaguicida no es seguro para los estadios tempranos del desarrollo de *R. arenarum*.

Capítulo 5

Evaluación de la
toxicidad de un
formulado comercial de
cletodim sobre el
desarrollo embrio-
larval de *Rhinella*
arenarum

5.1 Introducción

La necesidad de incrementar el rinde de producción de alimentos para poder proveer a la población humana en crecimiento exponencial, deviene en un aumento del uso de plaguicidas, entre ellos los herbicidas (Duke, 2015). El herbicida cletodim (CLET) se registró por primera vez en el año 1991 (CalEPA, 2010). Actualmente existen numerosas formulaciones comerciales en distintas concentraciones de este ingrediente activo (i.a) que oscilan entre 12,4% y 36,7% (Thistle, 2014).

Se trata de un herbicida selectivo para el control post-emergencia de las malezas anuales o perennes. Se utiliza para el control de *Bromus sp.*, *Vulpia myuros*, *Schismus barbatus*, entre otras, en una gran variedad de cultivos entre los que se encuentran la soja, el algodón, la alfalfa, papa, lechuga, espinaca, girasol, arándanos, lúpulo, etc. (USEPA, 2014).

El CLET pertenece a la familia de herbicidas del grupo ciclohexadiona y es el nombre común que se le da a la 2-(1-((3-cloro-2-propenil)oxi)imino)propil)-5-(2-(4(etiltio)propil)-3-hidroxi-2-ciclohexen-1-ona (Thistle, 2014) (Figura 5.1).

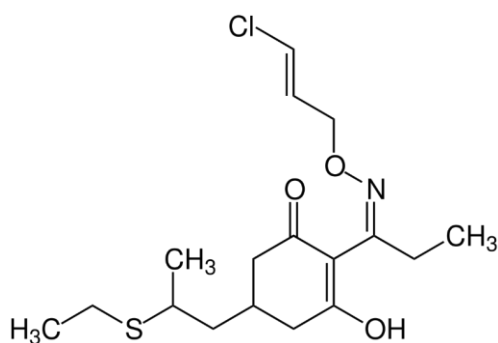


Figura 5.1 Estructura química del cletodim (CLET).

En cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, posee una presión de vapor baja ($<1 \times 10^{-7}$ mmHg) por lo cual es poco probable que se volatilice significativamente. Respecto a la capacidad de bioacumulación, presenta un coeficiente de partición octanol-agua relativamente alto (log Kow 4,51 a 20°C) lo que indica una solubilidad moderada en lípidos. El CLET es soluble y estable en agua con una vida media promedio de 184 días. Asimismo, se adsorbe poco en suelo (Thistle, 2014). Estas características, hacen que, como otros herbicidas, puedan alcanzar cuerpos de agua y convertirse en un potencial contaminante de los ecosistemas acuáticos (Villaverde et al. 2018).

En lo que respecta a su mecanismo de acción, una vez que es aplicado sobre la planta, se trasloca rápidamente a su xilema y floema acumulándose en las zonas meristemáticas de los tallos, hojas y raíces, donde inhibe la actividad de la enzima acetil-coenzima A carboxilasa, interfiriendo en el metabolismo de lípidos y síntesis de membranas celulares, ocasionando la muerte de las plantas tratadas (Robles et al. 2001).

Si bien el CLET es un herbicida ampliamente utilizado en el mundo, no existen reportes de concentraciones en muestras de aguas ambientales (Brêda-Alves et al. 2020). Sin embargo, según la USEPA, las Concentraciones Esperadas en el Ambiente (CEA)s de este plaguicida alcanzan valores de 0,33 mg/L para períodos agudos post-aplicación en campo, y 0,137 mg/L para períodos crónicos (USEPA, 2014). Asimismo, se estima que se pueden encontrar valores entre 0,06 y 7,5 mg/L de CLET en cuerpos de agua someros debido a derrames accidentales durante la manipulación, almacenaje y disposición de este herbicida (USEPA, 2014).

La USEPA coloca al CLET en categorías de baja toxicidad para la mayoría de las vías de exposición aguda. Por contacto dermal o inhalación, pertenece al grupo IV y, por ingestión y contacto con ojos al grupo III (USEPA, 2014). En cuanto a su carcinogenicidad, es clasificado como grupo E, probable no cancerígeno para humanos (USEPA, 2014).

Mientras que los datos sobre la toxicidad del CLET en mamíferos son más accesibles, no existe información para la mayoría de los demás grupos de animales. Esta carencia es particularmente notoria en invertebrados acuáticos, peces y anfibios. Según la USEPA, el CLET es prácticamente no tóxico para mamíferos, aves, abejas y peces y moderadamente tóxico para invertebrados acuáticos (USEPA, 2014).

Los valores de concentraciones letales (CL)s encontrados en bibliografía, corresponden a estudios realizados por organismos oficiales en procesos de regulación del CLET, pero prácticamente son inexistentes estudios de evaluación de la toxicidad con fines de protección de las especies. La mayoría de las referencias comprobables en vertebrados acuáticos tienen que ver con estudios realizados en embriones y larvas de *Pimephales promelas* que arrojaron valores de CL₅₀_{96h} de 71,9 mg/L y 110 mg/L, respectivamente (Bidinotto, 2003). Por otro lado, para *Oncorhynchus mykiss*, el valor de CL₅₀_{96h} reportado es de 19 mg/L (Swigert, 1986). Recientemente, se han realizado estudios en *Danio rerio* que mostraron que el CLET es capaz de causar letalidad en

embriones tempranos ($CL_{50_{120h}}=100 \mu\text{g/L}$) y una serie de malformaciones y anomalías que van desde hidropesía en el saco vitelino a las 96 h para concentraciones de $300 \mu\text{g/L}$, disminución de la longitud del cuerpo en concentraciones entre 50 y $500 \mu\text{g/L}$ y malformaciones en la columna vertebral en concentraciones de $300 \mu\text{g/L}$ (Xiong et al. 2019). También se reportó malformaciones craneales y cardiovasculares en embriones tempranos expuestos a un rango de concentraciones entre 10 y 30 mg/L con un incremento de la frecuencia de malformaciones concentración-dependiente (Wang et al. 2019). Asimismo, se observó inhibición de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en todo el rango de concentraciones evaluado (Wang et al. 2019).

No se cuentan con registros en otras especies sobre la capacidad de este plaguicida de causar letalidad, malformaciones embrionarias, deformidades larvarias, alteraciones en mecanismos neuroprotectores, genotoxicidad, o ningún otro efecto fisiológico.

En cuanto al uso del CLET en el mundo, la USGS estima que en el año 2009 la cantidad utilizada en EEUU osciló entre las 272 y 408 toneladas (USGS, 2013). En Brasil también es un herbicida muy utilizado (Brêda-Alves et al. 2020) mientras que en Argentina su uso se encuentra en un crecimiento francamente exponencial. En el año 2006 la cantidad importada fue de 143 toneladas, mientras que en el año 2020 el volumen fue 85 veces mayor alcanzando las 12.289 toneladas (SENASA, 2006; SENASA, 2020). En relación con la forma de empleo del CLET, el método más común de aplicación implica aspersión foliar directa o indirecta mediante mochilas o maquinaria aérea y terrestre (Thistle, 2014). La dosis de utilización propuesta por la mayoría de los formulados fluctúa entre los 0,55 y $1,4 \text{ kg de i.a/ha}$ con un máximo de 18 aplicaciones durante una estación (USEPA, 2014).

El formulado de CLET aquí evaluado se trata de Select®, comercializado por la empresa Arysta LifeScience S.A. Se trata de un formulado cuya concentración de i.a es 24% y que se presenta en forma líquida.

El formulado Select® se encuentra ampliamente distribuido en el mercado fitosanitario argentino. En cuanto a su aplicación, los fabricantes recomiendan su aplicación por aspersión mediante maquinaria terrestre con un rinde entre 100 y 150 l/ha o por aviones aplicando no menos de 25 l/ha . Está indicado para la eliminación de malezas

como *Echinochloa crus-galli*, *Digitaria sanguinalis*, *Eleusine indica*, *Sorghum halepense* y *Cynodon dactylon*, entre otros, en cultivos como alfalfa, algodón, soja, girasol y maní.

Teniendo en cuenta la magnitud de los valores de CLET presentes en el mercado argentino, y el limitado número de estudios que evalúan la toxicidad de este plaguicida en animales, particularmente anfibios, el objetivo del presente capítulo fue determinar los efectos letales y subletales del formulado comercial Select® durante el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum* en forma integrada con el análisis de la respuesta de biomarcadores asociados a la neuroprotección y genotoxicidad mediante medición de la actividad de la enzima butirilcolinesterasa (BChE) y el ensayo de micronúcleos (MN), respectivamente, como indicadores de los efectos fisiológicos perjudiciales por exposición a concentraciones de rango subletal.

5.2 Objetivos e Hipótesis

5.2.1 Objetivos generales

En base a los antecedentes planteados en la sección anterior, se propone:

Caracterizar la toxicidad de un formulado comercial a base del principio activo cletodim (Select®, 24% ingrediente activo) en el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*, evaluando los efectos letales, malformaciones embrionarias y deformidades larvarias, así como también alteraciones en la respuesta de biomarcadores de neuroprotección y genotoxicidad.

5.2.2 Objetivos específicos

- Obtener el perfil de toxicidad de CLET (curvas TOP) para embriones y larvas de *R. arenarum* en base al cálculo de las concentraciones letales (CLs) 10, 50 y 90 para períodos de exposición agudos (48-96 h), subcrónico (168 h) y crónicos (336-504 h).
- Evaluar los efectos teratogénicos, índice teratogénico (IT), y alteraciones en el comportamiento de embriones de *R. arenarum* por exposición continua.
- Evaluar los efectos en el desarrollo, deformidades y alteraciones en el comportamiento de larvas de *R. arenarum* por exposición continua.

- Realizar una evaluación del riesgo ecológico mediante la estimación del coeficiente de riesgo (RQ) para períodos de exposición aguda y crónica.
- Determinar el potencial del formulado comercial del herbicida de modificar las respuestas de biomarcadores de neuroprotección y genotoxicidad.

5.2.3 Hipótesis

- La exposición a CLET causa letalidad en embriones y larvas de *R. arenarum* de forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.
- La exposición continua a CLET causa malformaciones durante el desarrollo embrionario (hidropesía, retraso en el desarrollo, incurvaciones en el eje de la cola, cambios en el comportamiento etc.) y un IT >1,5.
- La exposición continua al CLET produce deformidades durante el desarrollo larval.
- La magnitud de los efectos subletales por exposición al CLET es estadio-dependiente.
- La actividad de la enzima butirilcolinesterasa es inhibida por exposición al CLET.
- La exposición al CLET causa aumento de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de larvas expuestas.
- La presencia de CLET en los cuerpos acuáticos constituye un posible riesgo ecológico para las poblaciones de *R. arenarum*.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Preparación de las soluciones de exposición

La evaluación de la toxicidad del CLET se realizó utilizando el formulado comercial Select® (24% principio activo) comercializado por Arysta LifeScience S.A.

Las soluciones a evaluar se obtuvieron por dilución de una solución madre de concentración 100 mg/L de ingrediente activo (i.a) en solución ANFITOX (SA). Las concentraciones utilizadas a lo largo del presente capítulo se encuentran expresadas en mg/L (i.a). Todas las soluciones de exposición fueron preparadas inmediatamente antes de su uso.

5.3.2 Bioensayos de toxicidad

Los bioensayos realizados se detallan a continuación:

1) Exposición continua de embriones y larvas:

La metodología se realizó de acuerdo a la *sección 2.3.2* del Capítulo 2. Los estadios evaluados fueron embriones en estadio 2-blastómeros (E.3) y larvas en opérculo completo (E.25). El rango de concentraciones a ensayar se estableció a partir de ensayos preliminares de toxicidad. Las concentraciones para evaluar la toxicidad en embriones fueron 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 20 y 40 mg/L y para larvas 1, 5, 2,5, 5, 7,5, 10, 20 y 40 mg/L.

Se registró diariamente la mortalidad y, la presencia de malformaciones embrionarias, deformidades larvarias y cambios en el comportamiento a las 168 h de exposición. Para embriones se estimó el IT a las 96 h. Para ambos estadios del desarrollo se calculó el RQ por exposición aguda y crónica.

2) Exposición aguda para la evaluación del biomarcador neuroprotector (BChE):

La exposición se realizó de acuerdo a la *sección 2.3.3* del Capítulo 2. Las concentraciones de exposición se definieron por debajo del valor NOEC de efectos subletales (7,5 mg/L). Por ello, las concentraciones evaluadas fueron: 0,01, 0,5, 1 y 1,5 mg/L. Teniendo en cuenta que la CEA para tiempos agudos luego de la aplicación es de 0,33 mg/L (USEPA, 2014) y que se estima que la concentración por derrames puede oscilar entre 0,06 y 7,5 mg/L (SERA, 2014), el rango evaluado comprende valores esperados en el ambiente bajo distintos escenarios.

3) Exposición aguda para la evaluación del biomarcador de genotoxicidad (frecuencia de MNs):

El protocolo experimental se desarrolló de acuerdo a la *sección 2.3.4* del Capítulo 2. Las concentraciones evaluadas fueron 0,01, 0,5, 1 y 1,5 mg/L.

5.4 Resultados

5.4.1 Efectos letales

La exposición de embriones y larvas de *R. arenarum* al CLET causó mortalidad en ambos estadios en forma concentración y tiempo dependiente.

En embriones, las curvas de sobrevivencia de los tratamientos se encuentran representadas en la Figura 5.2A. A las 48 h, los individuos expuestos a 20 mg/L mostraron una disminución abrupta de la sobrevivencia siendo del 33% ($p < 0,05$). A las 96 h, la mortalidad de esta concentración fue total. Por otro lado, los demás tratamientos no mostraron diferencias significativas respecto al control SA ($\text{NOEC}_{\text{L-96h}} = 10 \text{ mg/L}$). A las 168 h se produjo una ligera disminución de la sobrevivencia para las concentraciones de 7,5 y 10 mg/L. En períodos crónicos de exposición se observa un incremento significativo de la toxicidad a partir de 1 mg/L. A las 504 h, el 80% de los individuos expuestos a 1 mg/L sobrevivió, mientras que para 2,5 mg/L la cantidad de individuos vivos fue ligeramente menor. Las concentraciones de 5 y 7,5 mg/L mostraron un 53% de sobrevivencia mientras que en 10 mg/L sólo un 23% ($\text{NOEC}_{\text{L-504h}} = 0,5 \text{ mg/L}$; $p > 0,05$).

Para el caso de larvas (Figura 5.2B), a las 48 h, sólo sobrevivió un 33% de los individuos expuestos a la concentración de 20 mg/L ($p < 0,05$) mientras que la concentración de 40 mg/L mostró 100% de mortalidad. El resto de las concentraciones, mostró un número de individuos vivos similar a la del control. A las 96 h, hubo una marcada disminución de la sobrevivencia. En 20 mg/L no hubo individuos sobrevivientes mientras que en 15 mg/L sólo persistió el 56,6%. Además la concentración de 10 mg/L mostró un porcentaje significativamente menor de sobrevivencia, cercano al 73% ($\text{NOEC}_{\text{L-96h}} = 5 \text{ mg/L}$; $p > 0,05$). A las 168 h, la toxicidad se incrementó marcadamente ya que ningún individuo perteneciente a las concentraciones de 15 y 20 mg/L sobrevivió. Mientras que sólo el 30% persistió en el caso de 10 mg/L. El resto de las concentraciones remanentes no difirió respecto al control SA. En tiempos crónicos de exposición, se observó mortalidad significativa a partir de 5 mg/L ($\text{NOEC}_{\text{L-504h}} = 2,5 \text{ mg/L}$).

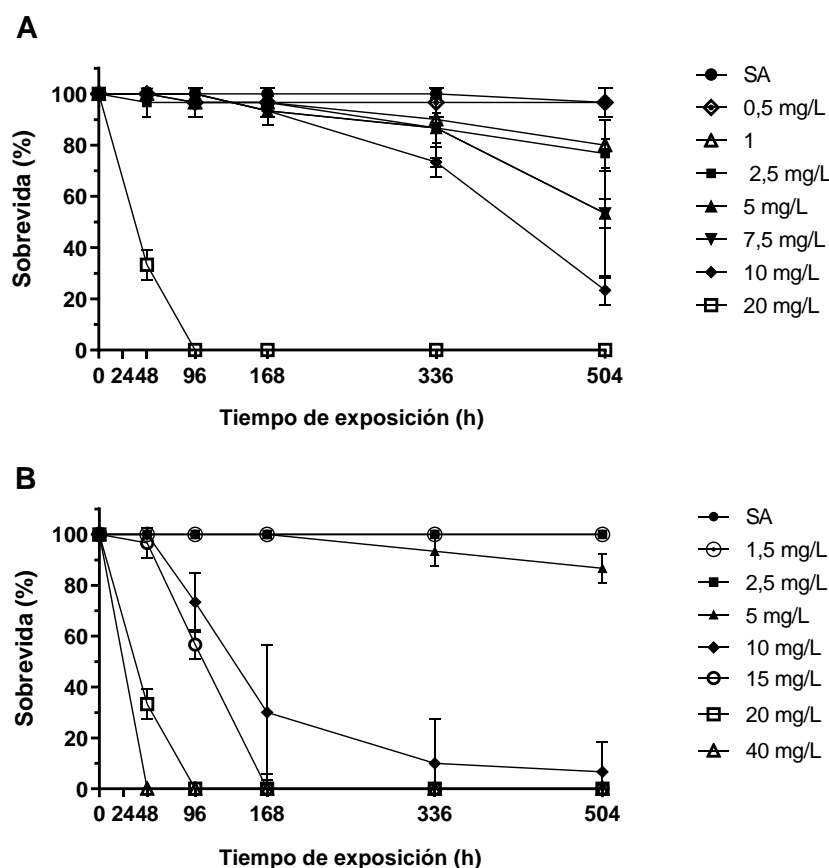


Figura 5.2 Porcentajes de sobrevivencia (%) de *R. arenarum* expuestos a cletodim a partir de los estadios de (A) embriones en 2-blastómeros (E.3) y (B) opérculo completo (E.25). Las barras de error indican \pm DE.

En la Figura 5.3A se representa el perfil de toxicidad (curvas TOP) de los individuos expuestos desde embriones en 2-blastómeros (E.3) durante 504 h de exposición. Los valores de CL10, 50 y 90 a las 48 h fueron 11,78, 18,32 y 24,87 mg/L, respectivamente. A las 96 h se observó un marcado incremento de la toxicidad con valores de CL10_{96h}=8,29 mg/L, CL50_{96h}=14,06 mg/L, CL90_{96h}=19,83 mg/L. A las 168 h los valores de CLs no difirieron respecto al período anterior. Una vez alcanzado el tiempo crónico de exposición se observó una tendencia al aumento de la toxicidad con valores de CL10_{336h}=3,29 mg/L, CL50_{336h}=11,43 mg/L, CL90_{336h}=19,53 mg/L. Al finalizar la exposición (504 h) se alcanzaron valores de CLs de CL10_{504h}=0,74 mg/L CL50_{504h}=7,07 mg/L, CL90_{504h}=13,41 mg/L.

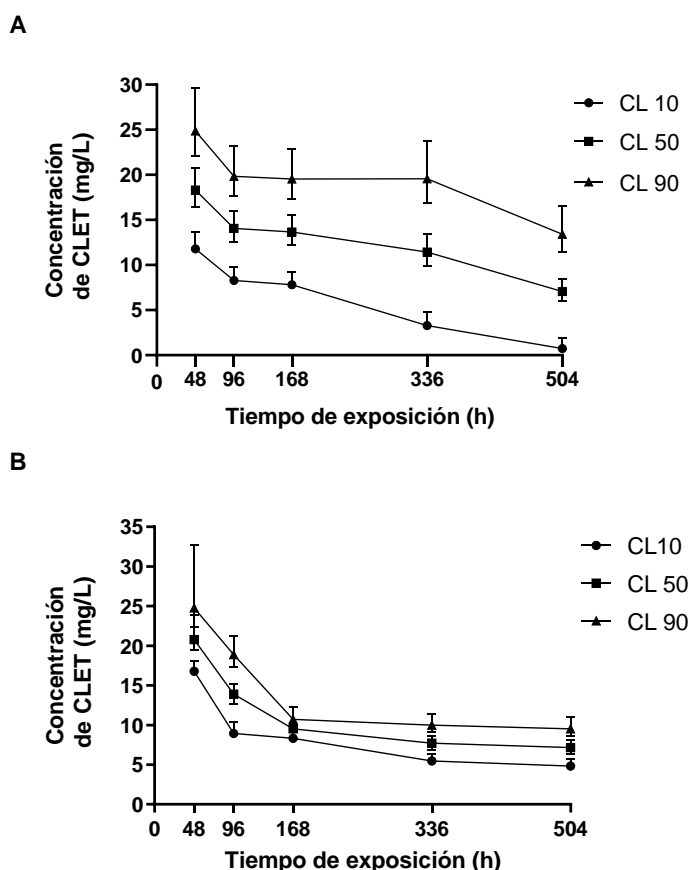


Figura 5.3 Perfil de toxicidad de individuos de *R. arenarum* expuestos a cletodim a partir de los estadios de (A) embriones en 2-blastómeros (E.3) y (B) opérculo completo (E.25). Las barras de error indican IC 95%.

Para larvas expuestas desde opérculo completo (E.25), las curvas TOP se encuentran representadas en la Figura 5.3B. A las 48 h las CL10, 50 y 90 fueron 16,78, 20,78 y 24,79 mg/L, respectivamente, A las 96 h se observó un incremento marcado de la toxicidad con valores de $CL10_{96h}=8,94$ mg/L $CL50_{96h}=13,91$ mg/L y $CL90_{96h}=18,87$ mg/L. El valor de $CL10_{168h}$ no difirió respecto a la del tiempo anterior. En cambio, los valores de $CL50_{168h}$ y $CL90_{168h}$ disminuyeron, siendo 9,52 y 10,70 mg/L respectivamente, lo que refleja un incremento de la toxicidad. Este período es coincidente con la llegada de los individuos al estadio larvario. En adelante, se observa un leve incremento de la toxicidad del plaguicida con valores de $CL10_{336h}=5,46$ mg/L $CL50_{336h}=7,72$ mg/L y $CL90_{336h}=9,98$ mg/L. Los valores de toxicidad al finalizar el experimento (504 h) no difirieron respecto al período anterior ($p>0,05$).

5.4.2 Alteraciones morfológicas y etológicas

La exposición de embriones (E.3) al CLET causó efectos subletales. A las 96 h de exposición los individuos pertenecientes al grupo control (Figura 5.4A) y a los tratamientos hasta la concentración 10 mg/L alcanzaron el estadio de boca abierta (E.21). El valor NOEC_{96 h} fue de 1 mg/L. El principal efecto en los individuos expuestos a las concentraciones de 2,5, 5 y 10 mg/L fue una alteración del comportamiento manifestada como debilidad en el movimiento (Tabla 5.1). Sin embargo, los individuos tratados con 20 mg/L mostraron un retraso en el desarrollo con una apariencia correspondiente con el estadio de circulación branquial (E.20), ondulaciones en la cola, y también ausencia de movimientos (Figura 5.4B; Tabla 5.1). El IT a las 96 h fue de 6,27 (IT_{96h} =14,06 mg/L/2,24 mg/L), 4 veces por encima del valor crítico (1,5).

A las 168 h el valor NOEC continuó siendo 1 mg/L. En cuanto a alteraciones etológicas, los individuos expuestos a 2,5 mg/L mostraron movimientos débiles pero, a partir de 5 mg/L, todos los tratamientos mostraron ausencia de movimiento. En cuanto a malformaciones, a partir de 7,5 mg/L se observaron algunos individuos con hidropesía y ondulaciones en la cola en una baja incidencia. Sin embargo, los individuos expuestos a 20 mg/L mostraron en su totalidad, hidropesía a nivel del pliegue opercular, ondulaciones de la cola y subdesarrollo de la misma así como también, alteraciones etológicas tales como ausencia de movimiento (Figura 5.4D; Tabla 5.1).

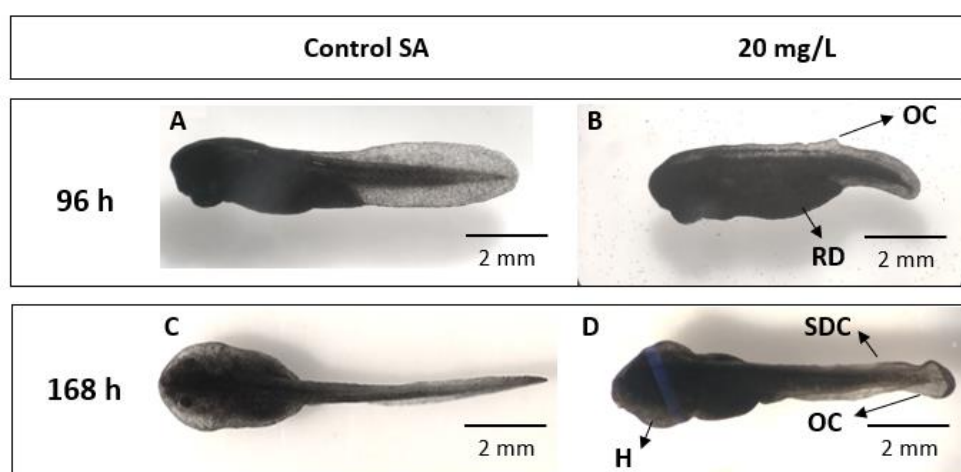


Figura 5.4 Imágenes de embriones expuestos a cletodim durante: 96 h (A) control; (B) 20 mg/L; 168 h (C) control; (D) 20 mg/L. **OC:** ondulaciones en la cola; **SDC:** subdesarrollo de la cola; **RD:** retardo en el desarrollo.

Capítulo 5: Evaluación de la toxicidad de un formulado comercial de cletodim sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella Arenarum*.

En el caso de las larvas, no se observó presencia significativa de malformaciones durante todo el período de tiempo de exposición (hasta 504 h). Sin embargo, a partir de las 96 h se observó ausencia total de movimiento en todos los individuos expuestos a concentraciones $\geq 7,5$ mg/L.

Capítulo 5: Evaluación de la toxicidad de un formulado comercial de cletodim sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella Arenarum*.

Tabla 5.1 Frecuencia (%) de embriones de *R. arenarum* con efectos subletales (malformaciones y alteraciones etológicas) luego de 96 y 168 h de exposición a cletodim. Los datos representan el porcentaje de efectos subletales (media \pm DE). (*) Indica diferencias significativas respecto al control SA ($p < 0,05$).

	Tiempo de exposición (h)											
	96						168					
	SA	2,5 mg/L	5 mg/L	7,5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	SA	2,5 mg/L	5 mg/L	7,5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
Efectos Subletales (%)												
Estadio		Boca abierta (E.21)						Opérculo completo (E.25)				
Retraso en el desarrollo (RD)	-	-	-	-	-	100,0 \pm 0,0	-	-	-	-	-	-
Hidropesía (H)	-	-	-	-	-	-	-	10,0 \pm 10,0	3,0 \pm 6,0	13,0 \pm 6,0	10,0 \pm 10,0	100,0 \pm 0,0
Subdesarrollo de la cola (SDC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100,0 \pm 0,0
Ondulaciones en la cola (OC)	-	-	-	-	-	100,0 \pm 0,0	-	-	-	10,0 \pm 10,0	-	100,0 \pm 0,0
Movimientos débiles	-	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	-	-	100,0 \pm 0,0	-	-	-	-
Ausencia de movimiento	-	-	-	-	-	100,0 \pm 0,0	-	-	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
Total de embriones malformados (%)	0	0	100,0 \pm 0,0*	100,0 \pm 0,0*	100,0 \pm 0,0*	100,0 \pm 0,0*	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0*	100,0 \pm 0,0*	100,0 \pm 0,0 *	100,0 \pm 0,0 *	100,0 \pm 0,0 *

5. 4.3 Evaluación del riesgo ecológico

Se evaluó el riesgo ecológico (RQ) para embriones y larvas expuestas a CLET para exposición aguda y crónica (Tabla 5.2). El RQ fue estimado, para tiempos agudos, como el cociente entre la concentración esperada en el ambiente (CEA) y el valor de la CL50 y para tiempos crónicos como el cociente entre la CEA y el valor NOEC_L. Por bibliografía la CEA en aguas superficiales a las 96 h es de 0,33 mg/L y a las 504 h es de 0,137 mg/L (USEPA, 2014). Los valores de RQ fueron comparados con los niveles de preocupación de USEPA (LOC) para organismos acuáticos que, para exposiciones agudas es de 0,5 y, para exposiciones crónicas es de 1. Para ambos estadios el valor de RQ es menor al valor LOC en tiempos agudos y crónicos de exposición (Tabla 5.2).

Tabla 5.2 Toxicidad y Cociente de Riesgo (RQ) ecológico del cletodim para individuos de *R. arenarum* expuestos desde estadio de embriones en 2-blatómeros (E.3) y desde opérculo completo (E.25).

Estadio	Tiempo de Exposición (h)					
	96			504		
	CL50 (mg/L)	CEA (mg/L) Aguas superficiales	RQ	NOEC (mg/L)	CEA (mg/L) Aguas superficiales	RQ
Embriones (E.3)	14,06	0,33	0,02	0,5	0,14	0,28
Larvas (E.25)	13,91	0,33	0,02	2,5	0,14	0,05

5.4.4. Actividad de la Butirilcolinesterasa

La respuesta de la enzima BChE luego de 96 h de exposición está representada en la Figura 5.5. Todas las concentraciones evaluadas mostraron una disminución significativa de la actividad de la enzima BChE ($p < 0,05$). Las concentraciones de 0,01 y 0,5 mg/L representaron una inhibición del 35 y 55% respectivamente, mientras que la concentración 1 mg/L provocó una disminución del 85% ($p < 0,05$). En el caso de 1,5 mg/L se observó una caída del 65% respecto al control SA ($p < 0,05$).

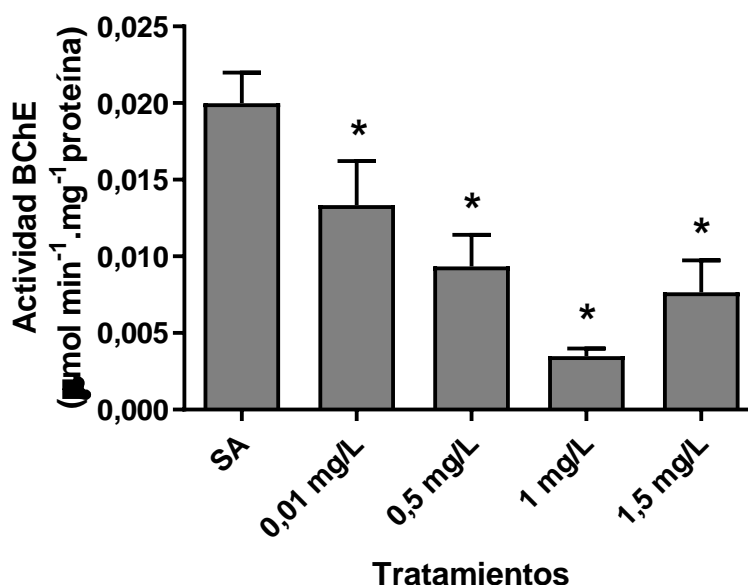


Figura 5.5 Actividad de la enzima BChE de las larvas de *R. arenarum* expuestas a cletodim durante 96 h. SA: Control negativo solución ANFITOX. Las barras de error indican \pm DE. (*) Indica diferencias significativas respecto al control SA ($p < 0,05$).

5.4.5 Ensayo de micronúcleos

La exposición al CLET durante 48 y 96 h indujo daño en el ADN en todas las concentraciones evaluadas. A las 48 h el herbicida indujo un aumento significativo de la frecuencia de eritrocitos micronucleados en individuos expuestos a 0,01, 0,5, 1 y 5 mg/L ($p < 0,05$) (Figura 5.6A). Comparando la frecuencia basal del control con la observada en la concentración más baja (0,01 mg/L), la exposición al CLET duplicó la incidencia de MNs.

La exposición durante 96 h también causó un aumento de la frecuencia de MNs en todos los tratamientos respecto al control SA ($p < 0,05$) (Figura 5.6B). La frecuencia de MNs observada en 0,01 mg/L fue aproximadamente 1,5 veces mayor que la frecuencia basal del control SA.

Para ambos ensayos (48 y 96 h), la ciclofosfamida (CF) demostró ser un control positivo eficaz ya que causó un aumento significativo de la frecuencia de eritrocitos micronucleados ($p < 0,05$).

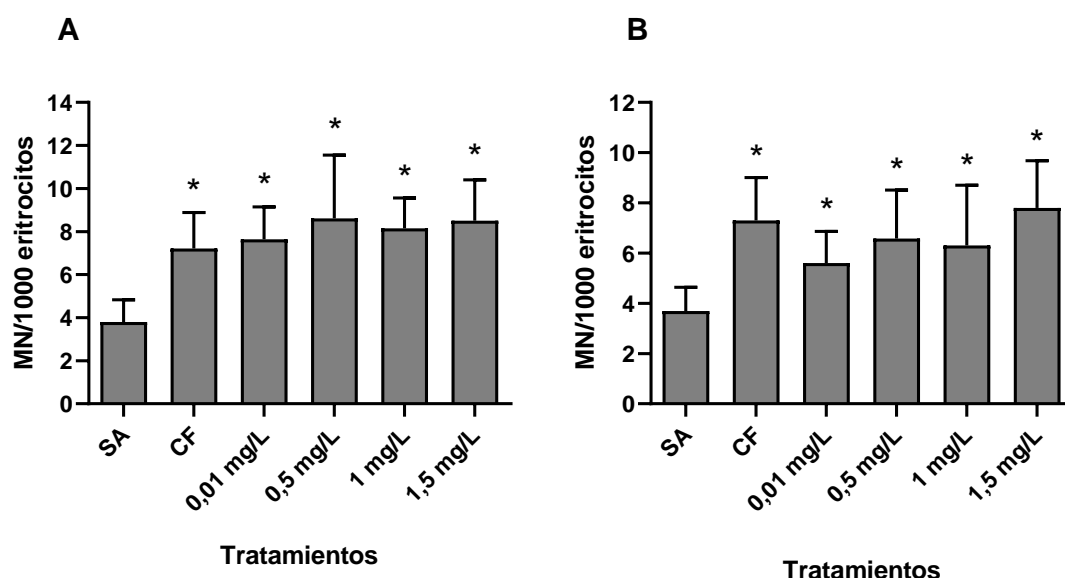


Figura 5.6 Frecuencia de micronúcleos (MNs) en eritrocitos de larvas de *R. arenarum* expuestas a diferentes concentraciones de cletodim durante (A) 48 h y (B) 96 h. SA: Control negativo solución ANFITOX; CF: Control positivo ciclofosfamida 40 mg/L. Las barras de error indican \pm DE. (*) Indica diferencias significativas respecto al control negativo SA ($p < 0,05$).

5.5 Discusión

El presente capítulo, tuvo como objetivo realizar una caracterización de la toxicidad del herbicida cletodim (CLET) desde un enfoque multiparamétrico. Hay dos factores muy importantes a resaltar que valorizan los resultados aquí presentados. En primer lugar, destacar que prácticamente no existen reportes sobre la toxicidad del CLET en especies animales por fuera de las realizadas por organismos oficiales en el proceso de registración de los formulados comerciales a base de este herbicida. En segundo lugar, que las cantidades de CLET utilizadas en Argentina y el mundo se encuentran en franco crecimiento exponencial lo cual despierta alarmas debido a la falta de estudios que profundicen el impacto de esta sustancia sobre la biodiversidad.

En este contexto, este trabajo se constituye como uno de los primeros en abordar la caracterización de los efectos tóxicos del CLET en vertebrados acuáticos y particularmente, es pionero en su abordaje específico en anfibios. En conjunto, el análisis integrado de los resultados abordando el estudio de efectos letales, subletales, y

modificaciones de la respuesta de biomarcadores evidencia los efectos nocivos de esta sustancia sobre el desarrollo temprano de la especie sudamericana *Rhinella arenarum*.

El herbicida CLET es capaz de causar letalidad tanto en embriones como en larvas de *R. arenarum* tanto en períodos agudos como crónicos de exposición. Como se mencionó anteriormente, existen pocos trabajos que permitan comparar la susceptibilidad entre especies. Sin embargo, un trabajo reciente realizado en embriones del pez *Danio rerio* cuya $CL_{50_{120h}} = 100 \mu\text{g/L}$ (Xiong et al. 2019) permite demostrar que los embriones de *R. arenarum* son más resistentes al CLET en tiempos similares de exposición ($CL_{50_{168h}} = 13,67 \text{ mg/L}$).

Por otro lado, si se comparan los valores de CL_{50} informados para larvas de otro pez, *Oncorhynchus mykiss*, a las 96 h ($CL_{50_{96h}} = 19 \text{ mg/L}$) (Swigert, 1986), queda evidenciado que las larvas de *R. arenarum* presentan una sensibilidad similar ($CL_{50_{96h}} = 13,91 \text{ mg/L}$).

No existen otros reportes que permitan comparar la susceptibilidad de la especie modelo aquí empleada con otros anfibios.

En cuanto a la presencia de malformaciones, Xiong et al. (2019) ha reportado que el CLET causa ciertas malformaciones en embriones de *D. rerio* como hidropesía en el saco vitelino a las 96 h en exposiciones a concentraciones de $300 \mu\text{g/L}$, disminución de la longitud del cuerpo en concentraciones entre 50 y $500 \mu\text{g/L}$ y malformaciones en la columna vertebral en concentraciones de $300 \mu\text{g/L}$. También estudios en la misma especie han reportado malformaciones craneales y cardiovasculares en embriones tempranos expuestos a un rango de concentraciones entre 10 y 30 mg/L con un incremento concentración-dependiente de la frecuencia de malformaciones concentración-dependiente (Wang et al. 2019). En el presente trabajo, también se han encontrado anomalías. La exposición al CLET durante el período de desarrollo embrionario temprano causó hidropesía, retraso en el desarrollo, ondulaciones de la aleta y subdesarrollo de la cola a lo largo de períodos agudos y sub-crónicos de exposición ($NOEC_{SL-96h \text{ y } 168h} = 1 \text{ mg/L}$). Así mismo, se han observado alteraciones etológicas como debilidad y ausencia de movimiento. Más aún, el índice de teratogenicidad (IT) de $6,27$ indica un gran potencial teratogénico del CLET en ausencia de mortalidad significativa.

En cuanto a los antecedentes sobre la capacidad neurotóxica de este herbicida se ha reportado que es capaz de inhibir a la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en el rango de concentraciones de 10 a 30 mg/L (Wang et al. 2019). Los resultados aquí presentados demuestran que también tiene la capacidad de inhibir la actividad de otra enzima colinesterasa, la butirilcolinesterasa (BChE) cuyo rol neuroprotector ha sido previamente descrito (Çokuğraş, 2003). Luego de 96 h de exposición, los individuos expuestos a todas las concentraciones evaluadas presentaron una disminución significativa de la actividad de la BChE, siendo un 35% menor para la concentración más baja (0,01 mg/L) y la concentración más alta (1,5 mg/L) un 65% más baja. Este hecho despierta alarma ya que la Concentración Esperada en el Ambiente (CEA) por la USEPA para períodos agudos post-aplicación es de 0,33 mg/L, y puede alcanzar en cuerpos someros un valor de 7,5 mg/L en caso de derrame accidentales (USEPA, 2014) lo que implica que el rango de concentraciones evaluado y que causó efectos significativos adversos posible en condiciones ambientales.

Teniendo en cuenta este último hecho, la preocupación se traslada a los efectos genotóxicos que puede causar esta sustancia ya que, nuevamente, todo el rango evaluado produce un incremento significativo de la frecuencia de eritrocitos micronucleados luego de 48 y 96 h de exposición. Este reporte, constituye la primera evidencia del potencial carcinógeno de esta sustancia ya que existe una relación positiva entre la incidencia de cáncer y el incremento de la frecuencia de MNs (Duffaud et al. 1999). Este hecho no es menor ya que este herbicida es clasificado por la USEPA dentro del grupo E como probable no cancerígeno (USEPA, 2014).

Por último, cabe destacar que el cociente de riesgo (RQ) utilizado para comparar la toxicidad observada experimentalmente con la exposición ambiental posible, arroja valores que indican que esta sustancia no presenta peligrosidad tanto para embriones como larvas de *R. arenarum*. Sin embargo, para aseverarlo, es importante considerar un análisis integral de múltiples factores que impliquen no sólo condiciones de letalidad sino también de subletalidad y otros parámetros fisiológicos como la respuesta de los biomarcadores ya que es importante conocer el estado de los individuos que sobreviven a la exposición.

En resumen, los resultados aquí presentados demuestran que la utilización creciente de CLET en los agroecosistemas donde *R. arenarum* habita, puede constituir una amenaza para la continuidad de sus poblaciones.

5.6 Conclusiones

- La exposición a Select® causó mortalidad en embriones y larvas de *R. arenarum* en forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.
- La exposición continua a CLET causó malformaciones durante el desarrollo embrionario principalmente incurvaciones y ondulaciones en la aleta, y alteraciones etológicas con un IT =6,27.
- La exposición continua a concentraciones iguales o superiores a 2,5 mg/L de CLET en larvas causó alteraciones etológicas relacionadas con su capacidad de movimiento.
- La magnitud de los efectos letales y subletales por exposición al CLET fueron estadio-dependiente.
- La actividad de la enzima butirilcolinesterasa se vio inhibida por exposición al CLET en todo el rango de concentraciones ensayado.
- La exposición al CLET durante 48 y 96 h causó aumento de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de larvas expuestas en todo el rango de concentraciones ensayado.
- La presencia de CLET en los cuerpos acuáticos no constituye un posible riesgo ecológico para las poblaciones de *R. arenarum* en términos de RQ. Sin embargo, en conjunto los resultados alertan sobre los potenciales efectos del CLET en los agroecosistemas.

Capítulo 6

Discusión General

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se demostró empíricamente cómo la exposición al fungicida mancozeb (MCZ), al insecticida imidacloprid (IMI) y al herbicida cletodim (CLET) afecta de manera negativa al desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum*.

En cuanto las concentraciones evaluadas para cada plaguicida, se procuró seleccionar un amplio rango, incluyendo valores esperados en el ambiente según organismos regulatorios internacionales como lo es la USEPA, pero también incorporar concentraciones altas con el objetivo de obtener un perfil toxicológico abarcativo de cada sustancia y así, poder realizar una caracterización de amplio espectro.

Los ensayos estandarizados constituyeron una herramienta eficaz para la evaluación de la toxicidad de las sustancias y la posterior comparación de efectos. Si bien los mecanismos de acción de cada plaguicida difieren entre sí, los resultados aquí presentados proveen evidencia suficiente para poder distinguir el tipo de amenaza que constituyen.

La susceptibilidad de los estadios embrio-larvales a estos agroquímicos fue dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. La exposición causó efectos letales y subletales que aumentaron significativamente durante el periodo crónico de exposición. Este hecho, resalta la importancia de incorporar a las evaluaciones de toxicidad *in vivo*, experimentos de exposición crónica que permitan abarcar períodos prolongados del desarrollo y por tanto, dar cuenta de la toxicidad y de los efectos en la morfología y comportamiento a largo plazo ya que, muchas veces, no se llegan a manifestar en períodos agudos o bien, lo hacen pero con menor incidencia y/o gravedad.

Como se describió en los capítulos anteriores, los 3 plaguicidas aquí evaluados tienen naturalezas químicas y propiedades fisicoquímicas diferentes por lo que presentan a distintos mecanismos de acción y toxicidad. De manera comparativa, tanto en períodos agudos como crónicos de exposición, la sustancia que resultó causar una mayor toxicidad en embriones expuestos desde 2 blastómeros (E.3) y larvas expuestas desde opérculo completo (E.25), en términos de Concentración Letal 50 (CL50), fue el MCZ seguido por el CLET y, en último lugar, el IMI (Tabla 6.1).

Tabla 6.1 Valores de CL50 para individuos expuestos desde 2-blastómeros (E.3) y desde opérculo completo (E.25) a mancozeb, imidacloprid y cletodim luego de 48 y 504 h de exposición.

	CL50 (mg/L)			
	2-blastómeros (E.3)		Opérculo Completo (E.25)	
	48 h	504 h	48 h	504 h
Mancozeb	3,97	0,65	3,71	1,12
Imidacloprid	2235,12	567,79	720,58	255,06
Cletodim	18,32	7,07	20,78	7,71

Asimismo, la susceptibilidad a estos agroquímicos fue dependiente del estadio desde el cual se dio inicio a la exposición. Contrastando las curvas que reflejan el perfil de toxicidad en el tiempo (curvas TOP) tanto para el MCZ, IMI y CLET se observan particularidades interesantes. En el caso de la exposición desde E.3, la toxicidad de las 3 sustancias incrementó en tiempos subcrónicos de exposición, momento coincidente con la llegada de los individuos al estadio larval. Entre las razones que podrían dar explicación a dicho fenómeno se encuentran, que una vez que las larvas eclosionan, pierden la membrana embrionaria que actúa como barrera física con el medio contaminado. Asimismo, cuentan con un mayor desarrollo del sistema nervioso, un incremento del tamaño corporal que conlleva a una mayor relación superficie-volumen en contacto con el medio con plaguicida y por último, el aumento de las vías posibles de ingreso de las sustancias ya sea a través de las branquias o por la ingestión de alimento contaminado.

Debido a que la mayoría de los trabajos se enfocan en el análisis de las etapas larvales de los anfibios, la inclusión de estadios aún más tempranos del desarrollo resalta la importancia de esta investigación como un aporte significativo para comprender de manera más compleja su susceptibilidad a la contaminación por agroquímicos.

En cuanto a la incidencia de malformaciones y teratogénesis, las 3 sustancias presentaron valores de índices teratogénicos (IT) superiores al valor crítico de 1,5 lo que indica que todas ellas tienen la capacidad de generar malformaciones en ausencia de mortalidad significativa, afectando de forma severa el estado de los individuos sobrevivientes. Respecto a la toxicidad en términos de efectos subletales a nivel morfológico y comportamental, el MCZ fue el que presentó causó efecto en las

concentraciones más bajas en términos de la mínima concentración que se observa efecto (LOEC) ($LOEC_{SL-MCZ}=0,1$ mg/L, $LOEC_{SL-IMI}=250$ mg/L y $LOEC_{SL-CLET}=2,5$ mg/L). Teniendo en cuenta que este fungicida altera el funcionamiento de las enzimas implicadas en la producción de adenosín trifosfato (ATP) interfiriendo en el metabolismo normal de las células (Thiruchelvam, 2005) y por tanto, en su normal funcionamiento, desarrollo y reproducción, es probable que los efectos subletales observados estén relacionados con este hecho. Respecto a las principales malformaciones y anormalidades provocadas por los plaguicidas se observaron hidropesía, incurvaciones en el eje de la cola, retraso en el desarrollo y alteraciones etológicas como ausencia de movimiento.

Si bien es claro que la exposición durante la etapa temprana del desarrollo de *R. arenarum* causa diversos efectos nocivos sobre los individuos, el análisis de la peligrosidad mediante la comparación entre los parámetros de toxicidad experimentales con los valores de Concentraciones Esperadas en el Ambiente (CEA) mediante el coeficiente de riesgo (RQ) demostró que el único plaguicida que podría constituirse como un peligro ecológico para *R. arenarum* es el MCZ durante exposiciones crónicas por exposición a partir de períodos embrionarios tempranos (Tabla 3.4). Si bien es indiscutible que el RQ es una herramienta muy útil en la evaluación de riesgo ecológico, sobre todo en términos regulatorios, sólo contempla parámetros de letalidad, presentando algunas limitaciones que muchos autores han resaltado. Entre estas, se destaca el carácter estricto del cálculo e interpretación del coeficiente, que compara una concentración estimada con un parámetro toxicológico medido (CL50, NOEC) (Bartell, 1996). El resultado es un método de evaluación capaz de identificar plaguicidas que parecen ser excepcionalmente seguros para el ambiente (Campbell et al. 2000). Así, el RQ no puede considerarse por sí solo un parámetro confiable de estimación de riesgo (Campbell et al. 2000) ya que excluye otros tipos de análisis y herramientas que puedan dar cuenta del estado general de la salud de los individuos sobrevivientes a la exposición en términos morfológicos, etológicos y fisiológicos. Repensar las formas de evaluación de los plaguicidas existentes y aquellos que planean ser introducidos en el mercado, es de gran importancia para prevenir que sustancias tóxicas sean liberadas al ambiente. En este sentido, la incorporación nuevas herramientas en el ámbito de la ecotoxicología puede aportar al diseño de evaluaciones de riesgo más precisas y realistas que permitan, en conjunto, diseñar medidas de prevención de perjuicios medioambientales previo a la inversión de grandes sumas de dinero para la introducción de un nuevo plaguicida al

mercado (Campbell et al. 2000). En este sentido, es donde la inclusión de otras herramientas basadas en la biología molecular y la biotecnología puede proveer metodologías válidas para determinar los efectos adversos en los individuos expuestos (Galloway, 2006). En el presente trabajo se utilizó la medición de biomarcadores de efecto en concentraciones subletales para la determinación de algunos de los efectos fisiológicos como consecuencia de la exposición a los 3 plaguicidas.

Entre los sistemas afectados por la exposición a contaminantes, el sistema nervioso central (SNC) es uno de los más estudiados. Los plaguicidas pueden interactuar en distintas partes del SNC, afectando su normal funcionamiento. Si bien existen distintas metodologías para evaluar el efecto neurotóxico, uno de los biomarcadores más usados es la determinación de la actividad de las enzimas colinesterasas encargadas de la degradación del neurotransmisor acetilcolina en el espacio sináptico (Moncaleano-Niño et al. 2018). Particularmente, la mayoría de los trabajos ecotoxicológicos se avocan a medir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Aquí, se estudió la inhibición de la actividad de la enzima butirilcolinesterasa (BChE) que es propuesta por varios autores como neuroprotectora ya que, por su ubicación periférica (plasma, músculos, hígado), se encargaría de la degradación de sustancias neurotóxicas antes de que alcancen el cerebro, lugar donde la AChE se encuentra en mayor concentración (Çokuğraş, 2003). Los resultados indican que tanto el MCZ, el IMI y el CLET tienen la capacidad de interactuar con la BChE afectando de manera negativa su actividad. Teniendo en cuenta por un lado, que el grado de inhibición de estas enzimas está directamente relacionado al efecto tóxico de la sustancia (Grue et al. 1991) y, por otro, los valores LOEC de los plaguicidas, la sustancia de mayor efecto sobre la enzima BChE fue el CLET ya que 0,01 mg/L causaron una inhibición del 35% de su actividad. Sin embargo, no es menor destacar que el MCZ en concentraciones ambientalmente posibles, como lo es su valor LOEC de 0,05 mg/L puede causar un 50% de disminución de la actividad enzimática. Lo interesante es que el IMI, siendo un insecticida de acción neurotóxica, presentó los valores LOEC más altos y el menor grado de inhibición siendo de un 35% para la concentración de 60 mg/L y de un 54% para la concentración más alta ensayada de 100 mg/L ($LOEC_{IMI}=60$ mg/L).

Los agroquímicos en el medio acuático, pueden ejercer efectos a través de mecanismos genotóxicos que resultan en daño genómico (Vera Candiotti et al. 2010). La evaluación del daño en el ADN mediante biomarcadores de genotoxicidad es crucial para

comprender y evaluar el riesgo carcinogénico de una sustancia (Santella, 1997). Uno de los biomarcadores más utilizados para esto es el ensayo de micronúcleos (MNs). Se ha demostrado que existe una correlación entre el incremento de la frecuencia de células micronucleadas y el desarrollo de neoplasias (Duffaud et al. 1999; Iarmarcovai et al. 2008). De esta manera, los resultados observados para los tres plaguicidas, despiertan alarma ya que los 3 son capaces de incrementar la frecuencia del daño nuclear. En términos de valores LOEC, luego de 48 h de exposición, el CLET es el que causó mayor genotoxicidad ($LOEC_{CLET-48h}=0,01$ mg/L), seguido por el MCZ ($LOEC_{MCZ-48h}=0,05$ mg/L) y en último lugar el IMI ($LOEC_{IMI-48h}=1$ mg/L). En el caso del ensayo de exposición por 96 h, el CLET y el MCZ presentaron el mismo valor LOEC de 0,01 mg/L mientras que el IMI mantuvo el mismo valor que a las 48 h.

Comparando los 2 biomarcadores utilizados, la detección de la frecuencia de MNs presentó mayor sensibilidad ya que para el caso del MCZ y del IMI se observaron efectos en concentraciones más bajas que en el caso del biomarcador BChE a iguales tiempos de exposición ($LOEC_{MCZ-MN96h}= 0,01$ mg/L vs. $LOEC_{MCZ-BChE}= 0,05$ mg/L y $LOEC_{IMI-MN96h}= 1$ mg/L vs. $LOEC_{IMI-BChE}= 60$ mg/L).

Un punto interesante es que algunas, de las concentraciones subletales que causaron alteraciones en los biomarcadores evaluados, son posibles bajo condiciones ambientales. De esta forma, queda clara la utilidad de los biomarcadores como herramientas predictivas en estudios de monitoreo ambiental en cuanto a que se constituyen como indicadores tempranos de toxicidad (Newman, 1998; Gupta, 2014).

Los anfibios, pueden verse expuestos a lo largo de su ciclo de vida a distintos plaguicidas en sus hábitats naturales. La agriculturización de la Argentina que devino en la expansión de la frontera agrícola los coloca en contacto permanente con estas sustancias (Jergentz et al. 2005; Peruzzo et al. 2008). Teniendo en cuenta que uno de los motivos de la declinación global de sus poblaciones es, no sólo el cambio del uso de los suelos asociado a la pérdida de sus hábitats, sino también la presencia de agroquímicos en los ecosistemas (Collins & Storfer, 2003) es significativo el aporte de la evidencia presentada acerca de la magnitud del riesgo que presentan el MCZ, el IMI y el CLET para la salud y continuidad de las poblaciones autóctonas de esta especie. Asimismo, no podemos descartar la influencia indirecta de estos plaguicidas sobre otras especies ya que los anfibios cumplen un rol fundamental en el funcionamiento de las redes tróficas y por

lo tanto, su desaparición podría afectar otros niveles, provocando un desequilibrio en los ecosistemas a los que pertenecen.

En nuestro país existen evidencias fehacientes de cómo los cultivos cercanos a los cuerpos de agua donde viven los anfibios y la presencia de agroquímicos en agua contribuyen a disminuir la biodiversidad y a producir malformaciones en los individuos (Peltzer et al. 2011; Chilote et al. 2018; Agostini et al. 2021). En este sentido, es importante avanzar en la medición de los residuos de estos plaguicidas en muestras de suelo y agua de manera tal de obtener un panorama más representativo sobre su presencia en los ambientes, independientemente de la importante evidencia que aporta la cantidad de toneladas importadas año a año para su uso en el país. En este sentido, conocer la magnitud de la contaminación de nuestros ecosistemas por estos agroquímicos, permitirá dirigir las tomas de decisiones a aquellas áreas que requieran una intervención mayor en términos de conservación y políticas regulatorias. Algunas de las medidas propuestas para proteger a las especies nativas de anfibios incluyen la reducción del uso de plaguicidas y fertilizantes, así como también la introducción de cuerpos de agua artificiales con amplia cobertura vegetal acuática y costera que brindarían cierta protección de la escorrentía de los agroquímicos reduciendo su impacto (Semlitsch & Bodie, 2003; Keddy, 2010; Ficetola et al., 2011; Agostini et al. 2021). En conjunto, la identificación en el ambiente de los agroquímicos aquí evaluados, el conocimiento sobre los posibles efectos letales y subletales que causan en los estadios de desarrollo temprano del modelo *R. arenarum* la articulación con otras metodologías de estudio *in situ* y las medidas propuestas para la conservación de los anfibios en general, podrían constituirse como medidas de prevención de los impactos ambientales negativos por el uso de agroquímicos y la recuperación progresiva de los agroecosistemas afectados.

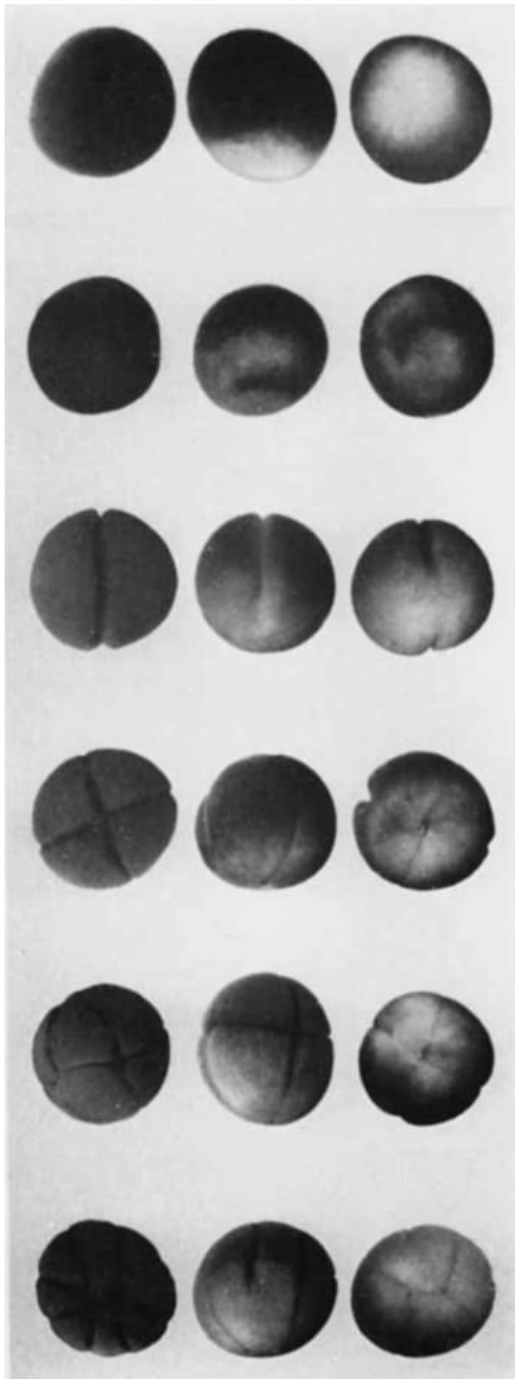
Capítulo 7

Conclusiones Generales

- La exposición a los plaguicidas mancozeb, imidacloprid y cletodim causó mortalidad, malformaciones, deformidades y cambios etológicos durante el período de desarrollo temprano de *R. arenarum*.
- El efecto de la exposición a los plaguicidas mancozeb, imidacloprid y cletodim produjo alteraciones en la respuesta del biomarcador enzimático butirilcolinesterasa.
- El efecto de la exposición a los plaguicidas mancozeb, imidacloprid y cletodim produjo alteraciones en la respuesta del biomarcador de genotoxicidad.
- Los efectos de la toxicidad de los plaguicidas fueron concentración-dependiente.
- De los plaguicidas evaluados, sólo el análisis para mancozeb dio riesgo para los embriones de la especie *R. arenarum* en términos de coeficiente de riesgo (RQ) expuestos en tiempos de exposición crónicos.

Anexo

A) Primeros estadios del desarrollo de *Bufo arenarum* (Del Conte & Sirlin, 1951).



Estadio 1 0 horas
Fecundación

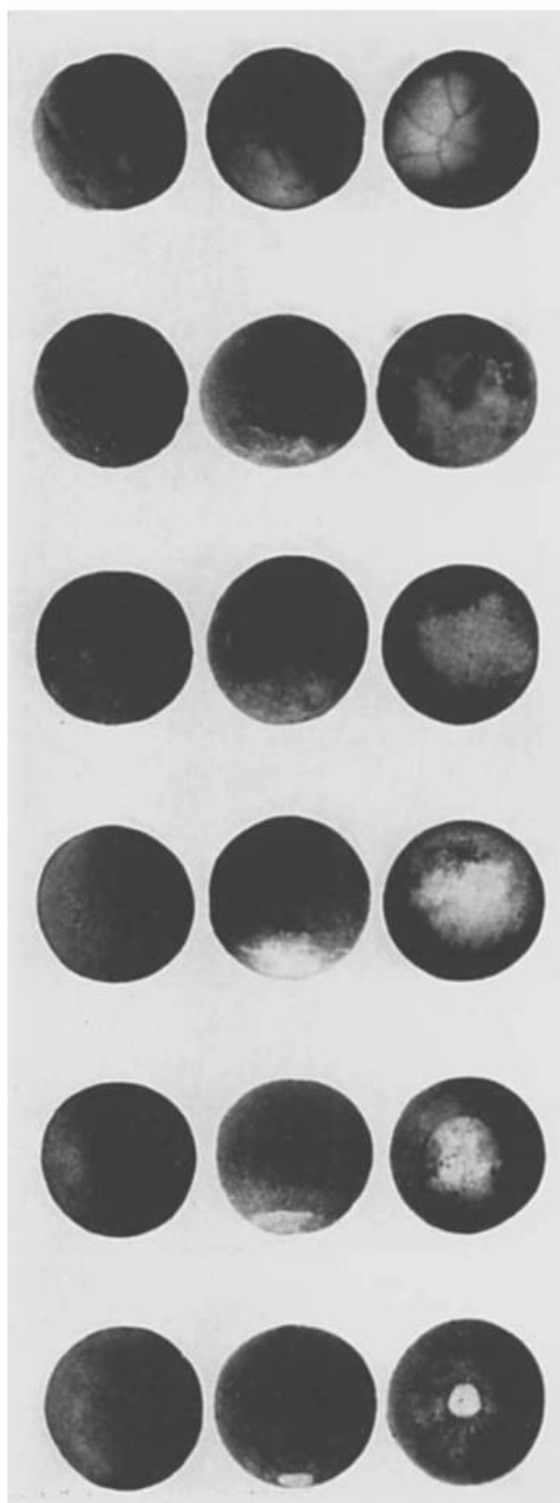
Estadio 2 1 horas
Medialuna gris

Estadio 3 3 horas
Primera división
(1-2 blastómeros)

Estadio 4 4 horas
Segunda división
(2-4 blastómeros)

Estadio 5 5 horas
Tercera división
(8 blastómeros)

Estadio 6 5 ½ horas
Cuarta división
(12-16 blastómeros)



Estadio 7 6 ½ horas
Quinta división
(24-32 blastómeros)

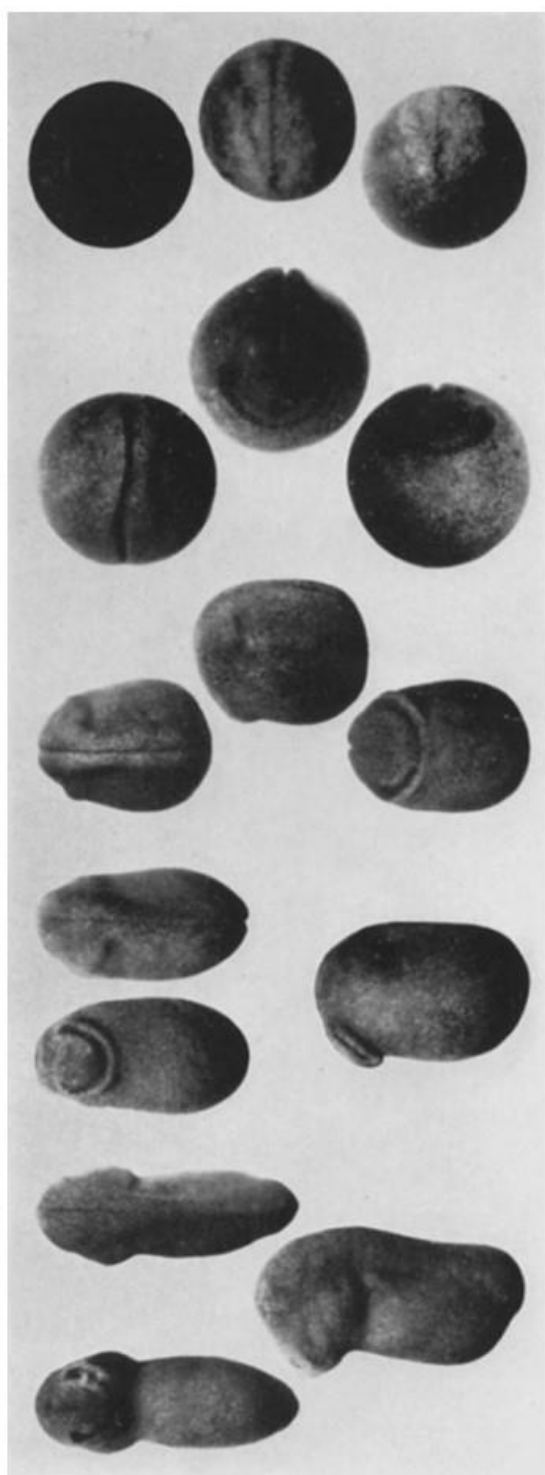
Estadio 8 12 horas
Blástula media

Estadio 9 18 horas
Blástula tardía

Estadio 10 22 horas
Labio dorsal del
blastoporo

Estadio 11 27 horas
Gástrula media

Estadio 12 34 horas
Gástrula tardía



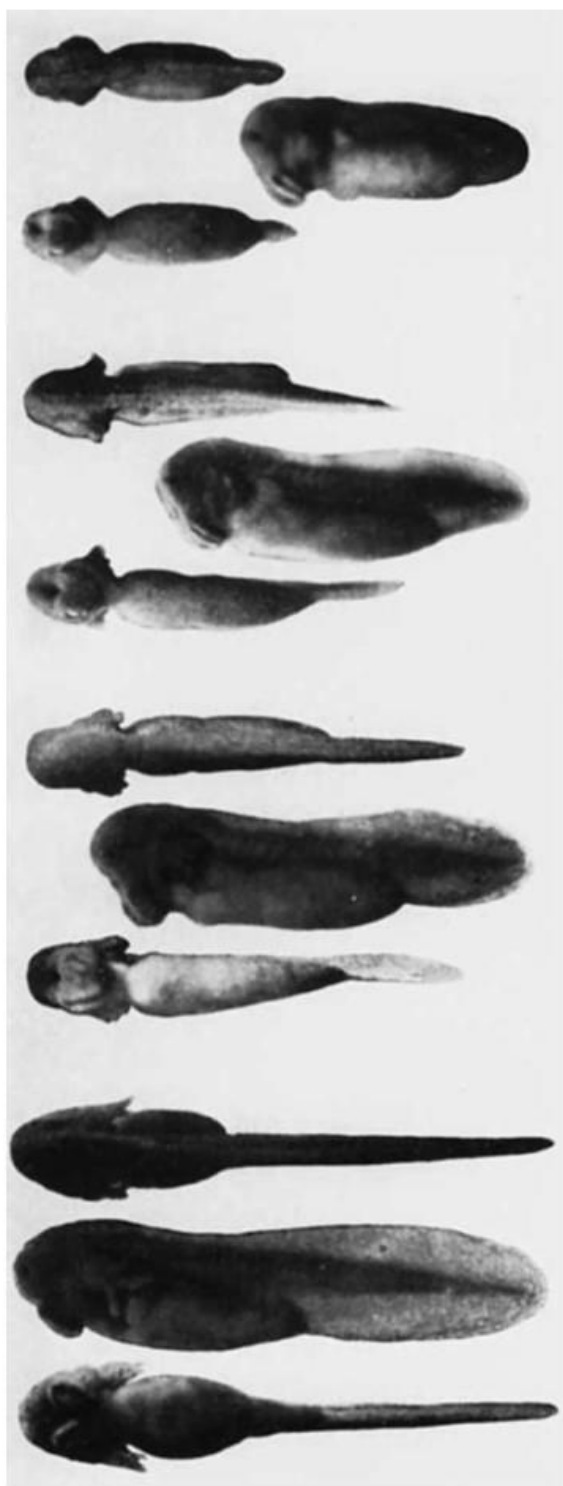
Estadio 13 44 horas
Placa neural

Estadio 14 54 horas
Surco neural

Estadio 15 59 horas
Rotación

Estadio 16 64 horas
Tubo neural

Estadio 17 70 horas
Brote caudal

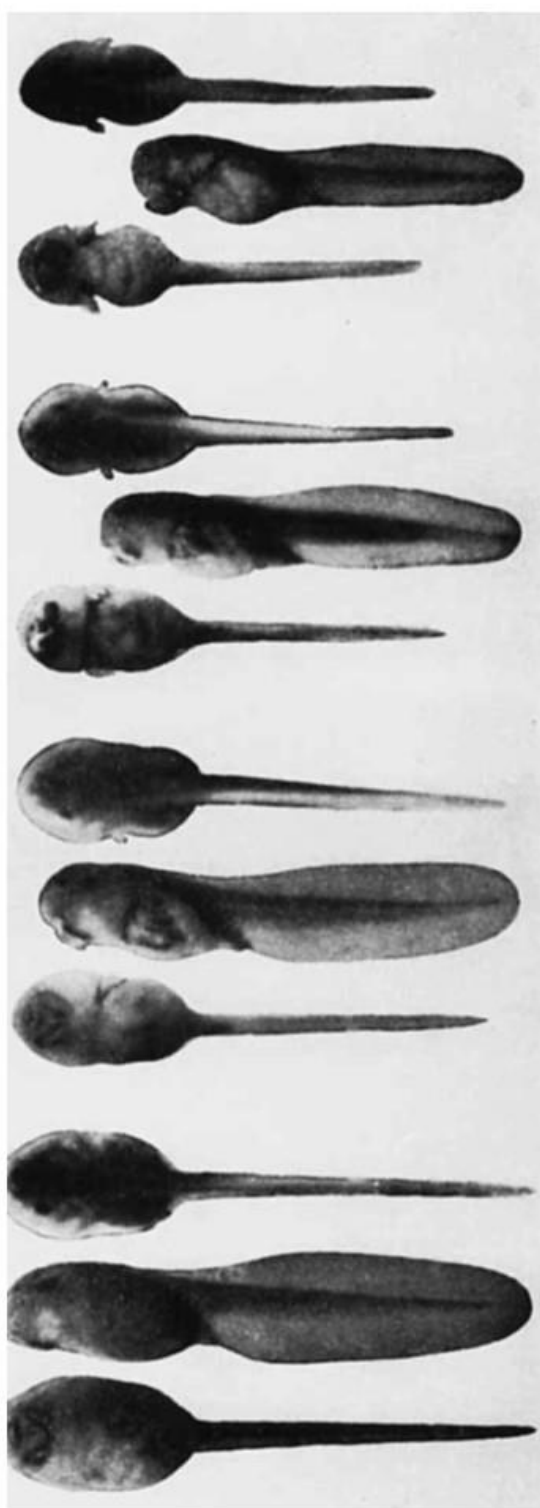


Estadio 18 4 días
Respuesta muscular
(3,5 mm)

Estadio 19 5 días
Latido cardíaco
(5 mm)

Estadio 20 5 ½ días
Circulación branquial
(5,5 mm)

Estadio 21 6 ½ días
Boca abierta
(7 mm)



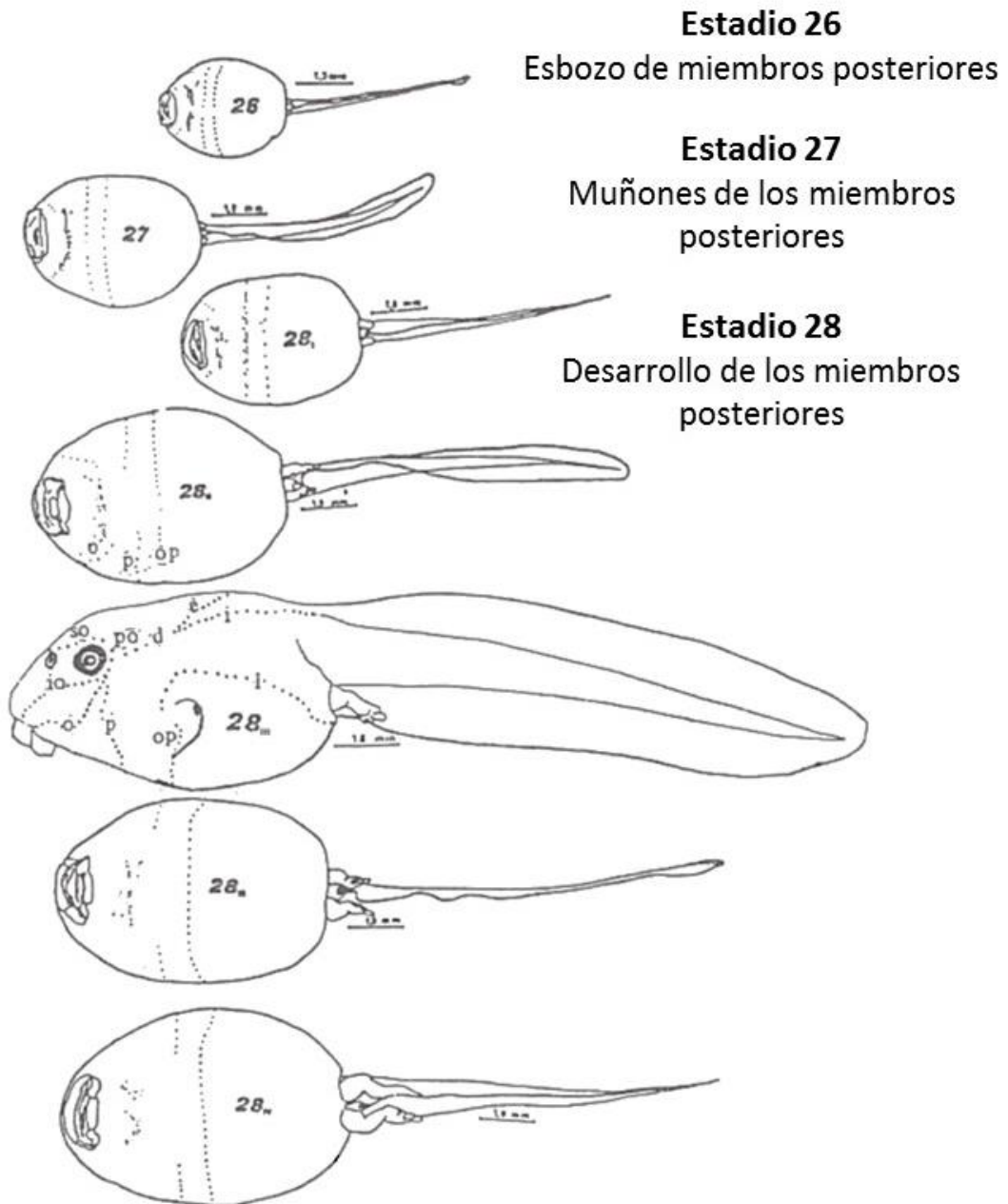
Estadio 22 7 ½ días
Circulación en la aleta de la cola
(7,5 mm)

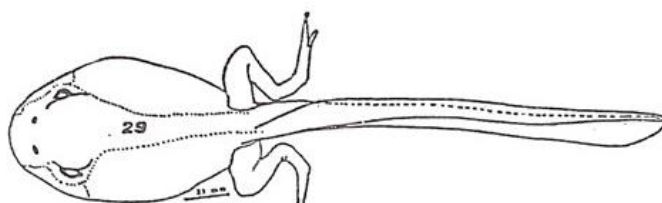
Estadio 23 8 días
Pliegue opercular
(8 mm)

Estadio 24 9 ½ días
Opérculo derecho cerrado
(9 mm)

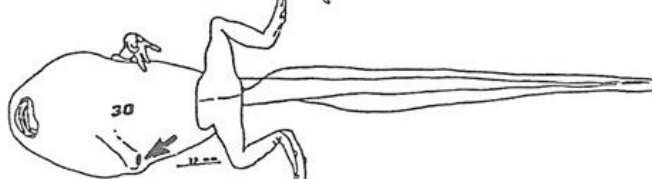
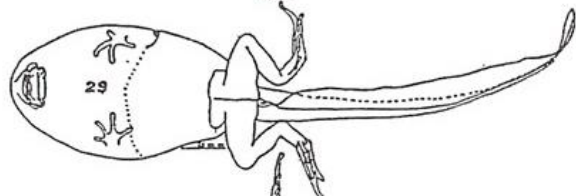
Estadio 25 11 días
Opérculo completo
(10 mm)

B) Estadios de la metamorfosis en *Bufo arenarum* (Anura) (Echeverría & Fiorito de Lopez, 1981).





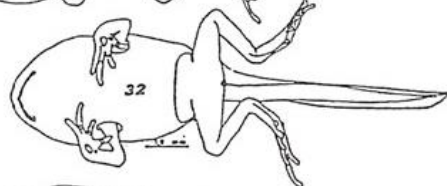
Estadio 29
Miembros
posteriores
desarrollados



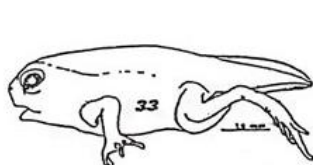
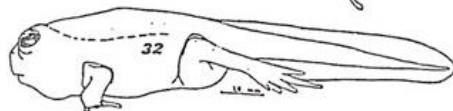
Estadio 30
Aparición de
primer miembro
anterior



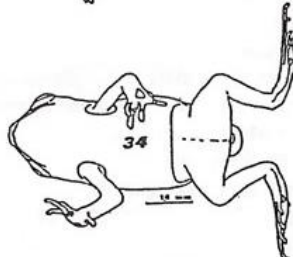
Estadio 31
Cuatro miembros



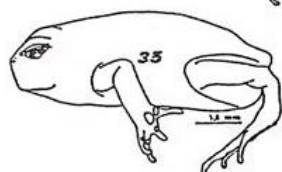
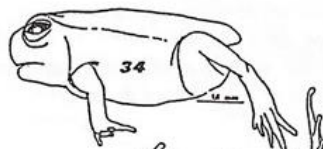
Estadio 32
Cola en reducción



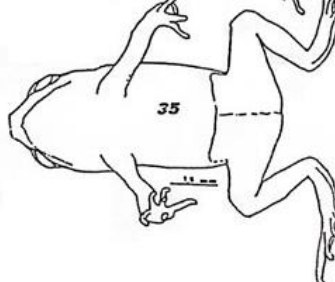
Estadio 33
Cola y aleta
en reducción



Estadio 34
Muñón caudal



Estadio 35
Juvenil



Bibliografía

Agostini, G., Deutsch, C., & Bilenca, D. N. (2021). Differential responses of anuran assemblages to land use in agroecosystems of central Argentina. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 311, 107323.

Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, 2(1), 1-12.

Almeida, É. C., Passos, L. S., Vieira, C. E. D., Acayaba, R. D., Montagner, C. C., Pinto, E., & Fonseca, A. L. (2021). Can the insecticide Imidacloprid affect the health of the Neotropical freshwater fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae)? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 85, 103634. doi: 10.1016/j.etap.2021.103634.

Amiard-Triquet, C., & Rainbow, P. S. (2012). In Amiard, J. C., & Rainbow, P. S. (eds) *Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects*. Chapter 1. CRC Press.

Andrade, F. H. (2016). Los desafíos de la agricultura. <http://up-rid2.up.ac.pa:8080/xmlui/handle/123456789/1806> Accedido Octubre 2021.

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

Aronzon, C. M., Sandoval, M. T., Herkovits, J., & Pérez Coll, C. S. (2011). Stage-dependent susceptibility to copper in *Rhinella arenarum* embryos and larvae. *Environmental toxicology and chemistry*, 30(12), 2771-2777. doi: 10.1002/etc.674.

Aronzon, C. M., Svartz, G. V., & Pérez Coll, C. S. (2016). Joint toxicity of copper and diazinon during embryonic and larval development of the common South American toad, *Rhinella arenarum*. *Chemistry and Ecology*, 32(9), 829-842.

ASTM (1993). Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay—*Xenopus* (FETAX). In Mayer F.L., Hamelink J.L., (eds) *Standards on Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. Philadelphia, PA, pp 1199–1209.

Atlas, E. L., & Schauffler, S. (1990). Concentration and variation of trace organic compounds in the North Pacific atmosphere. Long Range Transport of Pesticides. Chelsea (MI): Lewis Publishers, 161-184.

Attademo, A. M., Peltzer, P. M., & Lajmanovich, R. C. (2005). Amphibians occurring in soybean and implications for biological control in Argentina. Agriculture, ecosystems & environment, 106(4), 389-394. doi: 10.1016/j.agee.2004.08.012.

Badgujar, P.C., Jain, S.K., Singh, A., Punia, J.S., Gupta, RP, Chandrate, G.A. (2013). Immunotoxic effects of imidacloprid following 28 days of oral exposure in BALB/c mice. Environmental Toxicology and Pharmacology, 35, 408-418. doi: 10.1016/j.etap.2013.01.012.

Baldi, G., & Paruelo, J. M. (2008). Land-use and land cover dynamics in South American temperate grasslands. Ecology and Society, 13(2).

Baligar, P. N., & Kaliwal, B. B. (2004). Morphometric analysis of follicular growth and biochemical constituents in albino rats exposed to mancozeb. Journal of basic and clinical physiology and pharmacology, 15(3-4), 241-262. doi: 10.1515/JBCPP.2004.15.3-4.241.

Bentivegna, C. S., & Piatkowski, T. (1998). Effects of tributyltin on medaka (*Oryzias latipes*) embryos at different stages of development. Aquatic Toxicology, 44(1-2), 117-128. doi: 10.1016/S0166-445X(98)00065-4.

Bidinotto P. (2003). Chronic Toxicity of Clethodim Agan Technical to Fish, Early-Life Stage: Final Report. Project Number: RF/0409/217/002/02, 90005087. Unpublished study prepared by BIOAGRI Laboratories, Ltd. 68 p. MRID 481043-03. DER courtesy of Ricardo Jones, Chemical Review Manager, Risk Management and Implementation Branch I (RMIB 1), Pesticide Re-evaluation Division (PRD), Office of Pesticide Programs via email on July 9, 2014 to Patrick Durkin, SERA Inc.

Bionda, C. D. L., Kost, S., Salas, N. E., Lajmanovich, R. C., Sinsch, U., & Martino, A. L. (2015). Age structure, growth and longevity in the common toad, *Rhinella arenarum*, from Argentina. Acta Herpetologica 10: 55–62.

Boudou, A., & Ribeyre, F. (1997). Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environmental health perspectives*, 105(suppl 1), 21-35.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Brêda-Alves, F., Militão, F. P., de Alvarenga, B. F., Miranda, P. F., de Oliveira Fernandes, V., Cordeiro-Araújo, M. K., & Chia, M. A. (2020). Clethodim (herbicide) alters the growth and toxins content of *Microcystis aeruginosa* and *Raphidiopsis raciborskii*. *Chemosphere*, 243, 125318. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125318.

Brogan, W.R., Relyea, R.A. (2014). A new mechanism of macrophyte mitigation: how submerged plants reduce malathion's acute toxicity to aquatic animals. *Chemosphere*. 108, 405–410. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.041>.

Brühl, C. A., Pieper, S., & Weber, B. (2011). Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(11), 2465-2472. doi: 10.1002/etc.650.

Butinof, M., Fernández, R., Lantieri, M. J., Stimolo, M. I., Blanco, M., Machado, A. L., & Diaz, M. P. (2014). Pesticides and agricultural work environments in Argentina. *Pesticides: toxic aspects*. Rijeka: InTech, 105-34. doi: 10.5772/57178.

CalEPA (2010). Department of Pesticide Regulation, Kettleman City Community Exposure Assessment, Appendix DPR-A, Individual Pesticide Evaluations. <http://www.calepa.ca.gov/envjustice/Documents/2010/KCDocs/ReportDraft/DPRApps.pdf>. Accedido Octubre 2021

Calviello, G., Piccioni, E., Boninsegna, A., Tedesco, B., Maggiano, N., Serini, S., ... & Palozza, P. (2006). DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicology and applied pharmacology*, 211(2), 87-96. doi: 10.1016/j.taap.2005.06.001

Campbell, K. R., Bartell, S. M., & Shaw, J. L. (2000). Characterizing aquatic ecological risks from pesticides using a diquat dibromide case study. II. Approaches using

quotients and distributions. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(3), 760-774.

Canadian Council on Animal Care in Science. 1993. Guide to the Care and Use of Experimental animals. 291: 298.

Carniel, L. S. C., Niemeyer, J. C., de Oliveira Filho, L. C. I., Alexandre, D., Gebler, L., & Klauberg-Filho, O. (2019). The fungicide mancozeb affects soil invertebrates in two subtropical Brazilian soils. *Chemosphere*, 232, 180-185. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.05.179.

CASAFE (2009). Mercado Argentino 2009 de Productos Fitosanitarios. <https://www.casafe.org/pdf/2015/ESTADISTICAS/Informe-Mercado-Fitosanitario-2009.pdf> Accedido Febrero de 2021.

CASAFE (2012). Mercado Argentino 2012 de Productos Fitosanitarios. <https://www.casafe.org/pdf/2015/ESTADISTICAS/Informe-Mercado-Fitosanitario-2012.pdf> Accedido Febrero 2021.

Casida, J. E., & Durkin, K. A. (2017). Pesticide chemical research in toxicology: lessons from nature. *Chemical research in toxicology*, 30(1), 94-104. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00303.

Cei, J. M. (1980). Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano, New Series. Monographs*, Milan.

Chagnon, M., Kreutzweiser, D., Mitchell, E. A., Morrissey, C. A., Noome, D. A., & Van der Sluijs, J. P. (2015). Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 119-134. doi: 10.1007/s11356-014-3277-x.

Chilote, P. D., Bozzolo, L. E., Gutierrez, F. R., & Moreno, L. E. (2018). Description of Morphological Abnormalities in *Rhinella arenarum* (ANURA: BUFONIDAE). *Journal of Morphological Sciences*, 35(01), 44-47. doi: 10.1055/s-0038-1660489.

Çokuğraş, A.N. (2003). Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turkish Journal of Biochemistry*, 28(2), 54-61.

Collins, J. P., & Storfer, A. (2003). Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and distributions*, 9(2), 89-98. doi: 10.1046/j.1472-4642.2003.00012.x.

Connell, D. W., Lam, P., Richardson, B., & Wu, R. (2009). *Introduction to ecotoxicology*. John Wiley & Sons.

Contronei, G. (1932). Costituzione zoologica e trapianti — Ricerche tra Anuri e Urodeli-Considerazioni IX— Rendiconti. *Accademia Nazionale dei Lincei* 15(4): 236-240.

Cushman, S. A. (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological conservation*, 128(2), 231-240.

Dave, K. R., Syal, A. R., & Katyare, S. S. (2000). Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(1-2), 100-108. doi: 10.1515/znc-2000-1-219

De Joode, B. V. W., Barbeau, B., Bouchard, M. F., Mora, A. M., Skytt, Å., Córdoba, L., ... & Mergler, D. (2016). Manganese concentrations in drinking water from villages near banana plantations with aerial mancozeb spraying in Costa Rica: Results from the Infants' Environmental Health Study (ISA). *Environmental Pollution*, 215, 247-257.

Del Conte, E. y Sirlin, L. (1951). "The first stages of *Bufo arenarum* development." *Acta Zoologica Lilloana* 12: 495-499.

Diana, S. G., Reetarits Jr, W. J., Schaeffer, D. J., Beckmen, K. B., & Beasley, V. R. (2000). Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(12), 2961-2967. doi: 10.1002/etc.5620191217.

Dirección Nacional de Agricultura (2021). Ministerio de agricultura, ganadería y pesca Dirección de Estimaciones Agrícolas. Serie de estadística agrícola por cultivo, campaña, provincia y departamento de la República Argentina con los siguientes datos: superficie sembrada, superficie cosechada, producción y rendimiento. <http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>. Accedido Enero 2021.

Domico, L. M., Cooper, K. R., Bernard, L. P., & Zeevalk, G. D. (2007). Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. *Neurotoxicology*, 28(6), 1079-1091. doi: 10.1016/j.neuro.2007.04.008.

Duffaud, F., Orsiere, T., Digue, L., Villani, P., Volot, F., Favre, R., & Botta, A. (1999). Micronucleated lymphocyte rates from head-and-neck cancer patients. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 439(2), 259-266. doi: 10.1016/S1383-5718(99)00003-0.

Duke, S. O. (2015). Perspectives on transgenic, herbicide-resistant crops in the United States almost 20 years after introduction. *Pest management science*, 71(5), 652-657. doi: 10.1002/ps.3863.

Duport Bru, A.S. (2020). *Rhinella arenarum*. Sapo común, sapo argentino, sapo grande. *Universo Tucumano. Cómo, cuándo y dónde de la naturaleza tucumana, contada por los lilloanos*. G. J. Scrocchi y C. Szumik (eds) ISSN-2618-3161.

Echeverria D.D., & Fiorito de Lopez L.E. (1981). Estadios de la metamorfosis en *Bufo arenarum* (Anura). *Physis* (Buenos Aires), Secc.B 40(98): 15-23.

Edwards C.A. (1993). The Impact of Pesticides on the Environment. In: D. Pimentel., H. Lehman (eds) *The Pesticide Question*. Springer, Boston, MA. doi: 10.1007/978-0-585-36973-0_2

Edwards, I.R. (1991). Fungicides and related compounds. In: W. Hayes, L. Edwards (eds) *Handbook of pesticide toxicology*, Vol 3, 1446-1452.

Eldridge, B. F. (2008). Pesticide application and safety training for applicators of public health pesticides. Vector-Borne Disease Section. <https://westnile.ca.gov/pdfs/VCTManual-PestApplandSafetyTngApplPHPesticides.pdf> Accedido Marzo 2021.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95. doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.

EU Commission (2020). Commission Implementing Regulation (EU) 2020/2087 of 14 December 2020 concerning the non-renewal of the approval of the active substance mancozeb, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the Annex to Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011 Official Journal of the European Union L 423/50. Accessed 04 August 2021. https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2020/2087/oj.

Falfushinska, H. I., Romanchuk, L. D., & Stolyar, O. B. (2008). Different responses of biochemical markers in frogs (*Rana ridibunda*) from urban and rural wetlands to the effect of carbamate fungicide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148(3), 223-229. doi: 10.1016/j.cbpc.2008.05.018.

FAO (1999). Pesticide residues in food—1998 evaluations. Part II—Toxicological.

FAO (2021). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. <http://www.fao.org/americas/prioridades/seguridadalimentaria/es/#:~:text=Producci%C3%B3n%20alimentaria,seguridad%20alimentaria%20de%20su%20poblaci%C3%B3n>. Accedido Febrero 2021.

Fellers, G. M., McConnell, L. L., Pratt, D., & Datta, S. (2004). Pesticides in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) from the Sierra Nevada Mountains of California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(9), 2170-2177. doi: 10.1897/03-491.

Fenech, M. (2000). “The in vitro micronucleus technique”. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 455(1-2): 81-95. doi: 10.1016/S0027-5107(00)00065-8.

Ficetola, G. F., Marziali, L., Rossaro, B., De Bernardi, F., & Padoa-Schioppa, E. (2011). Landscape–stream interactions and habitat conservation for amphibians. *Ecological applications*, 21(4), 1272-1282.

Flores-García, M. E., Molina-Morales, Y., Balza-Quintero, A., Benítez-Díaz, P. R., & Miranda-Contreras, L. (2011). Pesticide residues in drinking water of an agricultural community in the state of Mérida, Venezuela. *Investigación clínica*, 52(4), 295-311.

Frost, D. R. (2010). Amphibian species of the world: an online reference, version 5.4. <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia>.

Fulladosa, E., Murat, J. C., Martínez, M., & Villaescusa, I. (2005). Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri* bacteria. *Chemosphere*, 60(1), 43-48. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.12.026

Gallant, A. L., Klaver, R. W., Casper, G. S., & Lannoo, M. J. (2007). Global rates of habitat loss and implications for amphibian conservation. *Copeia*, 2007 (4), 967-979. doi: 10.1643/0045-8511(2007)7[967:GROHLA]2.0.CO;2.

Gallardo, J. M. (1987). Anfibios Argentinos: Guía para su identificación. Librería Agropecuaria.

Galloway, T. S. (2006). Biomarkers in environmental and human health risk assessment. *Marine Pollution Bulletin*, 53(10-12), 606-613. doi: 10.1016/j.marpolbul.2006.08.013.

García-Lestón, J., Roma-Torres, J., Vilares, M., Pinto, R., Prista, J., Teixeira, J. P., ... & Laffon, B. (2012). Genotoxic effects of occupational exposure to lead and influence of polymorphisms in genes involved in lead toxicokinetics and in DNA repair. *Environment international*, 43, 29-36. doi: 10.1016/j.envint.2012.03.001.

Georghiou, G. P., & Mellon, R. B. (1983). Pesticide resistance in time and space. In: P. Georghiou, T. Saito (eds) *Pest resistance to pesticides*, 1-46. Springer, Boston, MA.

Geula, Changiz & Darvesh, Sultan. (2004). Butyrylcholinesterase, cholinergic neurotransmission and the pathology of Alzheimer's disease. *Drugs of today (Barcelona, Spain : 1998)*. 40. 711-21. 10.1358/dot.2004.40.8.850473.

Gholami-Seyedkolaei, S. J., Mirvaghefi, A., Farahmand, H., & Kosari, A. A. (2013). Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. *Ecotoxicology and environmental safety*, 98, 135-141.

Gibbons, D., Morrissey, C., & Mineau, P. (2015). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 103-118. doi: 10.1007/s11356-014-3180-5.

Grue, C. E., Hart, A. D. M., & Mineau, P. (1991). Biological consequences of depressed brain cholinesterase activity in wildlife. *Cholinesterase inhibiting insecticides Their impact on wildlife and the environment*, 151-209.

Gullino, M. L., Tinivella, F., Garibaldi, A., Kemmitt, G. M., Bacci, L., & Sheppard, B. (2010). Mancozeb: past, present, and future. *Plant Disease*, 94(9), 1076-1087. doi: 10.1094/PDIS-94-9-1076.

Halliday, T. (2005). Diverse Phenomena Influencing Amphibian Population Declines. In: M. Lannoo (eds) *Amphibian Declines*. Chapter 1, 3-6. University of California Press. doi: 10.1525/9780520929432-005.

Halliday, T. R. (2008). Why amphibians are important. *International Zoo Yearbook*, 42(1), 7-14. doi: 10.1111/j.1748-1090.2007.00037.x

Harris, M. L., Bishop, C. A., Struger, J., Ripley, B., & Bogart, J. P. (1998). The functional integrity of northern leopard frog (*Rana pipiens*) and green frog (*Rana clamitans*) populations in orchard wetlands. II. Effects of pesticides and eutrophic conditions on early life stage development. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 17(7), 1351-1363. doi: 10.1002/etc.5620170720.

Harris, M. L., Chora, L., Bishop, C. A., & Bogart, J. P. (2000). Species-and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 64(2). doi: 10.1007/s001289910039.

Hassan, R., Scholes, R., Ash, N. (2005). *Ecosystems and Human Well-Being: Current State and Trends: Findings of the Condition and Trends Working Group (Millennium Ecosystem Assessment Series)*.

Hensel, R. (1867). Beiträge zur Kenntniss der Wirbelthiere Südbrasilens. *Archiv für Naturgeschichte*, 33(1), 120-162.

Herkovits, J., & Pérez Coll, C. S. (1999). Bioensayos para test de toxicidad con embriones de anfibio ANFITOX basado en *Bufo arenarum*. Test Agudo (ANFIAGU), Crónico corto (ANFICOR), Crónico (ANFICRO) y de Estadios Tempranos del Desarrollo (ANFIEMB). Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 42, 24-30.

Herkovits, J., Pérez Coll, C., & Herkovits, F. D. (2002). Ecotoxicological studies of environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). Environmental pollution, 116(1), 177-183. doi: 10.1016/S0269-7491(01)00167-1.

Hoff, K.S., Blaustein, A.R., McDiarmid, R.W., Altig, R. (1999). Behavior: interactions and their consequences. In: R.W. McDiarmid, R. Altig (eds), Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae. University of Chicago Press, Chicago, pp. 125–239

Hoffmann, M., Hilton-Taylor, C., Angulo, A., Böhm, M., Brooks, T. M., Butchart, S. H., ... & Veloso, A. (2010). The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. Science, 330(6010), 1503-1509. doi: 10.1126/science.1194442.

Holmes, J., & Ruhman, M. (2007). Risks of mancozeb and maneb uses to federally listed California red legged frog (*Rana aurora daytonii*). US Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Washington, DC.

Howard, J. H., Julian, S. E., & Ferrigan, J. (2002). Golf course design and maintenance: impacts on amphibians. USGA Turfgrass and Environmental Research Online, 1(2), 1-21.

Howard, S. D., & Bickford, D. P. (2014). Amphibians over the edge: silent extinction risk of Data Deficient species. Diversity and Distributions, 20(7), 837-846.

Iarmarcovai, G., Ceppi, M., Botta, A., Orsiere, T., & Bonassi, S. (2008). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 659(3), 274-283. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.05.006.

Islam, M. A., Hossen, M. S., Sumon, K. A., & Rahman, M. M. (2019). Acute toxicity of imidacloprid on the developmental stages of common carp *Cyprinus carpio*.

Toxicology and Environmental Health Sciences, 11(3), 244-251. doi: 10.1007/s13530-019-0410-8.

IUCN (2021). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-2. <https://www.iucnredlist.org/search?query=amphibians&searchType=species> Accedido Octubre 2021.

Jarrard, H. E., Delaney, K. R., & Kennedy, C. J. (2004). Impacts of carbamate pesticides on olfactory neurophysiology and cholinesterase activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology*, 69(2), 133-148.. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.05.001.

Jayaraj, R., Megha, P., & Sreedev, P. (2016). Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary toxicology*, 9(3-4), 90. doi: 10.1515/intox-2016-0012.

Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C., & Schulz, R. (2005). Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere*, 61(6), 817-826. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.04.036.

Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(7), 2897-2908. doi: 10.1021/jf101303g.

Keddy, P. A. (2010). *Wetland ecology: principles and conservation*. Cambridge university press.

Kelly, J. R., & Harwell, M. A. (1989). Indicators of ecosystem response and recovery. In *Ecotoxicology: problems and approaches* (pp. 9-35). Springer, New York, NY.

Khan, P. K., & Sinha, S. P. (1996). Ameliorating effect of vitamin C on murine sperm toxicity induced by three pesticides (endosulfan, phosphamidon and mancozeb). *Mutagenesis*, 11(1), 33-36.

Kiely, T., Donaldson, D., & Grube, A. (2004). Pesticides industry sales and usage, 2001–2002 market estimates. Office of Pesticide Programs, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, Biological and Economic Analysis Division. US

Environmental Protection Agency. Washington, DC.
https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/acute-freshwater-and-marine-wet-manual_2002.pdf Accedido Octubre 2021.

Ksheerasagar, R. L., & Kaliwal, B. B. (2003). Temporal effects of mancozeb on testes, accessory reproductive organs and biochemical constituents in albino mice. *Environmental toxicology and pharmacology*, 15(1), 9-17. doi: 10.1016/j.etap.2003.08.006.

Kumar, A., Prasad, M. N. V., Achary, V. M. M., & Panda, B. B. (2013). Elucidation of lead-induced oxidative stress in *Talinum triangulare* roots by analysis of antioxidant responses and DNA damage at cellular level. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(7), 4551-4561. doi: 10.1007/s11356-012-1354-6.

Kwet, A., Reichle, S., Silvano, D., Úbeda, C., Baldo, D., & Di Tada, I. (2004). *Rhinella arenarum*. The International Union for Conservation of Nature. List of Threatened Species.

Lähdetie, J., & Parvinen, M. (1981). Meiotic micronuclei induced by X-rays in early spermatids of the rat. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 81(1), 103-115. doi: 10.1016/0027-5107(81)90091-9.

Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., & Junges, C. M. (2012). Los agroquímicos y su impacto en los anfibios: un dilema de difícil solución. *Química Viva*, 11(3), 184-198.

Landis, W., & M.H., Yu (2003). *Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems*. 2nd edition. Lewis Publishers, CRC Press.

Levin, S. A., Harwell, M. A., Kelly, J. R., & Kimball, K. D. (1989). *Ecotoxicology: Problems and Approaches*. *Ecotoxicology: Problems and Approaches*, 3-7. doi:10.1007/978-1-4612-3520-0_1

Litchfield, J. J., & Wilcoxon, F. R. A. N. K. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 96(2), 99-113.

Lu, F. C. (1985). *Basic toxicology; fundamentals, target organs, and risk assessment*.

Mahadevaswami, M. P., Jadaramkunti, U. C., Hiremath, M. B., & Kaliwal, B. B. (2000). Effect of mancozeb on ovarian compensatory hypertrophy and biochemical constituents in hemicastrated albino rat. *Reproductive toxicology*, 14(2), 127-134. doi: 10.1016/S0890-6238(00)00064-2.

Mahmood I., Imadi S.R., Shazadi K., Gul A., Hakeem K.R. (2016) Effects of Pesticides on Environment. In: K. Hakeem, M. Akhtar M., Abdullah S. (eds) *Plant, Soil and Microbes*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13

Mallén Rivera, C. (2012). Rachel Carson, 50 años de romper el silencio. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 3(14), 02-10.

Mann, R. M., Bidwell, J. R., & Tyler, M. J. (2003). Toxicity of herbicide formulations to frogs and the implications for product registration: A case study from Western Australia. *Applied Herpetology*, 1, 13-22.

Marques, A., Rego, A., Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M. A., & Pacheco, M. (2016). Evidences of DNA and chromosomal damage induced by the mancozeb-based fungicide Mancozan® in fish (*Anguilla anguilla* L.). *Pesticide biochemistry and physiology*, 133, 52-58.

McIntosh, P., Friedman, M. J., & Berenbaum, M. (2007). Una mujer apacible cuyo libro habló en voz alta. Rachel Carson: La Pluma contra El veneno. <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/tysa/images/recursos/primavera%20silenciosa.pdf>. Accedido Enero 2021.

Melancon, M. J. (1995). Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In: David J. Hoffman, Barnett A. Rattner, G. Allen Burton Jr., and John Cairns Jr. (eds) *Handbook of ecotoxicology*, Chapter 11.

Meylan, W. & Howard, P. (2000). Estimation Program Interface, Version 3.10. Syracuse Research Corporation, Syracuse, N.Y. for U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pollution, Prevention and Toxics, Washington D.C.

Mohammed, A. (2013). Why are early life stages of aquatic organisms more sensitive to toxicants than adults. *New insights into toxicity and drug testing*, 49-62. doi: 10.5772/55187.

Moncaleano-Niño, A. M., Luna-Acosta, A., Gómez-Cubillos, M. C., Villamil, L., & Ahrens, M. J. (2018). Cholinesterase activity in the cup oyster *Saccostrea sp.* exposed to chlorpyrifos, imidacloprid, cadmium and copper. *Ecotoxicology and environmental safety*, 151, 242-254. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.12.057.

Mount D.I. (1982) Progress in research on ecotoxicity: Single species tests (Part One). In: Mason WT Jr (eds) *Research on Fish and Wildlife Habitat*. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, EPA- 600-8/82-022, 143-149.

Nash, R. G. (1983). Comparative volatilization and dissipation rates of several pesticides from soil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 31(2), 210-217.

Nauen, R. (2006). Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(8), 690-692.

Newman, M. C. (1998). *Fundamentals of ecotoxicology*. Chapter 9. CRC press

Ozoh, P. T. (1979). Malformations and inhibitory tendencies induced to *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) eggs and larvae due to exposures in low concentrations of lead and copper ions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 21(1), 668-675. doi: 10.1007/BF01685487.

Paro, R., Tiboni, G. M., Buccione, R., Rossi, G., Cellini, V., Canipari, R., & Cecconi, S. (2012). The fungicide mancozeb induces toxic effects on mammalian granulosa cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 260(2), 155-161. doi: 10.1016/j.taap.2012.02.005.

Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Sanchez, L. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Bionda, C. L., ... & Basso, A. (2011). Morphological abnormalities in amphibian populations. *Herpetological Conservation and Biology*, 6(3), 432-442.

Peluso, J., Aronzon, C. M., & Pérez Coll, C. S. (2019). Assessment of environmental quality of water bodies next to agricultural areas of Buenos Aires province (Argentina) by means of ecotoxicological studies with *Rhinella arenarum*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(8), 655-664.

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

Pérez Coll, C. S., Aronzon, C. M., & Svartz, G. V. (2017). Developmental stages of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) in toxicity studies: AMPHITOX, a customized laboratory assay. In *Ecotoxicology and Genotoxicology*, 407-424.

Pérez Ponsa, M. E. (2011). Transformaciones en el modelo agropecuario argentino. Incidencias en la soberanía alimentaria. Zainak. Cuadernos de Antropología-Etnografía, 34, 193-200.

Pérez, D. J., Iturburu, F. G., Calderon, G., Oyesqui, L. A., De Gerónimo, E., & Aparicio, V. C. (2021). Ecological risk assessment of current-use pesticides and biocides in soils, sediments and surface water of a mixed land-use basin of the Pampas region, Argentina. *Chemosphere*, 263, 128061.

Pérez, D. J., Okada, E., De Gerónimo, E., Menone, M. L., Aparicio, V. C., & Costa, J. L. (2017). Spatial and temporal trends and flow dynamics of glyphosate and other pesticides within an agricultural watershed in Argentina. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(12), 3206-3216.

Pérez-Iglesias, J. M., de Arcaute, C. R., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G. S., & Larramendy, M. L. (2014). The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 104, 120-126. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.002.

Peruzzo, P. J.; Porta, A. A. y Ronco, A. E. (2008) Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156: 61-66. doi: 10.1016/j.envpol.2008.01.015.

Piazza, Y. G. (2006). Desarrollo gonadal y diferenciación sexual en *Bufo arenarum* (Amphibia, Anura). Efecto de la exposición al xenoestrogeno octilfenol (Doctoral dissertation, MSc Thesis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina).

Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and environmental Ethics*, 8(1), 17-29.

Pimentel, D., & Burgess, M. (2014). Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States. *Integrated Pest Management*, 47–71. doi:10.1007/978-94-007-7796-5_2

Pisa, L. W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Downs, C. A., Goulson, D., ... & Wiemers, M. (2015). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 68-102. doi: 10.1007/s11356-014-3471-x.

PMRA. (2018). “Re-evaluating decision. Mancozeb and its associated end-use products. RVD2018-21. Final decision”. Health Canada Pest Management Regulatory Agency, Ontario.

Post, G. B., Cohn, P. D., & Cooper, K. R. (2012). Perfluorooctanoic acid (PFOA), an emerging drinking water contaminant: a critical review of recent literature. *Environmental research*, 116, 93-117.

Puente Amestoy, F. (1958). Huevos y Larvas de Anfibios. *Munibe Ciencias Naturales* Vol 10 (4): 325-344.

Quaranta, A., Bellantuono, V., Cassano, G., & Lippe, C. (2009). Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. *PLoS One*, 4(11), e7699.

Quiroga L. B., E. A. Sanabria y J. C. Acosta. (2009). Size-and sex-dependent variation in diet of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) in a wetland of San Juan, Argentina. *Journal of Herpetology*, 43: 311–317.

Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A. S., ... & Kaushal, J. (2021). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production*, 283, 124657. doi: 10.1016/j.jclepro.2020.124657.

Relyea, R. A., & Mills, N. (2001). Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2491-2496. doi: 10.1073/pnas.031076198.

Rios, F. M., Wilcoxon, T. E., & Zimmerman, L. M. (2017). Effects of imidacloprid on *Rana catesbeiana* immune and nervous system. *Chemosphere*, 188, 465-469. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.155.

Robles, E. R., Chandler, J. M., Senseman, S. A., & García, J. R. S. (2001). El estado de desarrollo afecta la respuesta del zacate Jonshon [*Sorghum halepense* (L.) Pers] a los herbicidas nicosulfuron y clethodim. *Agrociencia*, 35(5), 525-533.

Rossi, A. (1958). Tavole cronologiche dello sviluppo embrionale e larvale del *Bufo bufo* (L.). *Monitore Zoologico Italiano*, 66, 133-149.

Ruiz de Arcaute, C., Pérez-Iglesias, J. M., Nikoloff, N., Natale, G. S., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2014). Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecological indicators*, 45, 632-639. doi: 10.1016/j.ecolind.2014.05.034.

Sabattini, A. R. A., Ledesma, A. S., Sabattini, J., Fontana, E., Diez, J. M., & Sabattini, I. (2010). INFORME 5. Zonificación de los bosques nativos en los Departamentos Paraná, Nogoyá y Tala (Entre Ríos) según las categorías de conservación.

Sana, B., Reda, D. M., Houria, B., Amel, A., Marwa, B., Fateh, Z. M., & Rima, A. (2015). Toxicological impact of a mimetic estrogen specie: mancozeb on a tadpoles of the green frog (*Rana saharica*). *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 6, 307-314.

Sánchez-Bayo, F., Hyne, R.V. (2014). Detection and analysis of neonicotinoids in river waters — development of a passive sampler for three commonly used insecticides. *Chemosphere* 99, 143–151. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.10.051.

Sánchez-Hernandez, J. C. (2003). Evaluating reptile exposure to cholinesterase-inhibiting agrochemicals by serum butyrylcholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(2), 296-301. doi: 10.1002/etc.5620220209.

Santella, R. M. (1997). DNA damage as an intermediate biomarker in intervention studies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 216(2), 166-171. doi: 10.3181/00379727-216-44166.

Schaaf, A. A. (2013). Uso de pesticidas y toxicidad: relevamiento en la zona agrícola de San Vicente, Santa Fe, Argentina. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(2), 323-331.

Schmidt, M. A. (2015). Política ambiental, avance de la frontera agropecuaria y deforestación en Argentina: el caso de la ley “De Bosques”.

Schmitt-Jansen, M., Veit, U., Dudel, G., & Altenburger, R. (2008). An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges. *Basic and Applied Ecology*, 9(4), 337–345. doi:10.1016/j.baae.2007.08.008

Schulte-Hostedde, A. I., Zinner, B., Millar, J. S., & Hickling, G. J. (2005). Restitution of mass–size residuals: validating body condition indices. *Ecology*, 86(1), 155-163.

Semlitsch, R. D., & Bodie, J. R. (2003). Biological criteria for buffer zones around wetlands and riparian habitats for amphibians and reptiles. *Conservation biology*, 17(5), 1219-1228.

SENASA (2005). Registro Nacional de Terapéutica Vegetal. Estadísticas de importación y exportación. <https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/cadenavegetal/ornamentales/produccion-primaria/fitosanitarios-y-fertilizantes/registro>. Accedido en Octubre 2021

SENASA (2008). Registro Nacional de Terapéutica Vegetal. Estadísticas de importación y exportación. <https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/cadenavegetal/ornamentales/produccion-primaria/fitosanitarios-y-fertilizantes/registro>. Accedido en Octubre 2021

SENASA (2012). Registro Nacional de Terapéutica Vegetal. Estadísticas de importación y exportación. <https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/cadenavegetal/ornamentales/produccion-primaria/fitosanitarios-y-fertilizantes/registro>. Accedido en Octubre 2021

SENASA (2020). Registro Nacional de Terapéutica Vegetal. Estadísticas de importación y exportación. <https://www.ciafa.org.ar/info-fitosanitario-mercado> Accedido en Octubre 2021.

SERA (2005). Imidacloprid - Human Health and Ecological Risk Assessment – Final Report. SERA TR 05-43-24-03ª. <https://www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/pdfs/ImidaclopridFinalReport.pdf> Accedido Octubre 2021.

Shahi, J., & Singh, A. (2014). Genotoxic and haematological effect of commonly used fungicide on fish *Clarias batracus*. Journal of Biology and Earth Sciences, 4(2): 137-143.

Sharma, B., Gopal, K., & Khanna, Y. P. (1993). Interaction of carbaryl with acetylcholinesterase of the teleost, *Clarias batrachus*. Toxicological & Environmental Chemistry, 39(3-4), 147-152. doi: 10.1080/02772249309357911.

Shenoy, K., Cunningham, B. T., Enfroe, J. W., & Crowley, P. H. (2009). Growth and survival of northern leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles exposed to two common pesticides. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 28(7), 1469-1474. doi: 10.1897/08-306.1.

Shoemaker, V. H., Hillman, S. S., Hillyard, S. D., Jackson, D. C., McClanahan, L. L., Withers, P., & Wygoda, M. (1992). Exchange of water, ions and respiratory gases in terrestrial amphibians. In: Environmental physiology of the amphibians, 125-150. The University of Chicago Press.

Simakani, P., Abolhasani, M. H., & Hoseini, S. M. (2018). Determination of mancozeb toxicity and biochemical effects in common carp (*Cyprinus carpio*). International Journal of Aquatic Biology, 6(3), 157-161.

Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., ... & Wiemers, M. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. Environmental Science and Pollution Research, 22(1), 5-34. doi: 10.1007/s11356-014-3470-y.

Skalny, A., Aschner, M., Paoliello, M., Santamaria, A., Nikitina, N., Rejniuk, V., ... & Tinkov, A. (2021). Endocrine-disrupting activity of mancozeb. *Archives of Pharmacy*, 71(Notebook 6), 491-507.

Sprague, J. B. (1969). Measurement of pollutant toxicity to fish I. Bioassay methods for acute toxicity. *Water research*, 3(11), 793-821.

Srivastava, A. K., Ali, W., Singh, R., Bhui, K., Tyagi, S., Al-Khedhairy, A. A., ... & Shukla, Y. (2012). Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. *Life sciences*, 90(21-22), 815-824. doi: 10.1016/j.lfs.2011.12.013.

Srivastava, P., & Singh, A. (2013). Induction of chromosomal aberrations by Carbamate fungicide in fish *Clarius batrachus* (Asian Catfish). *Scholarly Journal of Agricultural Science*, 3(11), 487-491.

Svartz, G. V. (2014). Evaluación de la toxicidad del endosulfán, la cipermetrina y un fungicida de uso comercial, solos y en mezclas sobre el desarrollo temprano de *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Svartz, G. V., Wolkowicz, I. R. ., & Pérez Coll, C. S. (2014). Toxicity of endosulfan on embryo-larval development of the South American toad *Rhinella arenarum*. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(4), 875-881. doi: 10.1002/etc.2506.

Swigert J.P. (1986). Acute Toxicity of Chevron RE-45601 Technical to Rainbow Trout in a Static Test System. Prepared by Analytical Biochemistry Laboratories, Inc., Columbia, MO (ABC Laboratory Project ID #34968). Study Sponsor: Chevron Environmental Health Center, Inc., Richmond, CA. EPA Accession No. 409745-28.

Sztrum, A. A., D'Eramo, J. L., & Herkovits, J. (2011). Nickel toxicity in embryos and larvae of the South American toad: Effects on cell differentiation, morphogenesis, and oxygen consumption. *Environmental toxicology and chemistry*, 30(5), 1146-1152. doi: 10.1002/etc.484.

Thiruchelvam, M. (2005). Mancozeb. In: Wexler, P. (eds) *Encyclopedia of Toxicology* (2nd ed), 5-8. doi: 10.1016/B0-12-369400-0/00575-5.

Thistle, H. (2014). Scoping/Screening Level Risk Assessment on Fluazifop-P-butyl. Final Report. SERA TR 056-08-02b.

Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2009). Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death. *Accounts of chemical research*, 42(2), 260-269.

Tomlin, C. D. (2009). *The pesticide manual: a world compendium*. British Crop Production Council.

Topal, A., Alak, G., Ozkaraca, M., Yeltekin, A. C., Comaklı, S., Acıl, G. & Atamanalp, M. (2017). Neurotoxic responses in brain tissues of rainbow trout exposed to imidacloprid pesticide: Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 175, 186-191. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.047

USEPA (1993). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. US Environmental Protection Agency 4th Ed. EPA/600/4. Accedido 29 de septiembre 2021.

USEPA (2004). Imidacloprid; Order Denying Objections to Issuance of Tolerance, and Final Order Imidacloprid; Pesticide Tolerance; Final Rules. 40 CFR part 180. 69, 102, 30042-30073.

USEPA (2005). "Reregistration Eligibility Decision for Mancozeb". United States Environmental Protection Agency, Prevention Pesticides and Toxic Substances (7508C) 738-R-04-012.

https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-014504_20-Sep-05.pdf. Accedido Agosto 2021.

USEPA (2014). Clethodim Human Health Risk Assessment. DP No. D41 1899.

USEPA (2017). *Pesticides Industry Sales and Usage: 2008–2012 Market Estimates*.

USEPA (2020). Imidacloprid Proposed Interim Registration Review Decision. Docket Number EPA-HQ-OPP-2008-0844.

[https://www.epa.gov/sites/default/files/2020-](https://www.epa.gov/sites/default/files/2020-01/documents/imidacloprid_pid_signed_1.22.2020.pdf)

[01/documents/imidacloprid_pid_signed_1.22.2020.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2020-01/documents/imidacloprid_pid_signed_1.22.2020.pdf) Accedido Octubre 2021.

USEPA (2021). Technical Overview of Ecological Risk Assessment: Risk Characterization. <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-risk>. Accedido Octubre 2021.

USGS (2013). Pesticide National Synthesis Project. Pesticide Use Maps. Maps up to 2009. Entry for Clethodim. <http://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/usage/maps>. Accedido Octubre 2021.

Vaira, M., Akmentins, M. S., & Lavilla, E. O. (2018). El estado de conservación de los anfibios en la República Argentina.

Vaira, M., Akmentins, M., Attademo, M., Baldo, D., Barrasso, D., Barrionuevo, S., ... & Zaracho, V. (2012). Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. Cuadernos de herpetología, 26, 131-159.

van der Werf, H. M. (1996). Assessing the impact of pesticides on the environment. Agriculture, Ecosystems & Environment, 60(2-3), 81-96.

Vera Candioti, J., Natale, G. S., Soloneski, S., Ronco, A. E., & 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. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.10.064

Verdonck, F. A., Aldenberg, T., Jaworska, J., & Vanrolleghem, P. A. (2003). Limitations of current risk characterization methods in probabilistic environmental risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 22(9), 2209-2213.

Victoriano Serrano, F. (2010). Estado, golpes de Estado y militarización en América Latina: una reflexión histórico política. Argumentos (México, DF), 23(64), 175-193.

Viglizzo, E., & Jobbágy, E. G. (2010). En Viglizzo, E., & Jobbágy, E. G. (eds) Expansión de la frontera agropecuaria en Argentina y su impacto ecológico-ambiental. Buenos Aires: Ediciones INTA.

Villaverde, J. J., Sevilla-Morán, B., López-Goti, C., Calvo, L., Alonso-Prados, J. L., & Sandín-España, P. (2018). Photolysis of clethodim herbicide and a formulation in aquatic environments: Fate and ecotoxicity assessment of photoproducts by QSAR models. *Science of the Total Environment*, 615, 643-651. doi: 0.1016/j.scitotenv.2017.09.300.

Waddle, J. H. (2006). Use of amphibians as ecosystem indicator species (Doctoral dissertation, University of Florida).

Wagner, S. (2016). Environmental fate of imidacloprid. California Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA.

Wang, H., Zhou, L., Meng, Z., Su, M., Zhang, S., Huang, P., ... & Lu, H. (2019). Clethodim exposure induced development toxicity and behaviour alteration in early stages of zebrafish life. *Environmental Pollution*, 255, 113218. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113218.

Wisman P. (1985). Epa History (1970-1985). US Environmental Protection Agency. <https://archive.epa.gov/epa/aboutepa/epa-history-1970-1985.html> Accedido Octubre 2021.

Wong, F. P., & Wilcox, W. F. (2001). Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb, and metalaxyl against *Plasmopara viticola* (grapevine downy mildew). *Plant disease*, 85(6), 649-656. doi: 10.1094/PDIS.2001.85.6.649.

Xiong, G., Zou, L., Deng, Y., Meng, Y., Liao, X., & Lu, H. (2019). Clethodim exposure induces developmental immunotoxicity and neurobehavioral dysfunction in zebrafish embryos. *Fish & shellfish immunology*, 86, 549-558. doi: 10.1016/j.fsi.2018.12.002.

Xu, S. (2000). Environmental fate of mancozeb. *Environmental monitoring and pest management*.

Yadav, I. C., & Devi, N. L. (2017). Pesticides classification and its impact on human and environment. *Environmental science and engineering*, 6, 140-158.

Yadav, I. C., Devi, N. L., Syed, J. H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G., & Jones, K. C. (2015). Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Science of the Total Environment*, 511, 123-137. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.12.041.

Zacharia, J. T. (2011). Ecological effects of pesticides. *Pesticides in Modern Worlds-Risks and benefits*. Publisher InTech, 129-142.

Zarrilli, A. (2020). La Naturaleza puesta en Jaque: La Expansión de la Frontera Agropecuaria en Argentina y su Impacto Socio-Ambiental (1980-2017). *Historia Ambiental Latinoamericana y Caribeña (HALAC) revista de la Solcha*, 10(1), 125-149.

Zawia, N. H., Crumpton, T., Brydie, M., Reddy, G. R., & Razmiafshari, M. (2000). Disruption of the zinc finger domain: a common target that underlies many of the effects of lead. *Neurotoxicology*, 21(6), 1069-1080.

Zhang, H., Wei, K., Zhang, M., Liu, R., & Chen, Y. (2014). Assessing the mechanism of DNA damage induced by lead through direct and indirect interactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 136, 46-53. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.04.020.