

Evaluación de la toxicidad provocada por el herbicida Picloram fórmula comercial Tordon ® 24K en larvas de *Boana pulchella* (Anura: Hylidae)



Tesina para optar por el grado de Licenciada en Ciencias Biológicas
Profundización en Ecología

Bachiller Mariabelén Riero

Orientador: Dr. Raúl Maneyro

Co-orientador: MSc. Gisela Pereira

Facultad de Ciencias – Universidad de la República

ÍNDICE:

AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN	6
Actividad agrícola y uso de agroquímicos en Uruguay	6
Agroquímico en estudio: Picloram.....	6
Los anuros como bioindicadores.....	7
Ecotoxicología y su uso en anfibios	7
La especie en estudio: <i>Boana pulchella</i>	8
Genotoxicidad en anfibios	9
Objetivo.....	11
Hipótesis	11
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Colecta de puestas	11
Experimentos de concentración aguda CL50	12
Experimentos de concentración crónica subletal.....	12
Ensayo de micronúcleos en eritrocitos (MNT)	14
Procesamiento y análisis de datos	15
RESULTADOS.....	16
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	21
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos aquellos que de alguna forma contribuyeron para que este trabajo se pudiese concretar.

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor Raúl Maneyro por la oportunidad, la confianza, la paciencia, sus correcciones y aportes.

Gracias a mi co-orientadora Gisela Pereira. Por estar a cada paso y acompañarme en todo, incluso hasta los lugares más extraños para ir buscar puestas! Por el apoyo y aguante incondicional, las contribuciones, las anécdotas y las palabras de aliento.

A los docentes del tribunal Dr. Enrique Morelli y Dr. Alejandro Márquez por aceptar ser parte, por sus correcciones y aportes.

Al Dr. Rafael Lajmanovich por toda la ayuda brindada durante los experimentos.

A Gastón, Eco y Gise por acompañarme y ayudarme en la búsqueda de las puestas. Que por suerte y finalmente fueron un éxito!

A mis compañeros de laboratorio y también con los que compartimos el espacio a diario: a Joaco, Eco, Gise, Lucía, Luccina, Elena y Paulina. Por las palabras de ánimo tan necesarias en tantos momentos y la infinita paciencia. En especial a Eco y Joaco por el aguante y por estar siempre dispuestos a ayudar, incluso dejando de hacer lo que sea que estén haciendo. A todos: Gracias chiquitos!

A Gabriela Eguren y Noelia por prestarnos un lugar en el piso 11 y por la buena onda de siempre.

Al departamento de microscopía electrónica del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), por permitirme usar el microscopio de epi-fluorescencia y a Daniela Olsson por toda la ayuda.

A mis jefes de mi otro Laboratorio Fabiana Sánchez y Francesc Muñoz, por el apoyo y la comprensión. Por permitirme cambiar miles de veces el horario. Sin su ayuda no hubiese sido posible.

A mis amigos todos: Fer, Vale, Andre, Lore, Fede, Guille, Mari, Sofi, Andrea, Manolo, Lu, Flor y Emi. Gracias por estar siempre, por la preocupación y bancarme en todas.

En especial quiero agradecer a mis amigas, pero también compañeras de esta larga travesía, a Lu, Emi y Flor; por toda la ayuda, por cada "fixture" que armamos, por las horas de estudio y otras tantas de risas compartidas. Finalmente, puedo decirles chiquitas que: "salió con fritas"!

A mi familia, Gonzalo, Sandra, sobrinos y primos, en especial a mis hermanos porque son los mejores del mundo. Gracias a todos por acompañarme, por el amor y apoyo incondicional, porque de otra forma no lo hubiese logrado.

Y finalmente quiero darle las gracias al motor de mi vida, a Santi. Por ser mucho más de lo que se puede pedir y brindarme todo el amor del mundo. Por darme la fuerza para seguir e intentar ser mejor persona y mamá. Te amo gordito.

A todos Muchas Gracias...

RESUMEN

Los agroquímicos tales como pesticidas, herbicidas, fertilizantes, utilizados con el fin de controlar las plagas de los cultivos y mejorar su rendimiento, representan factores de riesgo con efectos negativos tanto en el ambiente como en la salud humana. Los estudios ecotoxicológicos resultan una buena herramienta para evaluar y caracterizar el impacto causado por los plaguicidas en organismos no blanco. En este sentido los anfibios anuros son utilizados como modelos biológicos en experimentos de investigación en toxicología, sobre todo en su fase larval. En el presente trabajo se evaluaron los efectos de toxicidad provocados por el herbicida Picloram sal potásica fórmula comercial Tordon ® 24K en larvas de *Boana pulchella* (Anura: Hylidae). Las larvas, fueron sometidas en el laboratorio, a distintas concentraciones del herbicida con el objetivo de evaluar los efectos por exposición aguda y crónica. Se determinó que la concentración letal media a 48 horas de exposición (CL5048hrs) fue de 16,5 mg/L, la LOEC (Lowest observed effect concentration) fue de 14,5 mg/L y la NOEC (Not observed effect concentration) fue de 12,5 mg/L de Picloram. No se encontraron diferencias significativas entre las variables morfométricas y la masa de los individuos provenientes de los distintos tratamientos. Tampoco se registraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento entre individuos. Se realizaron análisis de genotoxicidad mediante la aplicación del test de Micronúcleos (MNT) en eritrocitos. Se pudo comprobar la presencia de daño genotóxico y citotóxico por la aparición de micronúcleos (MNs) y aberraciones nucleares (AN). La frecuencia de ocurrencia de AN fue mayor para los tratamientos a concentraciones agudas mientras que la frecuencia de ocurrencia de MNs fue mayor a concentraciones subletales, correspondiéndose con resultados reportados previamente.

ABSTRACT

Agrochemical such as pesticides, herbicides, fertilizers, used in order to control crop pests and improve their yield, representing risk factors with negative effects on both the environment and human health. Ecotoxicological studies had a good tool to evaluate and characterize the impact affected by pesticides on non-target organisms. In this sense, anuran amphibians are used as biological models in toxicology research experiments, especially in their larval phase. In the present work, evaluate the toxicity effects caused by the herb Picloram potassium salt commercial formula Tordon® 24K in larvae of *Boana pulchella* (Anura: Hylidae). The larvae were sometimes in the laboratory, the different variables of the herbicide with the objective of evaluating the effects of acute and chronic exposure. The mean lethal concentration at 48 hours of exposure (LC5048hrs) was determined to be 16.5 mg / L, LOEC (lowest observed effect concentration) of 14.5 mg / L and NOEC (Not observed effect concentration) of 12.5

mg/L of Picloram. No specific differences were found between the morphometric variables and the mass of the individuals coming from the different treatments. Nor were there specific differences in growth rates between individuals. The genotoxicity analysis is applied by applying the Micronucleus test (MNT) in erythrocytes. The presence of genotoxic and cytotoxic damage could be detected by the appearance of micronuclei (MNs) and nuclear aberrations (AN). The frequency of occurrence of AN was higher for treatments at acute concentrations, while the frequency of occurrence of MNs was higher at sublethal concentrations, corresponding to previously reported results.

INTRODUCCIÓN

Actividad agrícola y uso de agroquímicos en Uruguay

Dentro de las actividades económicas que se desarrollan en Uruguay, la agricultura ocupa un lugar relevante, seguida por una sostenida expansión de la forestación en las últimas décadas impulsada por beneficios fiscales incluidos en la Ley Forestal de 1987 (Ley 15.939). Esto se ve reflejado conforme a los datos obtenidos de exportaciones de los últimos cinco años según OEC (Operador Económico Calificado), en donde la exportación de pasta de celulosa representa el 16,2% del total, seguida por la de carne bovina que ocupa casi un 13%. (<https://oec.world/es/profile/country/ury/>). La práctica de las actividades, tanto agrícolas como forestales, lleva implícito el uso de agroquímicos como fertilizantes y plaguicidas, los cuales son un factor con alto potencial de contaminación ambiental (Lajmanovich et al., 2012). El empleo de los mismos se traduce en la incorporación de sustancias xenobióticas a los ecosistemas, es decir, productos artificiales sintetizados por el hombre. En la naturaleza, generalmente no existen mecanismos metabólicos para la degradación de estos productos (Izaguirre et al., 2006). Por este motivo, resulta indispensable poder predecir sus posibles efectos en los ecosistemas, en especial en los receptores “no blanco”, así como también en la salud humana. Un ejemplo de ello son los efectos negativos de insecticidas sobre algunas poblaciones animales, como peces y abejas (Leites, 2009; Ríos et al., 2010; Colombo et al., 2011). Por otra parte, ya se ha reportado también la presencia de agroquímicos tanto en agua como en sedimentos (Eguren et al., 2008; Cantou et al., 2010; Nardo et al., 2015) así como se ha demostrado su incidencia en el deterioro de la calidad de agua en sistemas límnicos (Kruk et al., 2013). Sin embargo, los estudios realizados en la región hasta la actualidad resultan insuficientes, en general en lo referente a efectos sobre organismos “no blanco”, y en particular sobre vertebrados.

Agroquímico en estudio: Picloram

El Picloram sal potásica (ácido-4-amino-3,5,6 tricloropicolínico/CAS# 2545-60-0) (PAN Pesticide Database, 2019), es un herbicida sistémico, trasladado a través de la planta por el floema, ya sea por aplicación foliar a las raíces, o aplicación en el suelo hasta las hojas. Actúa como regulador del crecimiento, con acción hormonal y rápida absorción, sirve para el control de plantas leñosas, malezas de hoja ancha, anuales y perennes. Es selectivo, es decir, elimina las hierbas indeseadas respetando al cultivo indicado (Corteva agriscience 2019). Es utilizado en variedad de cultivos y producido en diversas formulaciones comerciales. En Uruguay una de las formulaciones más utilizadas es el Tordon® 24K concentrado soluble (Dow AgriSciences- Argentina), con una concentración de Picloram de 278 gr/l (240 gr/l Eq.Ac.).

Está clasificado como categoría toxicológica III (Poco peligroso) según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Presenta una alta solubilidad en agua (430 mg/l – 1), pero una difícil degradación en la misma. Se ha declarado una toxicidad moderada para aves, peces, abejas y lombrices de tierra (Britt et al., 2003). Estudios recientes de toxicidad demostraron que el Picloram inhibe la actividad enzimática de colinesterasas (ChEs) e induce genotoxicidad en larvas de *Rhinella arenarum* (Lajmanovich et al., 2013).

Los anfibios como bioindicadores

Según Stahl Jr. (1997) un bioindicador puede ser cualquier organismo no humano capaz de reaccionar tempranamente o ser sensible a un contaminante ambiental o a un estrés. El uso de indicadores biológicos ayuda no sólo a evaluar la calidad del ambiente, sino también las respuestas de estos organismos a los cambios ambientales provocados por la contaminación, reflejando además la historia del ecosistema (Barbour et al., 1999; Pollo et al., 2019). Los anfibios presentan características biológicas y fisiológicas que los hacen buenos bioindicadores (Wells, 2007), entre éstas se destacan la presencia de una piel delgada y permeable; y un ciclo de vida bifásico que alterna etapas de vida acuática y terrestre. Adicionalmente, cabe destacar que ocupan un lugar de relevancia en la cadena trófica ya que sirven como enlaces críticos entre niveles tróficos bajos y altos dentro de una comunidad (Duellman y Trueb, 1994; Hopkins, 2007; Young et al., 2004). Dado que habitan ambientes que pueden estar asociados o inmersos en sistemas agrícolas poseen una alta probabilidad de entrar en contacto con agroquímicos presentes en los cuerpos de agua (receptores de contaminación), así como también en el suelo (sitio en donde se realiza la aplicación directa) (García-Muñoz et al., 2010). En consecuencia, los anfibios anuros resultan ser organismos con un importante potencial como bioindicadores ambientales tanto para el monitoreo de campo, así como también para evaluaciones de laboratorio, debido a la facilidad de mantenimiento y manejo en cautiverio, su elevada capacidad de proliferación y regeneración de tejido, además de la gran sensibilidad que presentan tanto las larvas como los individuos adultos a los cambios del medio ambiente (Pérez et al., 2009).

Ecotoxicología y su uso en anfibios

En los últimos años la preocupación por el declive de anfibios a nivel mundial, así como también por la evidencia del incremento de la frecuencia de malformaciones registradas en la naturaleza (Pollo et al., 2019) han llevado a un aumento de estudios ecotoxicológicos en estos animales. Los contaminantes químicos se consideran factores estresantes ambientales con altas posibilidades de que su efecto negativo impacte también sobre la salud humana (Ankley

et al., 2004; Peltzer et al., 2011). Como fue mencionado anteriormente, los anfibios son excelentes bioindicadores del estado de conservación de los ecosistemas, por ello, son utilizados como modelos biológicos en experimentos de investigación de toxicología. Esto permite la evaluación de los efectos tóxicos de diferentes productos químicos, caracterizando sus probabilidades de riesgo y mecanismos de acción (i.e. Paganelli et al., 2010), pudiendo ser útiles para determinar el rango de sensibilidad de las especies y realizar predicciones realistas a escala poblacional (Chai et al., 2016). En este sentido, un primer acercamiento consiste en determinar valores de toxicidad aguda de diferentes pesticidas para luego poder evaluar los posibles efectos a menores concentraciones (toxicidad crónica). Las pruebas de concentraciones letales (CL50) proporcionan información de dosis-respuesta al someter organismos a diferentes concentraciones del químico a estudiar. Éstas permiten evaluar los principales efectos de los contaminantes calculando la concentración que resulta letal para el 50% de individuos expuestos durante un corto periodo de tiempo (24-96 h), o la concentración más alta del efluente en la que la supervivencia no es estadísticamente significativa diferente del control (USEPA, 1975). Por otra parte, los valores umbrales de concentraciones más bajas se conocen como NOEC y LOEC. NOEC (por su sigla en inglés que significa “Concentración de efecto no observado”) es la concentración más alta en un ensayo subletal que no ocasiona un efecto adverso estadísticamente significativo en comparación con el control y la concentración LOEC (en inglés: “Concentración de efecto más bajo”) corresponde a la concentración más baja que ocasiona un efecto adverso del compuesto químico evaluado estadísticamente significativo respecto al control en un ensayo subletal (USEPA, 1989).

Los efectos en anfibios pueden evaluarse tanto en los estadios acuáticos como en los terrestres, pero la fase larval es la más utilizada en los estudios toxicológicos. En esta etapa presentan gran plasticidad y existe evidencia de que son más sensibles que los adultos frente a los cambios ambientales, al tiempo que son de fácil y económico mantenimiento en laboratorio (Pigliucci et al., 2006; Hopkins, 2007).

La especie en estudio: *Boana pulchella*

Boana pulchella (Duméril y Bibron 1841), es una especie trepadora de la familia Hylidae. El tamaño de los ejemplares adultos generalmente no supera los 5 cm. Presenta una extensa distribución en el Bioma Pampa y es particularmente abundante en todo el territorio uruguayo (Maneyro y Carreira, 2012). Habita distintos ambientes naturales tales como bosques ribereños, bañados con vegetación flotante o emergente, praderas de tierras bajas inundables, pastizales contiguos a cuerpos de agua dulce y es común encontrarla en ambientes antropogénicos (Maneyro y Carreira, 2012). Presenta una estrategia reproductiva prolongada

con mayor actividad al final del verano y comienzo del otoño, y las puestas consisten en masas gelatinosas unidas a los tallos sumergidos de plantas acuáticas (Natale et al., 2000).

Se alimenta de una variedad de invertebrados, principalmente insectos, pero con variación en la dieta entre individuos (da Rosa et al., 2011) así como entre ambientes o épocas del año (Maneyro y da Rosa, 2004) dando idea de que se trata de una especie típicamente generalista.

Genotoxicidad en anfibios

Un agente tóxico es aquel capaz de producir una respuesta adversa en un sistema biológico. Aquellos que producen algún tipo de alteración en el material genético o en sus componentes asociados, se les reconoce como agentes genotóxicos (Zuluaga et al., 2009). Dentro de este término se incluyen los agentes que interaccionan tanto directa como indirectamente con el ADN causando mutaciones y los que interfieren en algunos procesos enzimáticos de la polimerización o reparación del material proteico involucrado en la segregación cromosómica (Du Four, 2004; González et al, 2004). Los efectos provocados por agentes genotóxicos son considerados señales de alerta temprana y se pueden determinar mediante el empleo de biomarcadores moleculares (indicadores de eventos moleculares y celulares en sistemas biológicos). Esta determinación es clave en la comprensión de las relaciones entre la exposición ambiental a químicos tóxicos y el desarrollo de enfermedades crónicas, en la identificación de individuos que presentan mayor riesgo; y también permite asociar los efectos a niveles menores con los niveles superiores de organización ecológica (Dursinska y Collins, 2008; Newman, 2014). En este sentido, ya han sido reportados varios estudios sobre el efecto genotóxico provocado por distintos agroquímicos sobre anfibios de diversos grupos taxonómicos en distintas partes del mundo (Lajmanovich et al., 2005; Cabagna et al., 2006; Ismaeil et al., 2014; Yin et al., 2008; - 2009, Clements et al., 1997).

Uno de los métodos más utilizados para evaluar el daño genotóxico probable de un agroquímico es mediante el Test de Micronúcleos (MNT). Dicha prueba consiste en una técnica citogenética en la que se realiza el conteo de micronúcleos (Al-Sabti y Metcalfe, 1995). Los micronúcleos son cromatina citoplasmática que contiene cuerpos formados por fragmentos de cromosomas excéntricos o son el resultado de cromosomas que se retrasan durante la anafase y no pueden incorporarse en núcleos de células hijas durante la división celular, ya sea por la falta de centrómeros o por daño en el huso mitótico (ver figura 1) (Schmid, 1975). La incidencia de micronúcleos es entonces un indicador indirecto de daño cromosómico que demuestra un defecto en la capacidad de la célula para dividirse correctamente (Ali et al., 2008). Puede ser aplicado a cualquier población celular que se esté dividiendo independientemente de su cariotipo (Hayashi, 2016), por ello, son utilizadas principalmente células epiteliales o sanguíneas. En anfibios, el MNT es aplicado fácilmente a eritrocitos ya

que presentan ciertas características tales como, mayor tamaño en comparación a los mamíferos, son predominantes en las muestras de sangre en tasas superiores al resto de las células sanguíneas y poseen un núcleo de gran tamaño (Barni et al., 2007; Campbell 2015). Este ensayo, posee ciertas ventajas y está siendo cada vez más utilizado en organismos acuáticos para detectar posibles efectos mutagénicos y/o de daño nuclear (Ali et al., 2008; Gutiérrez et al., 2014). Principalmente permite evaluar de manera simultánea la inestabilidad cromosómica, el estatus mitótico y la viabilidad celular en una misma célula, el procesamiento es sencillo, al igual que la fijación y mantenimiento de la muestra, además de presentar un bajo costo económico (Fenech, 2007). No obstante, esta técnica también tiene limitaciones, ya que está restringida a células que atravesaron la primera división mitótica y es útil sólo en células somáticas nucleadas.

Además de los micronúcleos, existen también anomalías o aberraciones nucleares (AN) descritas por Carrasco et al (1990) que constituyen un análisis complementario al MNT ya que también indican daño genético. De acuerdo a la clasificación propuesta por Carrasco et al (1990), dentro de las AN se pueden distinguir entre otras: hendiduras nucleares o Notched, células binucleadas, gemaciones nucleares o Buds y núcleos lobulados. Todas éstas, ya han sido observadas y reportadas en eritrocitos de anfibios como consecuencia de la exposición a agentes genotóxicos, entre otros (Lajmanovich et al., 2014).

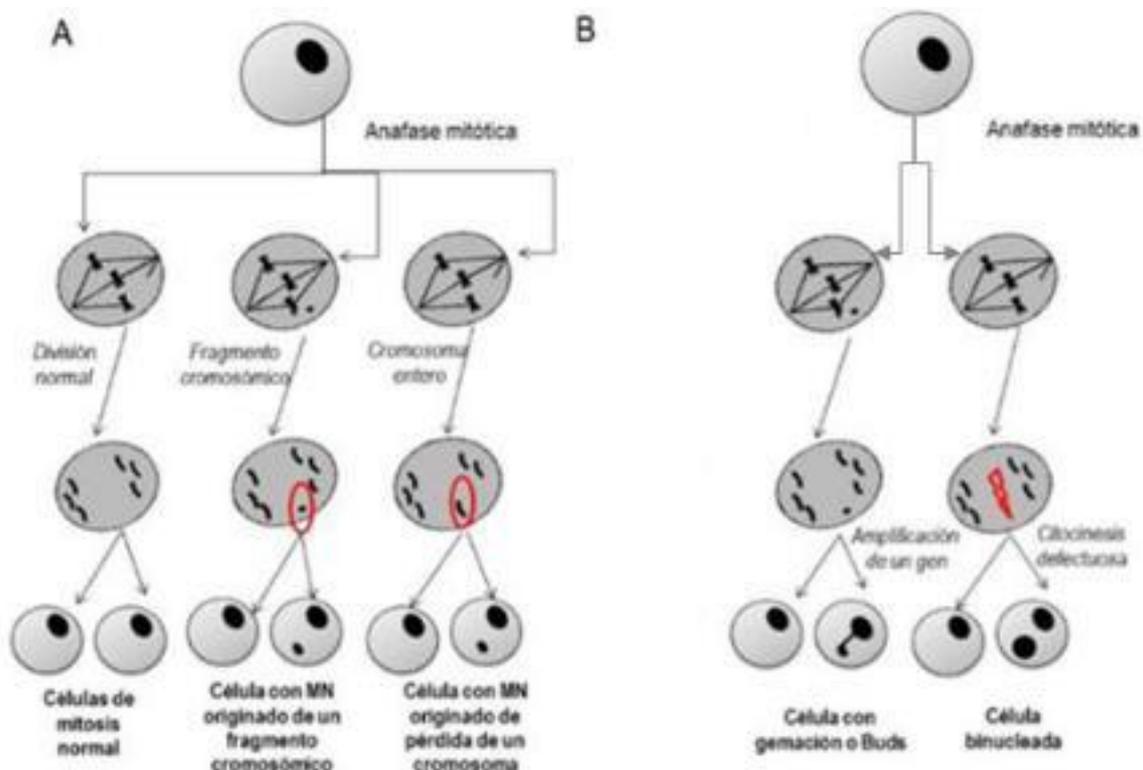


Figura 1. Diagrama de la posible morfogénesis de los micronúcleos (A) y (B) algunas anomalías nucleares en eritrocitos de larvas y adultos de anuros. Modificado de Grazia-Andreassi et al. (2007) esquema de MNs y Migliore et al. (2011).

Objetivo

Evaluar los efectos tóxicos de una sustancia de uso frecuente en nuestro país: Picloram sal de potasio (Tordón, 24K®), sobre el desarrollo larvario y la metamorfosis de *Boana pulchella*.

Objetivos particulares:

- Evaluar efectos letales por exposición aguda (mortalidad) y efectos subletales por exposición crónica (crecimiento, desarrollo, presencia de anomalías) en larvas de *B. pulchella* expuestas a distintas concentraciones de Picloram.
- Obtener valores de concentración CL50, LOEC y NOEC que sirvan de referencia para futuros estudios de evaluación de peligrosidad del compuesto empleado en organismos “no blanco” (anfibios en desarrollo temprano).
- Evaluar efectos genotóxicos por exposición aguda y crónica al herbicida Picloram en larvas de *B. pulchella*.
- Determinar la frecuencia de ocurrencia de micronúcleos y aberraciones nucleares en eritrocitos de larvas de *B. pulchella* expuestas a distintas concentraciones de Picloram.

Hipótesis

El herbicida Picloram, introducido de manera directa o indirecta en ambientes acuáticos, induce efectos letales y subletales a distintos niveles (individual y citogenético), incluyendo genotoxicidad en larvas de *Boana pulchella*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de puestas

Se colectaron manualmente tres puestas de *B. pulchella* en charcos ubicados en la zona oeste del departamento de Montevideo, Uruguay con baja incidencia de agroquímicos. Cada una de las puestas colectadas se colocó en recipientes plásticos con tapa y agua del sitio a temperatura ambiente y se trasladó al laboratorio.

Una vez en el laboratorio se mantuvieron en los mismos recintos hasta el estadio de desarrollo 9 (GS9) según la clasificación propuesta por Gosner (Gosner, 1960). Luego se traspasaron a peceras de vidrio con capacidad de 25 L con agua de bioensayo (agua de red previamente filtrada por filtro PSA que permite purificar moléculas de Cloro, metales pesados y pesticidas). Las larvas se mantuvieron bajo condiciones controladas: temperatura del aire-agua $22\pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo 16-8 (horas luz-oscuridad) y oxigenadores con burbujeo constante a ± 90 burbujas

por minuto, hasta que alcanzaron el estadio de desarrollo 25 (GS25), momento en el que se convirtieron en individuos con morfología larval y opérculo completo, aptos para alimentarse independientemente, pero con reservas energéticas de vitelo que les permite sobrevivir durante algunos días sin comer (Gosner, 1960).

Experimentos de concentración aguda CL50:

Entre los estadios GS25 y GS29 se realizaron pruebas de toxicidad exploratorias preliminares para la determinación del intervalo de concentración a testar en el ensayo de toxicidad aguda CL50. Una vez determinado el rango de concentración letal a partir de las pruebas exploratorias, se procedió con los experimentos de CL50 durante un período de 48 horas (CL5048hs). Se emplearon 8 larvas por tratamiento aplicando un modelo estático sin renovación estandarizado según USEPA, es decir, los organismos de ensayo fueron expuestos a la misma solución de prueba durante la duración del bioensayo (USEPA, 1975). Se suspendió la alimentación de las larvas 24 horas antes del inicio del experimento, y durante la realización del mismo se controlaron y mantuvieron los parámetros físico-químicos del agua según USEPA: oxígeno disuelto (DO) $8,2\pm\text{mg/L}$, conductividad $247,0\pm\text{mS/cm}^3$ y pH 7,5. El fotoperíodo fue de 16:8 h luz/oscuridad y la temperatura $20\pm^\circ\text{C}$. Las larvas fueron colocadas en frascos de vidrio con capacidad de 3 L. La ubicación de los frascos y la elección de los individuos empleados en cada tratamiento se realizó de forma aleatoria. Se revisaron y realizaron tareas de limpieza y remoción de individuos muertos cada 24 hrs., hasta finalizar el experimento.

Preparación de los tratamientos.

Se empleó una solución concentrada de Picloram sal potásica fórmula comercial Tordón 24K, concentración 240 g/L, para preparar una solución madre de 240 mg/L. A partir de esta solución madre se hicieron diluciones seriadas para preparar las soluciones con las concentraciones en un volumen final de 2 L de agua filtrada: 8.5, 10.5, 12.5, 14.5 y 16.5 mg/L. Se llevó a cabo además un control negativo (0,0 mg/L de Picloram). Todos los tratamientos y el control se realizaron por duplicado.

Experimentos de concentración crónica subletal:

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad aguda CL50, se determinó el valor NOEC como la concentración máxima que no presentó diferencias significativas con el control ($p<0.05$). Posteriormente, se procedió a realizar los experimentos de toxicidad crónica.

Se utilizaron 4 larvas por tratamiento y se aplicó un modelo estático con renovación estandarizado según USEPA (1975), en donde los organismos de prueba se exponen a una solución nueva de la misma concentración de la muestra cada 48 horas mediante la sustitución de la totalidad de la solución (USEPA, 1975). Se evaluaron dos tratamientos (T0 y T1) y un control negativo (C=0,0 mg/L de Picloram), en todos los casos se realizaron tres réplicas de cada uno. El primero de los tratamientos (T0) consistió en la colocación de renacuajos expuestos en algún momento de su desarrollo a concentraciones de Picloram menores a la NOEC (< NOEC). Por su parte, en el segundo tratamiento (T1) la concentración de Picloram correspondió al valor NOEC preparado del mismo modo que para el ensayo CL50 a partir de una dilución de una solución madre de 240 mg/L. El experimento se extendió hasta que al menos una de las lavas expuestas al herbicida alcanzó el estadio 45 (GS45), momento previo al clímax metamórfico (Gosner, 1960). La duración del experimento fue de ocho semanas. Las larvas fueron alimentadas con lechuga hervida (*Lactuca sativa*) y alimento en escamas para peces (Espirulina) durante todo el experimento. Cada vez que se realizó el cambio de solución (48 hrs) se midieron y mantuvieron constantes los parámetros físico-químicos del agua (DO, conductividad, pH y temperatura) según USEPA. El fotoperíodo fue de 16:8 h luz/oscuridad y la temperatura $21\pm^{\circ}\text{C}$. Una vez cada 15 días todos los organismos de prueba fueron pesados en balanza de precisión Radwag WTB 2000 con capacidad máxima: 2 kg; resolución: 0,01 g, linealidad: +/- 0,03 g, para determinar su masa corporal; y fotografiados para una posterior determinación de medidas morfológicas tales como: profundidad máxima de la aleta caudal (TD), longitud máxima de la cola (TL), profundidad máxima del músculo de la cola (MD), profundidad máxima del cuerpo (BD), longitud máxima del cuerpo (BL), ancho máximo del músculo de la cola (TW), y ancho máximo del cuerpo (BW) según (Relyea y Werner, 2000) (ver figura 1). Las mediciones se determinaron mediante el uso del software Micrometrics SE Premium. Una vez finalizados los experimentos crónicos subletales, se sometieron cuatro nuevas larvas a un tratamiento con concentración aguda (T2) de 18 mg/L de Picloram. El mismo se realizó por triplicado y bajo las mismas condiciones. Tuvo una duración de 24 horas y durante este tiempo las larvas no fueron alimentadas.

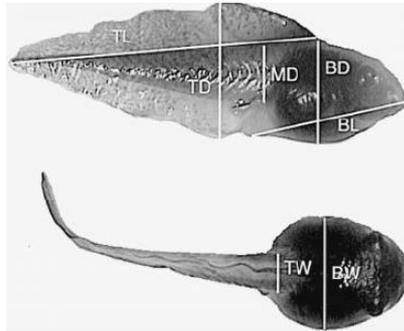


Fig. 1. Lateral and dorsal views of a wood frog tadpole showing the seven linear measures used in the analyses of morphological plasticity (BD = body depth, BL = body length, BW = body width, TD = tail depth, TL = tail length, MD = muscle depth, and MW = muscle width).

Figura 1: Vistas lateral y dorsal de larva de anuro que muestra las siete medidas lineales utilizadas en los análisis de plasticidad morfológica: profundidad del cuerpo BD, longitud del cuerpo BL, profundidad de la cola TD, longitud de la cola TL, profundidad del músculo de la cola MD, ancho del cuerpo BW y ancho del músculo de la cola TW. Extraído de Relyea y Werner, 2000.

Ensayo de micronúcleos en eritrocitos (MNT)

Las larvas sobrevivientes de los experimentos por exposición a concentraciones agudas (T2), crónicas (T0 y T1) y las correspondientes al control (C) fueron sometidas a ensayo de micronúcleos en eritrocitos (MNT). Los renacuajos fueron eutanasiados con eugenol al 10%, posteriormente se les extrajo sangre por decapitación y/o punción cardiaca y se prepararon de cada uno, frotis de sangre periférica sobre portaobjetos limpios por duplicado. Se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas y se fijaron con etanol absoluto durante 15 minutos; luego se tiñeron con naranja de acridina para su procesamiento. La frecuencia de micronúcleos (MNs) se determinó en 1000 eritrocitos por portaobjetos, utilizando un microscopio de epi-fluorescencia Zeiss Axioplan 2 con 1000X de magnificación de acuerdo con los criterios de Krauter (1993), Lajmanovich et al. (2005) y Cabagna et al. (2006). Se observaron y registraron MNs, así como las aberraciones nucleares (AN) presentes.

Los métodos de colecta, experimentación y eutanasia se encuentran contenidos dentro de los protocolos experimentales número 474 y 684 aprobados por la Comisión de Ética en el uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Ciencias.

Criterios generales para identificación y reconocimiento de MNs (Schmid 1975; Fenech 2000; Zalacain et al., 2005)

- El diámetro del micronúcleo debe oscilar entre 1/16 y 1/3 del diámetro del núcleo principal y debe estar separado de éste.
- Debe haber una identificación clara del límite nuclear.
- No debe ser más refractivo.

- Debe tener un color e intensidad como la del núcleo principal o mayor, su forma puede ser esférica u oval.
- Debe estar incluido en el citoplasma celular.

Procesamiento y análisis de datos

Los análisis estadísticos para la determinación de la concentración CL50 fueron realizados en el software BioEstat 5.0. Se utilizó el test no paramétrico Spearman- Karber, con un nivel de confianza del 95%. Se comprobó en todos los casos la normalidad de los datos mediante test Shapiro-Wilk y se estableció un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Los individuos al comienzo de los experimentos por exposición crónica presentaron diferencias de tamaño, por lo cual, para su corrección se utilizó el valor delta (δ) de cada variable morfológica medida (diferencia de las medidas al final e inicio del ensayo). De esta manera se compensa el efecto de heterogeneidad de la muestra que podría actuar como un factor de distorsión en los análisis morfológicos. Para comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas de las variables morfológicas entre los tratamientos se aplicó el test no paramétrico de Kruskal Wallis ($\alpha=0.05$). Las tasas de desarrollo y crecimiento de las larvas se calcularon siguiendo la ecuación de Teplitsky et al. (2003) (ver figura 2). Posteriormente se realizó un análisis de varianza ANOVA para comprobar si existen diferencias entre dichas tasas de crecimiento entre los tratamientos.

$$\text{Growth rate} = \exp\left(\frac{\text{Ln}\left[\frac{\text{final weight}}{\text{initial weight}}\right]}{\text{number of days of experimentation}}\right)$$

Figura 2: Ecuación para el cálculo de tasa de crecimiento. Extraído de Teplitsky, 2003.

Se determinó la frecuencia de ocurrencia de MNs sobre un total de 1000-2000 eritrocitos contabilizados. Dado que los datos obtenidos no presentaron una distribución normal para ambas frecuencias (MNs y AN), se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ($p \leq 0.05$) para comparar las diferencias entre los grupos testeados (C, T0, T1 y T2). Para los casos en donde se encontraron diferencias significativas se realizó el test *post-hoc* de Tukey ($\alpha=0.05$). Se determinó el grado de asociación entre las variables de respuesta (frecuencia de AN y MNs) y los tratamientos mediante el coeficiente de correlación de Spearman (R_s) ($\alpha=0.05$). El ordenamiento de los datos, los análisis estadísticos y los gráficos fueron realizados con el software RStudio (2015), utilizando los paquetes agricolae, ggplot2, tidyverse, plyr y dplyr.

RESULTADOS

Los efectos letales ejercidos sobre larvas de *Boana pulchella* por la formulación en estudio, Tordón ® K24, permitieron estimar una CL5048hs de 16,5 mg/L, una LOEC de 14,5 mg/L y una NOEC de 12.5 mg/L en las 48 horas de duración que tuvo el experimento. No se encontraron diferencias significativas entre los δ de las variables morfológicas medidas y la masa de los individuos, entre los distintos tratamientos de los experimentos de concentración subletal (figura 3). La tasa de crecimiento tampoco mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0.142$, $\alpha=0.05$).

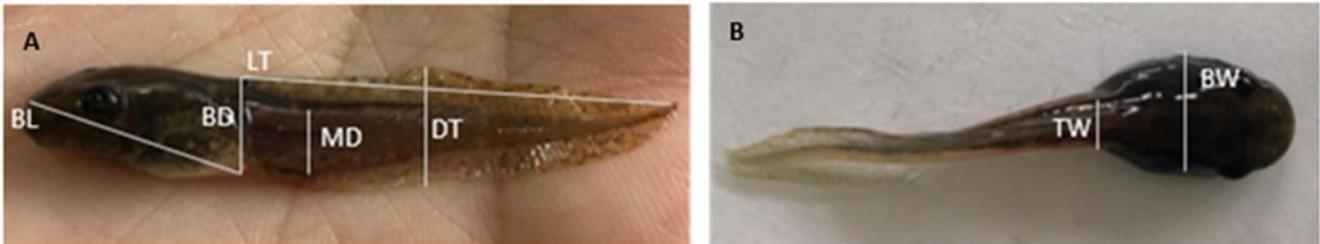


Figura 3: Vistas lateral y dorsal de larva de *B. pulchella* que muestra las siete medidas morfológicas tomadas durante los experimentos de exposición crónica. A (vista lateral): profundidad del cuerpo BD, longitud del cuerpo BL, profundidad de la cola TD, longitud de la cola TL, profundidad del músculo de la cola MD. B (vista dorsal).

Los eritrocitos maduros de las larvas de *Boana pulchella* presentan forma ovalada con un único núcleo central bien definido y visible, permitiendo el reconocimiento del citoplasma con facilidad (ver figura 4 A). Los micronúcleos (MNs) fueron observados e identificados como fragmentos nucleares esféricos separados del núcleo principal (ver figura 4 B, C y D). Algunos de los eritrocitos, presentaron alteraciones morfológicas (AN). Para la identificación y la clasificación de las AN se siguió a Carrasco et al. (1990). La mayoría de las AN observadas fueron del tipo Notched, encontrándose también núcleos lobulados, puentes y células binucleadas (ver figura 4 C, D, E, F).

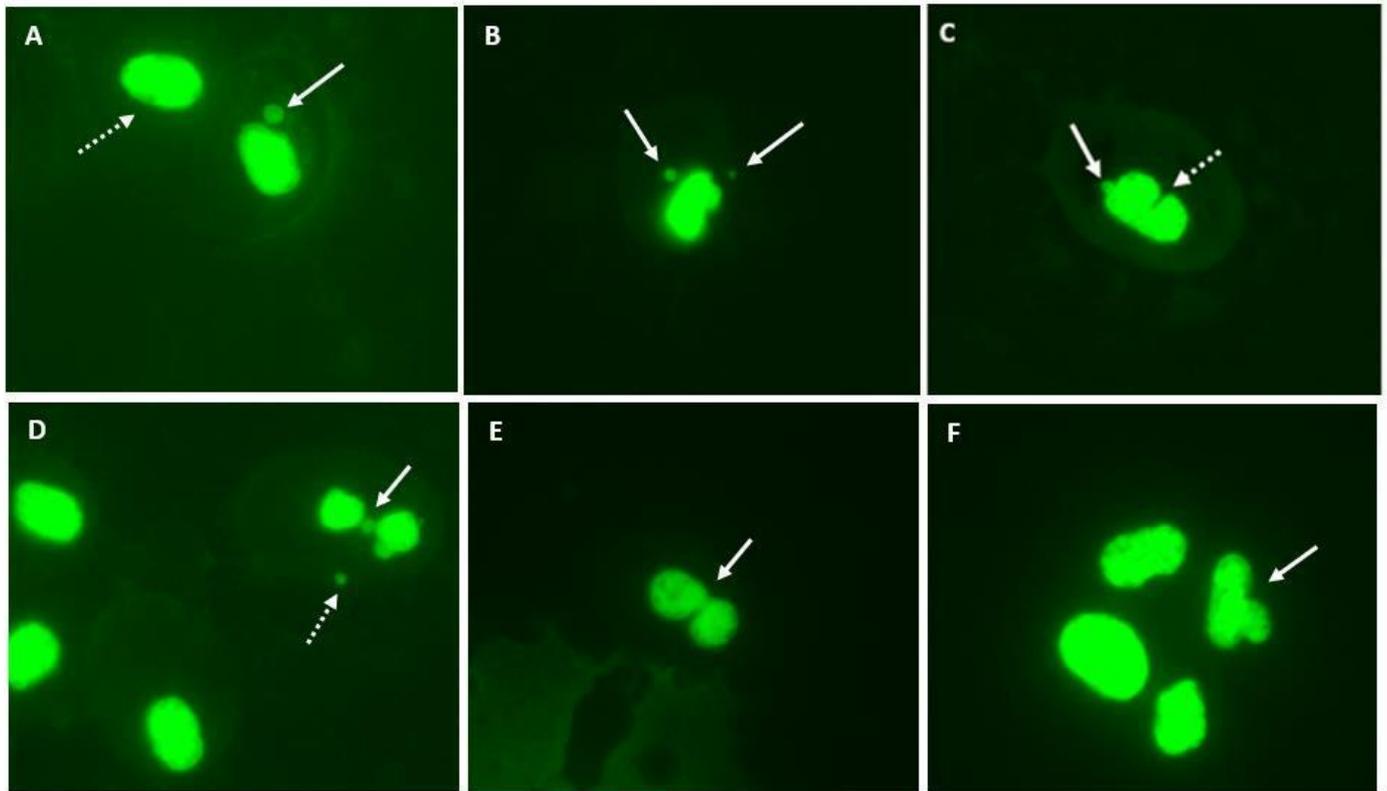


Figura 4. Células sanguíneas de larvas de *B. pulchella*. A: célula normal (flecha punteada) y presencia de micronúcleo (flecha blanca). B: Célula con dos micronúcleos (flecha blanca). C: micronúcleo (flecha blanca) y aberración nuclear: hendidura (flecha blanca punteada). D: Puente (flecha blanca) y micronúcleos (flecha punteada). E: célula binucleada (flecha blanca) F: núcleo lobulado (flecha blanca).

El formulado Tordon ® K24 no causó diferencias significativas en la frecuencia de micronúcleos. Las comparaciones revelaron valores más altos en los tratamientos con concentraciones subletales, T1 y T0 respectivamente (ver figura 5). En contraste con lo observado en MNs, las frecuencias de anomalías nucleares fueron mayores en el tratamiento que presenta la concentración aguda T2 (ver figura 6).

Cuando las AN se analizaron por separado, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0.04$, $\alpha=0.05$). Se registró la mayor diferencia entre el T2 en comparación con el control ($p=0.003$, $\alpha=0.05$). Los resultados del análisis post- hoc Tukey se muestran en la tabla 1. El grado de asociación entre las variables de respuesta y los tratamientos resultó positiva y significativa para AN ($R_s=0.69$), no encontrándose significancia estadística para MNs ($R_s=0.31$).

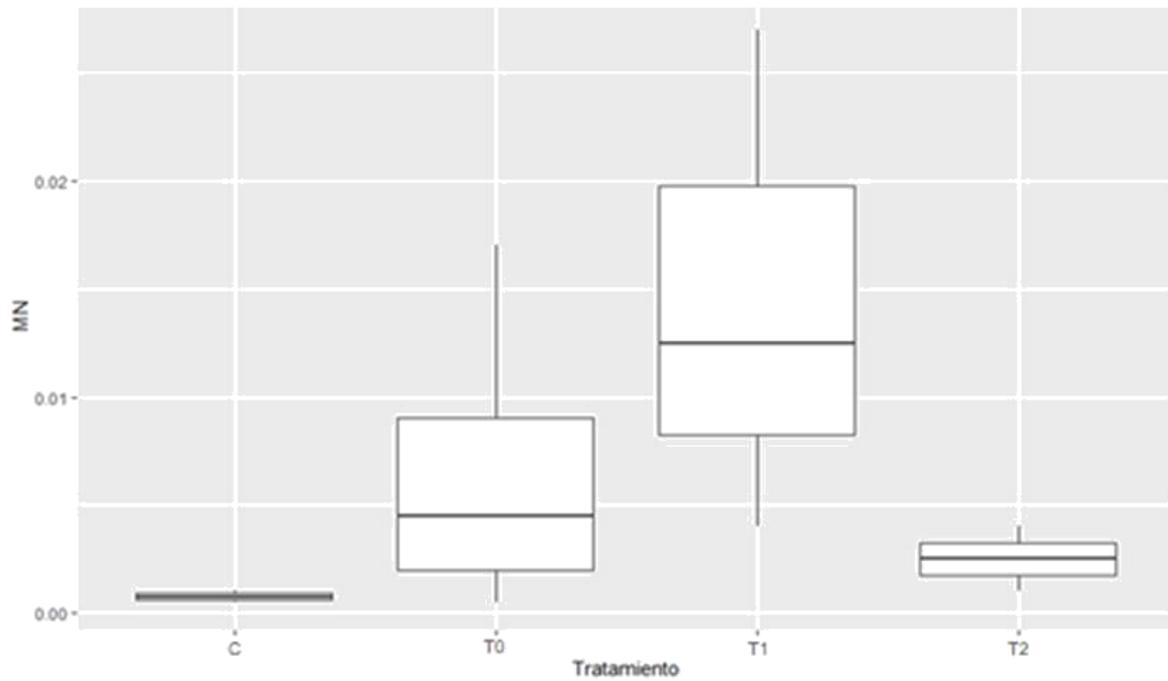


Figura 5. Gráfico de distribución de frecuencia de micronúcleos (MNs) en cada tratamiento (medianas y cuartiles).

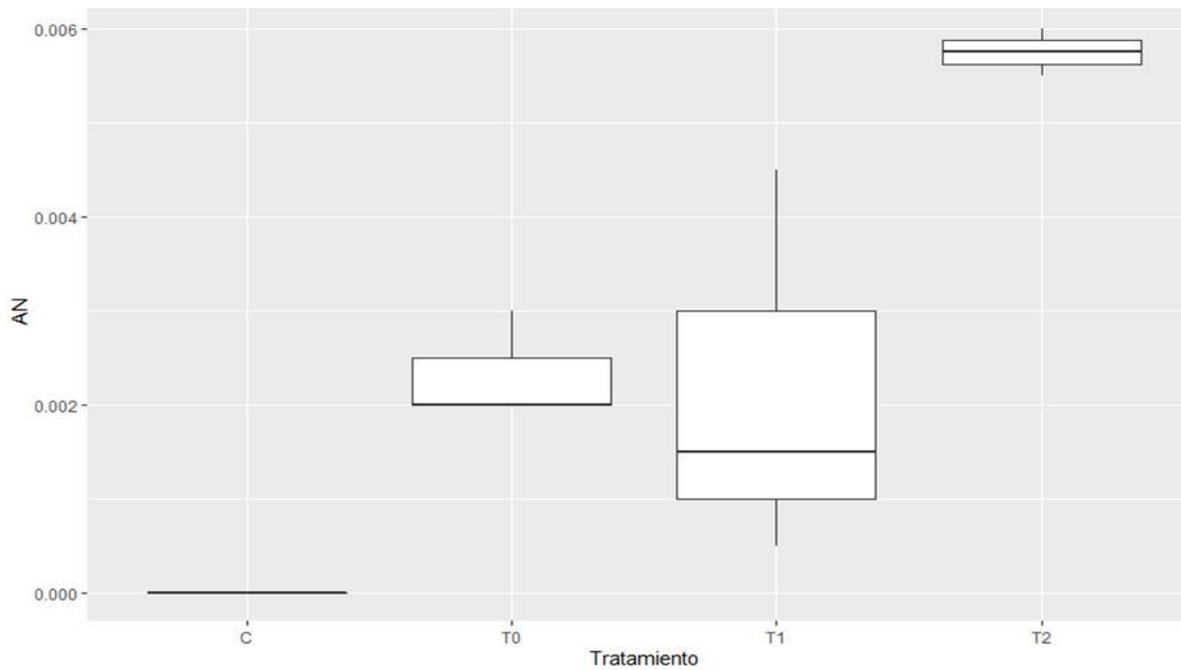


Figura 6. Gráfico de distribución de frecuencia de aberraciones nucleares (AN) en cada tratamiento (medianas y cuartiles).

Tabla 1. Resultados de las comparaciones de frecuencia entre los tratamientos-Tukey.

Tratamientos	Valor p-adj
T0-C	0.132
T1-C	0.211
T2-C	0.003
T1-T0	0.998
T2-T0	0.023
T2-T1	0.029

DISCUSIÓN

El valor calculado (18.5 mg/L) del estimador de toxicidad aguda CL50 brindó información acerca de la toxicidad de la formulación Tordon® K24 en larvas de *Boana pulchella*, permitiendo la posterior comparación de la sensibilidad diferencial en los ensayos realizados concentraciones subletales (USEPA, 1975; ASTM, 1989; Díaz-Baez et al., 2004). Por lo tanto, estos experimentos a corto plazo aportan valores de concentración umbral (CL50, NOEC, LOEC) y antecedentes del compuesto en estudio que son de utilidad para el diseño de futuras investigaciones (Klassen, 2008). Es importante resaltar que nuestro resultado de concentración letal media (16.5 mg/L) difiere con el único trabajo reportado en la región para la misma fórmula comercial de Picloram en larvas de *Rhinella arenarum*, donde la CL_{5048hrs} fue de 0.025 mg/L (Lajmanovich, 2013). Posiblemente, al tratarse de dos especies provenientes de Familias diferentes de anuros (Hylidae y Bufonidae) presentan distintos rangos de sensibilidad. Otra referencia bibliográfica acerca de la toxicidad de Picloram en renacuajos de anuros australianos, sugiere toxicidad moderada para larvas de *Adelotus brevis* (123.0 mg/L) y *Limnodynastes peroni* (116.0 mg/L) (Johnson, 1976). Estos valores difieren de los encontrados para *B. pulchella* (18.5 mg/L), probablemente porque se evaluaron distintas fórmulas comerciales. Explicitar cual es la formulación empleada, es muy importante a la hora de brindar información de la toxicidad de distintos compuestos, ya que se han reportado diferencias entre distintas fórmulas comerciales de un mismo principio activo (Könen & Cavas, 2008; Lajmanovich, 2013). Considerando los antecedentes, podríamos plantear, según nuestros resultados, que el herbicida Tordon® 24-K es muy tóxico para larvas de *Boana pulchella*, pero mucho menos tóxico respecto a lo observado en larvas de *Rhinella arenarum*. En cuanto a los resultados obtenidos luego de realizadas las pruebas por exposición crónica, podemos decir que, no se encontró variabilidad con significancia estadística de las variables medidas, lo cual podría explicarse por el tamaño reducido de la muestra. Si bien a priori se podría adjudicar una ausencia de sensibilidad de las larvas de la especie en estudio, se sabe que, el factor densidad ejerce una presión importante sobre el tamaño corporal alcanzado por

los renacuajos, el cual refleja la plasticidad que presentan los mismos (Maneyro y Francescoli, 2019). Asimismo, Carabio (2017) reportó plasticidad fenotípica en larvas de *B. pulchella* al encontrar en muestreos de campo, aparentes diferencias morfológicas sobre la altura del músculo de la aleta caudal y la forma del cuerpo. En este trabajo se plantea que estas diferencias posiblemente sean consecuencia del uso de fitosanitarios tales como AMPA (ácido aminometilfosfónico) y Glifosato. Por otra parte, se han reportado trabajos en *Rhinella arenarum* donde se registran diferencias de tamaño, retrasos en el tiempo de desarrollo, menores tallas alcanzadas una vez completada la metamorfosis, así como también diferencias comportamentales (Svartz, 2014). Asimismo, también se ha determinado el potencial tóxico del herbicida en estudio en larvas de *Rhinella arenarum*, reportando daño a distintos niveles (Lajmanovich, 2013). Los recientes trabajos mencionados utilizaron un tamaño de muestra mayor respecto al empleado en el nuestro, por lo que, posiblemente esta sea una explicación de los resultados obtenidos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la observación de micronúcleos, si bien no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de ocurrencia de MNs entre los tratamientos ($p=0.17$, $\alpha=0.05$), se puede observar una tendencia similar en la distribución de los datos en el tratamiento más concentrado (T2) respecto al control (C). Tanto en el control como en dicho tratamiento no se registra prácticamente efecto de presencia de micronúcleos. El hecho de que no se observen diferencias significativas entre los tratamientos puede deberse al tamaño muestral, ya que se utilizaron muestras pequeñas y con poca cantidad de réplicas. De todas maneras, esta tendencia concuerda con publicaciones previas que indican que las larvas de anfibios resultan ser organismos susceptibles a daños genéticos causados por bajas concentraciones de distintos tipos de contaminantes xenobióticos durante cortos tiempos de exposición (Ralph et al., 1996; Clements et al., 1997). Asimismo, este resultado se alinea con lo reportado por Natale et al. (2018) en donde se expusieron larvas de *B. pulchella* al insecticida Pirimicarb (fórmula comercial: Aficida®) y el análisis demostró que la frecuencia de MNs disminuyó como función dependiente de la concentración. Por otra parte, sucede lo opuesto cuando se analizan las aberraciones nucleares (AN). El tratamiento más concentrado (T2) fue el que presentó mayor frecuencia de aberraciones respecto al resto de los tratamientos evaluados, registrándose la mayor diferencia entre T2 y C. Esto podría deberse a que las mayores concentraciones del formulado Tordón K24® estarían causando un efecto tóxico y/o inhibitorio que impactaría en la división mitótica provocando un retraso del ciclo celular y la consecuente alteración en la tasa de renovación de los eritrocitos circulantes, y de esta manera, no podría ser visualizado el daño inducido en el ADN por el herbicida (Cavaş Ergene-Gözükara, 2003a; Rodriguez-Cea et al., 2003). Por otra parte, no todas las células dañadas alcanzan a completar un ciclo de división debido a que pueden entrar en un proceso

de apoptosis y serían eliminadas rápidamente del organismo (Fenech, 2007). Por lo tanto, la formación de alteraciones nucleares, podría estar reflejando dicho proceso mediante el efecto de citogenotoxicidad (Seriani et al., 2012). Cabe resaltar que la mayor frecuencia de anormalidades, representa un mecanismo de vigilancia para eliminar células con daño genético (Cavaş & Ergene-Gözükara, 2003b). Los diferentes tipos de AN, son muy importantes, ya que brindan información acerca del estado celular. A modo de ejemplo, se ha reportado que la existencia de células binucleadas o sin núcleo presente, se ve incrementada bajo situaciones de estrés tales como, alteraciones de la dieta, patología, daño metabólico, etc. (Fijan, 2002). Los núcleos picnóticos (con cromatina altamente condensada) están asociados con daño en el ADN y apoptosis (Saqib et al., 2012). Del mismo modo, nuestros resultados evidencian el daño a nivel genético provocado por el herbicida Picloram. Otra consideración a tener en cuenta es que la variabilidad en la frecuencia de AN y MNs puede estar relacionada con la capacidad metabólica y los mecanismos de reparación del ADN, así como con la proliferación celular (Rodríguez-Cea et al., 2003). En este sentido la tasa de reemplazo de células muertas o dañadas para mantener condiciones fisiológicas normales o inhibición de la división nuclear de expresión en el órgano diana afectan la expresión de MNs (Bolognesi & Hayashi, 2011).

De acuerdo a estudios preliminares, las aberraciones nucleares pueden considerarse manifestaciones de los efectos causados por xenobióticos (Gravato & Santos, 2002; Kirschbaum et al., 2009). Es así, que tanto las alteraciones en la morfología nuclear y la formación de micronúcleos en los eritrocitos se consideran un parámetro útil para evaluar los efectos genotóxicos de los contaminantes ambientales y deben de ser tomadas en cuenta en el test de MNT (Gravato & Santos, 2002; Kirschbaum et al., 2009). Cabe destacar, que, al analizar las frecuencias de cada una de las variables indicadoras del daño, estas no presentan el mismo grado de correlación de dosis-respuesta; sin embargo, conforme a las predicciones esperadas, la formación de MNs y AN observada evidencian la inducción de daño genotóxico del herbicida.

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo resulta una primera aproximación en la evaluación de la toxicidad del herbicida Picloram en Uruguay. Si bien no se encontraron diferencias significativas a nivel macroscópico, en la tasa de crecimiento, ni en la talla alcanzada al final de los experimentos por exposición crónica, se logró determinar con éxito el valor de la concentración letal media (CL50). La falta de significancia estadística en algunos de los resultados obtenidos pueden ser producto del pequeño tamaño muestral, por lo cual sería conveniente mejorar este aspecto

en futuros trabajos, con el fin de obtener una mayor robustez estadística. También, sería recomendable, evaluar otros aspectos tales como, alteraciones en el comportamiento y tiempo de metamorfosis, así como realizar un análisis morfológico a nivel microscópico de las larvas utilizando herramientas como la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Estos serían abordajes complementarios y de relevancia, puesto que ya se han reportado estudios que indican la peligrosidad de distintos agroquímicos a los niveles antes mencionados. En futuros trabajos sería interesante comprender si los efectos observados en la especie estudiada son consistentes con los observables en otras especies de anfibios con potencial bioindicador, así como el efecto causado por otros agroquímicos de uso frecuente.

Por otra parte, nuestros resultados indican que el herbicida Picloram provoca efectos genotóxicos en las larvas de *B. pulchella*, reportándose mayor frecuencia de ocurrencia de aberraciones nucleares por exposición a concentraciones agudas, mientras que a concentraciones subletales se registran mayores frecuencias de micronúcleos, mostrando coherencia con los antecedentes bibliográficos. En este sentido, los valores umbrales (CL50 y NOEC) de concentración del agroquímico resultan de gran relevancia a la hora de poder predecir y evaluar la dosis/respuesta genotóxica. Los resultados de la presente tesina, reafirman que el test de MNT es una buena herramienta para la evaluación de genotoxicidad provocada por exposición a agentes tóxicos y que estos datos pueden ser muy útiles para la elaboración de planes de acción que favorezcan la conservación de especies y ensambles de anuros, así como también reafirman el uso de estos animales como bioindicadores para el biomonitoreo. Al mismo tiempo se podría abordar el mismo tipo de estudio en otras especies que permitan predecir el efecto especie-respuesta puesto que se han reportado diferencias interespecíficas de sensibilidad genotóxica (Bolognesi & Hayashi, 2011). Sería oportuno aplicar otro tipo de ensayo como lo es el ensayo Cometa o también conocido como electroforesis alcalina de células individuales, que brinda información complementaria, ya que permite detectar con alta sensibilidad una gran variedad de daños del ADN (Rodríguez-Rey et al., 2016). Por último, resultaría enriquecedor hacer un abordaje aplicando técnicas de mesocosmos y/o limnocorales que permiten la evaluación de los efectos provocados por agroquímicos en la naturaleza. Los ensayos de mesocosmos permiten determinar el grado de persistencia de los agroquímicos en el suelo y su incidencia sobre las larvas de anuros. Por su parte la aplicación de limnocorales en campo permite un estudio a escala especie-individuo *in situ*. Ambos enfoques complementarían los resultados observados en condiciones *in vitro* como las realizadas en la presente tesina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Sabti, K. & Metcalfe, C. D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 343(2-3), 121–135.
- Ali FK., El-Shehawi A. & Seehy, M. 2008. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. *African journal of biotechnology*, 7: 606-612.
- Ankley G.T., Degitz S.J., Diamond S.A. & Tietge J.E. 2004. Assessment of environmental stressors potentially responsible for malformations in North American anuran amphibians. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 58: 7-16.
- ASTM, 1989. Standard Definitions of Terms Relating to Sensory Evaluation of Materials and Products. In: *Annual Book of ASTM Standards*, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 19-22
- Díaz-Baez C., Bustos M., Espinosa A. 2004. Pruebas de Toxicidad Acuática: Fundamentos y Métodos. *Ingeniería e Investigación*, vol.29, 142-142.
- Barbour M.T., Gerritsen J., Snyder B.D. & Stribling J.B. 1999. Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, benthic Macroinvertebrates and Fish. EPA. Environmental Protection Agency: Office of Water: Washington, D. C.
- Barni S., Boncompagni E., Grosso A., Bertone V., Freitas I., Fasola M. & Fenoglio C. 2007. Evaluation of *Rana ssk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology*, 81: 45-54.
- Bolognesi C. & Hayashi M. 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26: 205-213.
- Britt C., Mole A., Kirharn F. & Terry A. 2003. The herbicide handbook: guidance on the use of herbicides on nature conservation sites. Peterborough: English Nature/FACT.
- Cabagna M., Lajmanovich R., Peltzer P.M., Attademo A.M. & Ale E. 2006. Induction of Micronucleus in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide Cypermethrin. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 88: 729-737.
- Campbell, T.W., 2015. Exotic animal hematology and cytology, Fourth ed. John Wiley & Sons, Iowa, USA.
- Cantou G., Roel A., Charlemagne M. & González-Sapienza G. 2010. Disipación de los herbicidas clomazone y quinclorac en arroz bajo dos tratamientos de riego. En: *ARROZ Resultados Experimentales 2009-2010*. Capítulo 6: Valorización Sistema de Producción Arrocero. INIA. Actividades de Difusión 611.
- Carabio, M., 2017. Mapa predictivo de fuentes de contaminación difusa de fitosanitarios y caracterización del impacto sobre las comunidades de anfibios, en una microcuenca del río Santa Lucía. Tesis de maestría, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.
- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S., 1990. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2123–2136.
- Cavaş T. & Ergene-Gözükara S. 2003a, Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutation Research*, 534: 93-99.

- Cavaş T. & Ergene-Gözükara S. 2003b. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research*, 538: 81-91.
- Chai L., Dong S., Zhao H., Deng H. & Wang H. 2016. Effects of fluoride on development and growth of *Rana chensinensis* embryos and larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126: 129-137.
- Clements C., Ralph S. & Petras M., 1997. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29: 277-288.
- Colombo J.C., Cappelletti N., Williamson M., Migoya C.E., Speranza J., Sericano D.C. & Muir G. 2011. Risk ranking of multiple-POPs in detritivorous fish from the Río de la Plata. *Chemosphere*, 83: 882-889.
- Corteva agriscience. 2019. Tordon® 24K Herbicida. Disponible en: <https://www.corteva.com.ar/productos-y-soluciones/proteccion-de-cultivos/tordon-24k.html> Último acceso: 9 de julio del 2019.
- Da Rosa I., Canavero A., Maneyro R., & Camargo A. 2011. Trophic Niche Variation and Individual Specialization in *Hypsiboas pulchellus* (Duméril and Bibron, 1841) (Anura, Hylidae) from Uruguay. *South Am J Herpetol*, 6: 98-106.
- Du Four A., Van Larebeke N. & Janssen C. 2004. Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples in Flanders, Belgium. *Mutation Research*. 558: 155-167.
- Duellman W.E. & Trueb L. 1994. *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Dursinska M. & Collins A.R. 2008. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interaction. *Mutagenesis*, 3: 191-205.
- Eguren G., García C., Rivas-Rivera N., Bandeira S., Vidal N., Moura M., Teixeira de Mello F. & Böcking B. 2008. Gestión ambiental de cuencas de uso agropecuario. *Revista Arroz*, 55: 10-20.
- Fenech M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81-95.
- Fenech M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2: 1084-1104.
- Fijan N., 2002. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish, *Journal of Fish Biology*, 60 999–1014.
- García-Muñoz E., Guerrero F., Gilbert J.D. & Parra G. 2010. Paradoja del enriquecimiento agrícola. *Ini. Inv.*, 5: 1-7.
- González R., Romay C., & Díaz S., 2004. Estudios sobre genotoxicidad del ozono. *Revista Cubana Investigación Biomédica* 23: 177-8.
- Gosner K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetology*, 16: 183-190.
- Gravato, C., & Santos, M. 2002. Juvenile Sea Bass Liver P450, EROD Induction, and Erythrocytic Genotoxic Responses to PAH and PAH-like Compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51: 115–127.

- Gutiérrez, J.M., S. Villar & A. Acuña. 2014. Micronucleus test in fishes as indicators of environmental quality in subestuaries of the Río de la Plata (Uruguay). *Marine Pollution Bulletin*, 91: 518-523.
- Hayashi M. 2016. The micronucleus test- most widely used in vivo genotoxicity test- Review. *Genes and Environment*, 1: 38-18.
- Hopkins W.A. 2007. Amphibians as Models for Studying Environmental Change. *ILAR Journal*, 48: 270-277.
- Ismail M., Khan Q., Ali R., Ali T. & Mobeen A. 2014. Evaluation of the genotoxicity of chlorpyrifos in common indus valley toad, *Bufo stomaticus* using alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Agricultural Sciences*, 5: 376-382.
- Izaguirre M.F., Marín L., Vergara M.N., Lajmanovich R.C., Peltzer P. & Casco V.H. 2006. Desarrollo de modelos experimentales para el estudio de los efectos de los piretroides sobre Vertebrados (Amphibia – Anura). *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 32: 181-206.
- Johnson, C. R., 1976. Herbicide toxicities in some Australian anurans and the effect of subacute dosages on temperatura tolerance. *Zoology Journal of the Linnean Society*, 59: 79-83.
- Kirschbaum A.A., Seriani R., Ranzani-Paiva M.J.T., Abessa D.M.S. & Pereira C.D.S. 2009, Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. *Gen. Mol. Biol.*, 32: 151-154.
- Klassen, C.D., 2008. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. McGraw-Hill, pp.1280.
- Könen, S., & Cavas, T., 2008. Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test, *Environmental and molecular Mutagenesis*. 49: 434-438.
- Krauter P.W., 1993. Micronucleus incidence and hematological effects in bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*) exposed to 2-acetylaminofluorene and 2-aminofluorene. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24: 487-493.
- Kruk C., Suárez C., Ríos M., Zaldúa N. & Martino D. 2013. Ficha: Análisis Calidad de Agua en Uruguay. Disponible en: <http://vidasilvestre.org.uy/wp-content/uploads/2013/09/informeaguafinalcm1.pdf>.
- 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*, 3: 184-198.
- Lajmanovich R.C., Junges C.M., Attademo A.M., Peltzer P.M., Cabagna-Zenklusen M.C. & Basso A. 2013. Individual and mixture toxicity of commercial formulations containing Glyphosate, Metsulfuron-Methyl, Bispyribac-Sodium, and Picloram on *Rhinella arenarum* tadpoles. *Water Air Soil Pollution*, 224: 1404.
- Lajmanovich R.C., Cabagna M., Peltzer P.M., Stringhini G.A. & Attademo A.M. 2005. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research*, 587: 67-72.
- Lajmanovich R.C., Cabagna-Zenklusen M.C., Attademo A.M., Junges C.M., Peltzer P.M., Bassó A. & Lorenzatti E., 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutation Research*, 769: 7-12.

- Leites Cartagena V. 2009. Estudios de fauna íctica en salto grande. Comisión Técnica Mixta de Salto Grande. Jornadas de actualización, Comisión Administradora del Río Uruguay (CARU). s/d.
- Maneyro R. & Carreira S. 2012. Guía de anfibios del Uruguay. Segunda edición, Colección Ciencia amiga-Ediciones de la Fuga. Montevideo.
- Maneyro R. & Da Rosa I. 2004. Temporal and spatial changes in the diet of *Hyla pulchella* (Anura, Hylidae) in southern Uruguay. *Phyllomedusa*, 3: 101-113.
- Maneyro R. & Francescoli G. 2019. Experimental response to density levels in the development of tadpoles and froglets of *Boana pulchella* (Anura: Hylidae). *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*. *En prensa*.
- Nardo D., Evia G., Castiglioni E., Egaña E., Galiotta G., Laporta M. & Núñez Chichet M.E. 2015. Determinación de glifosato mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) en el paisaje protegido Laguna de Rocha y su entorno, Uruguay. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (INNOTEC)*, 10: 64-70.
- Natale G.S., Basso N.G. & Ronco A.E. 2000. Effect of Cr (VI) on early life stages of three species of hylid frogs (Amphibia, Anura) South America *Environmental Toxicology*, 15: 509-512.
- Natale G.S., Vera-Candioti J., Ruiz, de Arcaute C., Soloneski S., Larramendy M.L. & Ronco A.E. 2018. Lethal and sublethal effects of the pirimicarb-based formulation Aficida® on *Boana pulchella* (Duméril and Bibron, 1841) tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 471-479.
- Newman M.C., 2014. *Fundamentals of ecotoxicology: the science of pollution*. CRC press, Boca Ratón, Florida.
- OECD. 2019. The Observatory of Economic Complexity. Uruguay. Visitado en Diciembre de 2019.
- Paganelli A., Gnazzo V., Acosta H., López S.L. & Carrasco A.E. 2010. Glyphosate based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical Research in Toxicology*, 23: 1586-1595.
- PAN Pesticide Database. 2019. Picloram, potassium salt. Disponible en: http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PRI4995. © 2000-2019. Pesticide Action Network, North America. Visitado en junio del 2019.
- Peltzer P.M., Lajmanovich R.C., Sanche, L.C., Attademo A.M., Junges C.M., Bionda C.L., Martino A.L. & Bassó A. 2011. Morphological abnormalities in amphibian populations from the mid-eastern region of Argentina. *Herpetological Conservation and Biology*, 6: 432-442.
- Pérez M., Rojo C. & Encinas M.T. 2009. Modelos animales en anfibios. *Revista complutense de ciencias veterinarias* vol. 3., N°2, 315-323.
- Pigliucci M., Murren, C.J. & Schlichting, C.D. 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J. Exp. Biol.*, 209:2362-2367.
- Pollo F., Bionda C., Otero M., Grenat P., Babini S., Flores P., Grisolia M., Salas N. & Martino A. 2019. Morphological abnormalities in natural populations of the common South American toad *Rhinella arenarum* inhabiting fluoride-rich environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 177:32-3.

- Ralph S., Petras M., Pandrangi R. & Vrzac M. 1996. Alkaline single-cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 28: 112-120.
- Relyea R.A. & Werner E.E. 2000. Morphological plasticity of four larval anurans distributed along an environmental gradient. *Copeia*, 178-190.
- Ríos M., Zaldúa N. & Cupeiro S. 2010. Evaluación participativa de plaguicidas en el sitio RAMSAR, Esteros de Farrapos e islas del Río Uruguay [En línea]. En: *Vida Silvestre*. [Consulta: Julio 2019]. Disponible en: http://vidasilvestre.org.uy/wpcontent/uploads/2010/10/libro_resultados_sc.pdf.
- Rodriguez-Cea A., Ayllon F. & Garcia-Vazquez E. 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 442-448.
- Rodríguez-Rey A., Noris-García E. & Fundora Torres M.T. 2016. Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35:184-194.
- RStudio Team, 2015. Versión 3.5.1, Integrated Development for R. RStudio, Inc.
- Saqib Q., Attia S.M., Siddiqui M.A., Aboul-Soud M.A., Al-Khedhairy A.A., Giesy J.P. & Musarrat J. 2012. Phorate-induced oxidative stress, DNA damage and transcriptional activation of p53 and caspase genes in male Wistar rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 259: 54–65.
- Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*, 31: 9-15.
- Seriani R., Abessa D.M.S., Kirschbaum A.A., Pereira C.D.S., Ranzani-Paiva M.J.T., Assunção A., Silveira F.L., Romano P. & Mucci J.L.N. 2012. Water toxicity and cyto-genotoxicity biomarkers in the fish *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, vol. 7, n°2, 67-72.
- Stahl, Jr., R.G. 1997. Can mammalian and non-mammalian sentinel species data be used to evaluate the human health implications of environmental contaminants? *Hum Ecol. Risk Assess* 3, 329-335.
- 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, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Teplitsky C., Plénet S. & Joly P. 2003. Tadpoles responses to risk of fish introduction. *Oecologia*, 134: 270–277.
- USEPA. 1975. Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians, in: Agency, U.E.P. (Ed.), USEPA 660/375-009,62 Wells K.D. 2007. The ecology and behavior of Amphibians. The University of Chicago Press.
- USEPA. 1989. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Second edition. Weber, C.I., W.H. Peltier, T.J. Norberg-King, W.B. Horning, II, F.A. Kessler, J.R. Menkedick, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, D.J. Klemm, Q.H. Pickering, E.L. Robinson, J.M. Lazorchak, L.J. Wymer, and R.W. Freyberg (eds.). Second Edition. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH 45268. EPA/600/4-89/001.

- Yin X.H., Li S.N., Zhang L., Zhu G.N. & Zhuang H.S. 2008. Evaluation of DNA damage in Chinese toad (*Bufo gargarizans*) after in vivo exposure to sublethal concentrations of four herbicides using the comet assay. *Ecotoxicology*, 17: 280-286.
- Yin X.H., Zhu G.N., Li X.B. & Liu S.Y. 2009. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by comet assay and micronucleus test. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 680: 2-6.
- Young B., Stuart S., Chanson J., Cox N. & Boucher T. 2004. Joyas que están desapareciendo: el estado de los anfibios en el nuevo mundo. Nature Serve Arlington, Virginia.
- Zalacain M., Sierrasesúmaga L. & Patiño A. 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28: 227-236.
- Zuluaga M., Valencia A. & Ortiz I. 2009. Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. *Revista Medicina UPB*. 28: 33-41.