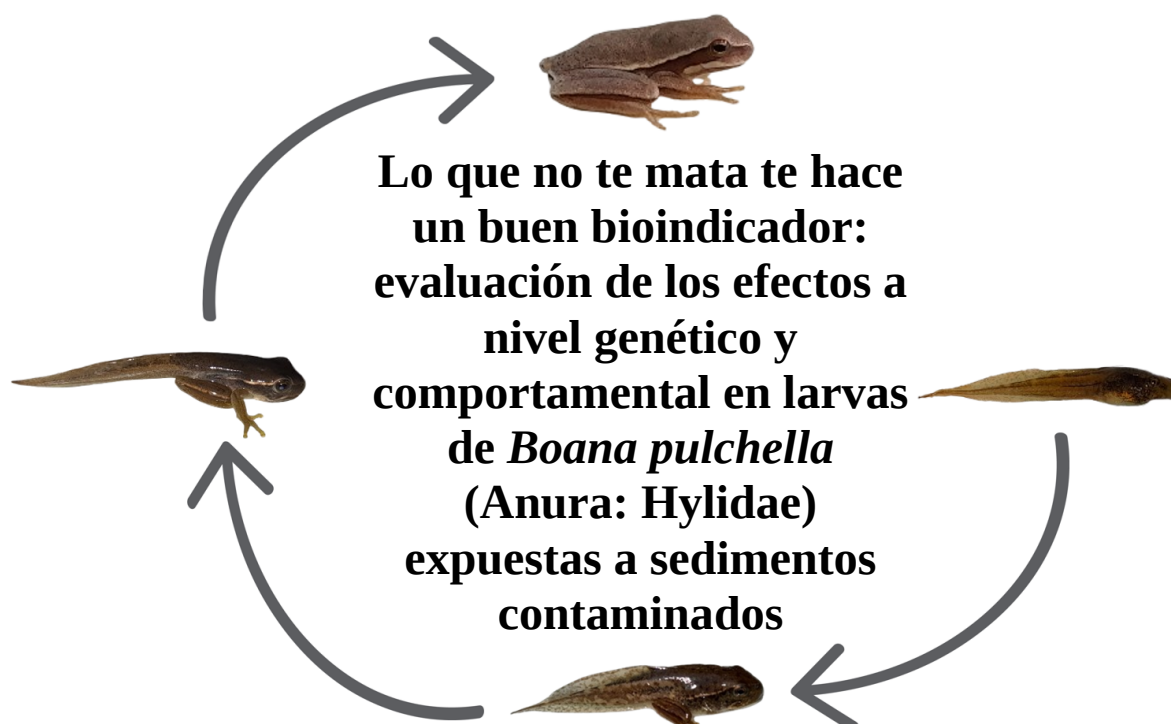


Proyecto Final de Carrera

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Profundización en Zoología de Vertebrados



Bach. Paula Ferrari Alvarez

Tutora: Dra. Gisela Pereira

Co-tutor: Dr. Raúl Maneyro

Tribunal: Dra. María Laura Lavaggi, Mag. Noelia Rivas y Dra. Gisela Pereira.

Laboratorio de Herpetología

Facultad de Ciencias – Universidad de la República

2024

Índice

Agradecimientos	iii
Resumen	iv
1 - Introducción.....	5
1.1. Fruticultura de hoja caduca en Uruguay y uso de agroquímicos	5
1.2. Ecotoxicología en anfibios	6
1.3. Los mesocosmos como abordaje experimental	7
1.4. El uso de biomarcadores.....	8
1.4.1. Biomarcadores de daño genético.....	9
1.4.2. Biomarcadores comportamentales	10
1.5. El organismo de prueba: <i>Boana pulchella</i>	10
2 - Hipótesis y predicciones	13
3 - Objetivos	14
3.1. Objetivo general	14
3.2. Objetivos específicos	14
4 - Materiales y métodos	15
4.1. Sitio de estudio.....	15
4.2. Muestreo de sedimentos.....	16
4.3. Colecta y mantenimiento de larvas.....	17
4.4. Experimentos de mesocosmos	17
4.5. Parámetros en células sanguíneas.....	18
4.6. Biomarcadores etológicos	19
4.7. Análisis de datos	21
4.7.1. Parámetros fisicoquímicos del agua	21
4.7.2. Parámetros en células sanguíneas.....	21
4.7.3. Actividad natatoria	22
4.7.4. Velocidad de nado	22
5 - Resultados	23
5.1. Parámetros fisicoquímicos del agua y pesticidas en sedimentos	23
5.2. Parámetros en células sanguíneas.....	26
5.3. Actividad natatoria y velocidad de nado	32
6 - Discusión	34
6.1. Parámetros de las células sanguíneas (MN y ANE)	35
6.2. Alteraciones en el comportamiento.....	36
7 - Conclusiones y perspectivas	38
Referencias bibliográficas.....	41

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas e instituciones que contribuyeron e hicieron posible la realización de este trabajo.

Gracias a mi tutora Gisela Pereira y a mi co-tutor Raúl Maneyro por acompañarme y guiarme con gran paciencia y dedicación en este proceso.

Al tribunal, conformado por María Laura Lavaggi y Noelia Rivas, por aceptar serlo y por sus aportes que enriquecieron enormemente este trabajo.

Agradezco al Fondo Clemente Estable de la ANII por financiar el proyecto “Anfibios como bioindicadores de calidad ambiental en agroecosistemas frutícolas del Uruguay”, dentro del cual se enmarca esta tesina de grado.

A mis compañeros del Laboratorio de Herpetología y del Laboratorio de Recursos Naturales, con quienes compartí el día a día y me apoyaron y acompañaron durante todo el proceso.

Gracias a Juan Martín Vigouroux por toda la ayuda brindada durante los experimentos y por hacer esta experiencia muchísimo más divertida.

A Gisela, Belén, Raúl y Juan Martín por acompañarme y ayudarme en la salida de campo, y a los funcionarios del Parque Lecoq no solo por su ayuda sino también por abrirnos las puertas. Asimismo, gracias a los productores por permitirnos trabajar en sus propiedades.

A Belén por su ayuda y aliento.

A Diego Lercari por proporcionar el espacio para la realización de los experimentos.

Al Laboratorio del Recursos Naturales por facilitar el equipo para medir los parámetros fisicoquímicos, y especialmente a Larisa Magnone y Ramiro de los Santos por toda su ayuda.

A Noelia Rivas por poner a disposición su laboratorio y por su ayuda en los análisis de nutrientes.

A Eco por ayudarme con mi peor pesadilla durante la realización de esta tesis (la estadística), y por su eterna paciencia.

A mamá, porque nuestra cábala de mirar a Máximo Décimo Meridio fue indiscutiblemente la razón por la que aprobé cada examen.

Muchísimas gracias a los amigos que hice en este camino y a quienes orgullosamente he visto crecer durante estos años. Su acompañamiento y apoyo fue indispensable para alcanzar esta etapa, llenaron mis días de cariño. Los quiero mucho.

A Sofi y a su familia, por abrirme la puerta de su casa y sus vidas. Gracias por todo el amor.

A mis hermanas, Vale y Nené, por ser mis mejores amigas y mis compañeras de vida. Y a Toto, Choco, Frida, Cañita, Kira y Oreo, por el amor incondicional.

A mamá y papá, para quienes simplemente no me alcanzan las palabras. Los amo.

Resumen

La fruticultura de hoja caduca (FHC) es una actividad productiva que se caracteriza por presentar un uso intensivo de pesticidas, principalmente, para el control de enfermedades y plagas. Estos compuestos químicos pueden acumularse en los sedimentos de los cuerpos de agua, a donde pueden llegar por escorrentía, constituyendo una potencial fuente de contaminación para los ecosistemas. Los anfibios presentan características biológicas y fisiológicas que los vuelven particularmente sensibles a este tipo de perturbación ambiental, por lo que son ampliamente utilizados en estudios de ecotoxicología. En este estudio, se evaluó la toxicidad de sedimentos provenientes de un sitio bajo FHC sobre larvas de *Boana pulchella* (Anura: Hylidae). Se seleccionaron tres sitios de muestreo a lo largo de la Cañada del Dragón (Melilla, Montevideo), un cuerpo de agua que atraviesa zonas de actividad frutícola; y un charco en el Parque Lecocq como sitio control. Se extrajeron sedimentos de cada sitio, y su toxicidad se evaluó mediante la realización de experimentos de mesocosmos al aire libre; donde las larvas fueron expuestas a dichos sedimentos (n=42 por tratamiento). El efecto de los contaminantes sobre los renacuajos, se determinó a través del análisis de biomarcadores celulares (parámetros de células sanguíneas) y comportamentales (alteraciones a nivel del nado). Se detectó la presencia de los insecticidas clorantraniliprol y metoxifenozone en los sedimentos provenientes del sitio frutícola. Los renacuajos que se desarrollaron expuestos a tratamientos con sedimentos provenientes de sitios bajo FHC presentaron una mayor frecuencia de micronúcleos y otras aberraciones nucleares en los eritrocitos en comparación con los individuos del control, indicando efectos genotóxicos y citotóxicos. Adicionalmente, se registraron alteraciones en la actividad natatoria de larvas expuestas a sedimentos provenientes del sitio frutícola, evidenciando un posible efecto neurotóxico. Los resultados sustentan la hipótesis de que existen efectos adversos de los pesticidas utilizados en el manejo de FHC sobre anfibios nativos, y destacan el riesgo al que se encuentran expuestas las especies que habitan agroecosistemas. Los anfibios enfrentan graves problemas de conservación, por lo que es esencial continuar enfocando esfuerzos en comprender los efectos de los contaminantes sobre este grupo. Además, los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser utilizados como insumo para el desarrollo de planes de gestión y monitoreo en zonas frutícolas.

Palabras clave: fruticultura de hoja caduca, pesticidas, *Boana pulchella*

1 – Introducción

1.1. Fruticultura de hoja caduca en Uruguay y uso de agroquímicos

La fruticultura de hoja caduca (FHC) es una actividad productiva que comprende la producción de diversas frutas destinadas al consumo humano (MGAP, 2023). En Uruguay, la superficie ocupada por esta actividad se extiende aproximadamente 4000 ha, en su mayoría ubicadas al Sur del país, en los departamentos de Montevideo, Canelones y San José (MGAP, 2023). La mayor parte de la producción se desarrolla en predios familiares y el producto cultivado se destina principalmente al consumo interno (Linari Fuentes, 2018).

A pesar de la variedad de cultivos que incluye, no es un sector con gran diversificación debido a que el 90% de la producción está comprendida por cultivos de duraznos, peras y manzanas (Ferrer et al., 2013), con gran predominancia de este último (MGAP, 2023). La reducción de diversidad lleva a la pérdida de organismos y procesos naturales, y debido a la simplificación biológica se hace necesario incrementar el manejo artificial para el control de plagas (Altieri et al., 2014). Particularmente, la FHC se caracteriza por presentar un uso intensivo de pesticidas (Ferrer et al., 2013; Nuñez et al., 2007), cuya aplicación tiene como principales objetivos la protección de los cultivos y el control de enfermedades y plagas (García, 1998; Lema et al., 2014). A pesar de su importancia en el desarrollo de la agricultura, estos compuestos químicos constituyen una fuente de contaminación, ya que sólo una pequeña parte de lo aplicado realmente llega al organismo blanco (Núñez & Scatoni, 2013), mientras que el resto permanece circulando en el ambiente (Martino et al., 2008). Asimismo, los agroquímicos pueden ser transportados desde su lugar de aplicación hacia cuerpos de agua por procesos como la escorrentía (Lema et al., 2014), y acumularse en los sedimentos (Fojut et al., 2013), sobre todo en las capas más superficiales (Burton Jr et al., 2003).

Una vez presentes en el ambiente y dependiendo de sus características, los contaminantes pueden transferirse a los organismos. Los contaminantes liposolubles presentan un alto potencial de bioacumulación, llegando a los organismos acuáticos por exposición a sedimentos o por transferencia trófica. Mientras que los contaminantes hidrosolubles, tienen menor potencial de bioacumulación que los liposolubles, y pueden transferirse a los organismos por bioconcentración, es decir, la exposición se debe a la acumulación de contaminantes transportados por el agua (Hoffman et al., 2003). El riesgo

que estas sustancias químicas puedan representar dependerá tanto de las características de los productos y la forma en que se apliquen, así como del ambiente y la biota expuesta (Núñez & Scatoni, 2013).

En Uruguay, la presencia de agroquímicos ha sido reportada tanto en aguas como en sedimentos (Nardo et al., 2015; Soutullo et al., 2020). De esta forma, los organismos que habitan cuerpos de agua cercanos a sitios agrícolas, o que pasan allí parte de sus ciclos vitales, se encuentran continuamente expuestos a dichas sustancias (Planes & Fuchs, 2015).

1.2. Ecotoxicología en anfibios

Se define a la ecotoxicología como la disciplina científica que busca entender y predecir los efectos de los agentes contaminantes que, debido a actividades humanas, alcanzan niveles anormales en el ambiente, con la finalidad de otorgar herramientas que permitan prevenir o mitigar dichos efectos (Carriquiriborde, 2021). Esta disciplina surgió en respuesta a la creciente preocupación ante la aparición de consecuencias evidentes debido a la contaminación ambiental con sustancias químicas y la necesidad de conocer sus efectos una vez presentes en el ambiente (Newman, 2015). Aunque en Uruguay la ecotoxicología de anfibios es una línea de investigación reciente (Martinez Puppi, 2022; Pereira et al., 2024; Riero et al., 2024), en los últimos años se ha extendido el uso de anfibios como organismos de estudio en investigaciones ecotoxicológicas en la región (ej. Babini et al., 2024; Cabagna et al., 2006; Lajmanovich et al., 2011; Peltzer et al., 2019). Esto se debe a que, dadas sus características biológicas y fisiológicas, los anfibios son particularmente sensibles a la degradación ambiental (Wells, 2007), considerándose buenos bioindicadores. Se define como bioindicador a un organismo que brinda información sobre la calidad del ambiente, por ser sensible a los cambios que puedan ocurrir en el mismo (Markert et al., 1999), sean estos de origen natural o antropogénicos (Holt & Miller, 2011). Los anfibios tienen un ciclo de vida bifásico, con un estadio larval acuático y adultos generalmente terrestres (Wells, 2007), por lo que se ven expuestos a alteraciones en ambos ambientes (Croteau et al., 2008). Además, poseen una piel delgada y permeable, que facilita el ingreso de diversos compuestos a su organismo (Quaranta et al., 2009), así como altas tasas de bioacumulación (Unrine et al., 2007). Sumado a esto, los anfibios habitan cuerpos de agua inmersos en sitios agrícolas, y por esto están muy expuestos a los agroquímicos (García-Muñoz et al., 2010), que pueden llegar por

escorrentía (Lema et al., 2014). Los renacuajos suelen ser más vulnerables que los adultos, ya que al desarrollarse en el agua presentan una exposición constante a los contaminantes que allí se encuentran y estos pueden ingresar fácilmente a sus organismos a través de la piel, la boca y las branquias (Barni et al., 2007; Pollo et al., 2016). Además, son más fáciles de mantener en condiciones experimentales, y se puede disponer de una mayor cantidad de individuos en relación con los adultos (Bridges, 1997), razones por las que generalmente suelen ser más utilizadas en investigaciones toxicológicas (Benvindo-Souza et al., 2020).

Los anfibios representan el grupo zoológico con más problemas de conservación dentro de los vertebrados (Luedtke et al., 2023), con un 41% de las especies amenazadas a nivel global (IUCN, 2024). De las 49 especies descritas para Uruguay, 12 se encuentran en alguna categoría de amenaza (Carreira & Maneyro, 2015). El declive de este grupo se debe a varias causas, entre las que se incluyen la pérdida, alteración y fragmentación del hábitat, provocada principalmente por el avance de la agricultura; el cambio climático; las enfermedades; y la exposición a contaminantes (Halliday, 2008; Hopkins, 2007; Luedtke et al., 2023). Cabe destacar que debido a los diversos nichos tróficos que ocupan los anfibios, son componentes críticos en las comunidades, y si se ven afectados, esto puede repercutir negativamente a nivel del ecosistema (Hopkins, 2007). En este contexto, es que los estudios de ecotoxicología enfocados en anfibios cobran especial relevancia.

1.3. Los mesocosmos como abordaje experimental

Como se mencionó anteriormente, los agroquímicos pueden llegar a los cuerpos de agua presentes en agroecosistemas, y acumularse en los sedimentos. En particular, los organismos bentónicos, que se encuentran estrechamente vinculados al sedimento, se exponen a los contaminantes asociados a estos por diversas vías: por exposición al agua intersticial, la ingestión de materia orgánica y partículas de sedimentos, y el contacto directo entre las superficies corporales y el sedimento (Barron, 2003). Para estudiar la potencial toxicidad de sedimentos sobre larvas de anfibios, los experimentos de mesocosmos han demostrado ser un abordaje muy efectivo (Peltzer et al., 2013). Los mesocosmos son sistemas artificiales al aire libre, donde ocurren procesos representativos del entorno natural (Boone & James, 2005). Consisten en acuarios que contienen sedimentos y agua (Peltzer et al., 2013), donde se desarrollan los organismos de prueba, representando un intermedio entre un experimento de campo y de laboratorio (Semlitsch

& Boone, 2009). Los anfibios presentan características que los convierten en un grupo particularmente apropiado para este tipo de experimentos, ya que tienen un tamaño relativamente pequeño, cuentan con rangos de hogar limitados y durante la etapa larvaria suelen desarrollarse en sistemas de estanques “cerrados” (Boone & James, 2005).

El abordaje experimental a través de mesocosmos permite un mayor control sobre las variables, disminuyendo las variaciones entre réplicas, permitiendo un análisis más riguroso (Hopkins, 2007), a la par que incorpora la variación dada por parámetros ambientales que pueden influir en la persistencia y toxicidad de un contaminante, brindando un mayor realismo y poder predictivo (Boone & James, 2005). Son de utilidad para estudiar una amplia gama de aspectos, entre los que se incluyen, efectos de la exposición crónica, efectos sobre la historia de vida, así como cambios en el comportamiento y la morfología de los organismos de prueba (Gagneten & Regalado, 2021). Dado que las concentraciones ambientales de los contaminantes no suelen ser suficientes para provocar mortalidad, el análisis de efectos subletales es más relevante para evaluar toxicidad (Bridges, 1997) en estudios donde lo que se busca evaluar es la potencial toxicidad asociada a los sedimentos.

1.4. El uso de biomarcadores

Los biomarcadores son respuestas biológicas o cambios medibles que se desencadenan frente a la exposición a xenobióticos (sustancias ajenas al organismo) o estresores ambientales (Gupta, 2014). Un parámetro debe ser capaz de proporcionar una respuesta temprana y ser lo suficientemente sensible y específico para ser considerado un biomarcador (Peltzer et al., 2024). Los biomarcadores son necesarios para establecer relaciones entre la presencia de contaminantes en el medio ambiente y los efectos que estos puedan tener en los organismos, actuando como criterios de valoración subletales de la intoxicación (Venturino et al., 2003). Dichos biomarcadores pueden ser bioquímicos, celulares, histológicos, morfológicos, etológicos, entre otros (Chandana et al., 2019). Generalmente, los efectos de un contaminante se inician a nivel molecular, y se propagan a niveles superiores de organización, muchas veces como efectos indirectos, por lo que se vuelve difícil establecer una asociación clara entre los efectos observados y la presencia del contaminante (Carriquiriborde, 2021; Walker et al., 2012). De esta forma, los efectos a niveles de organización inferiores consisten en repuestas rápidas que actúan como señales de alerta temprana, evidenciando los efectos adversos

de los contaminantes sobre el organismo antes de que sean evidentes a niveles de organización superiores (Carriquiriborde, 2021; Peltzer et al., 2024). Mientras que bioindicadores en niveles superiores de organización biológica, poseen mayor relevancia a nivel ecológico, pero suelen detectarse cuando el daño es irreversible y resulta complejo establecer relaciones causa-efecto (Carriquiriborde, 2021). En tal sentido, la evaluación de los efectos de los xenobióticos sobre el organismo de prueba a diferentes escalas, desde nivel celular hasta niveles de organización superiores, permite hacer inferencias más precisas sobre la toxicidad de los contaminantes, su alcance y sus mecanismos de acción (Lajmanovich et al., 2021).

1.4.1. Biomarcadores de daño genético

Los eritrocitos de los anfibios, cuya función es la de transportar oxígeno y dióxido de carbono, poseen un núcleo y la capacidad de dividirse en la sangre, lo que permite evaluar la presencia o ausencia de alteraciones nucleares en diversas situaciones, como puede ser la exposición a agentes xenobióticos (Cabagna Zenklusen et al., 2014). En este sentido, el ensayo de micronúcleos (MN) es uno de los test más utilizados en ecotoxicología para analizar el efecto de agentes genotóxicos (de Melo e Silva et al., 2024). A través del test de MN se analiza la variación de las frecuencias de células con micronúcleos, y el aumento de dichas frecuencias es considerado un biomarcador de efecto genotóxico (Bosch et al., 2011), que deriva en la pérdida de material genético y aberraciones cromosómicas (Fenech et al., 2003). Los micronúcleos se forman en células en división (Fenech, 2000), ya sean somáticas o germinales, que se originan a partir de fragmentos de una cromátida (producido por un evento clastogénico) que no se segrega correctamente durante la anafase, o un cromosoma que se segrega erróneamente durante la cariocinesis (debido al mal funcionamiento del huso mitótico) (Udroiu, 2008). Durante la telofase, se forma una envoltura nuclear alrededor del núcleo y de los fragmentos o cromosomas rezagados (Fenech, 2000), quedando estos últimos excluidos del núcleo principal de las nuevas células, originando uno o varios núcleos de menor tamaño, de ahí el nombre “micronúcleo” (Lajmanovich et al., 2012). En comparación con otras técnicas de detección de daños en el ADN, el test de MN es más simple, rápido y menos costoso (Peltzer et al., 2024).

Existen otras anomalías o aberraciones a nivel del núcleo de los eritrocitos (ANE) que también se consideran indicadoras de daño genotóxico y citotóxico, por tanto, evaluar su presencia y frecuencia complementa el ensayo de MN en estudios de genotoxicidad

(de Melo e Silva et al., 2024). Incluso, las ANE podrían estar indicando un espectro más amplio de daño en el ADN en comparación a la formación de MN (Gómez-Meda et al., 2006; Pollo et al., 2016).

1.4.2. Biomarcadores comportamentales

El comportamiento de los anfibios es una respuesta integrada a la información proveniente del sistema nervioso y del sistema endócrino. Por lo tanto, cambios fisiológicos como los producidos por pesticidas pueden afectar la homeostasis del organismo, generando en consecuencia alteraciones etológicas (Peltzer et al., 2024). En este sentido, las alteraciones conductuales son consideradas indicadores sensibles de toxicidad (David et al., 2012; Silva et al., 2020), incluso en concentraciones ambientales relevantes (García-Muñoz et al., 2011), y constituyen señales de alerta temprana que se suelen utilizar en conjunto con otros biomarcadores para la evaluación de efectos subletales (Denoël et al., 2012). Estos biomarcadores permiten establecer conexiones entre procesos celulares y consecuencias a niveles ecológicos (Amé et al., 2021). Los parámetros más estudiados incluyen distancia total recorrida y cambios en la velocidad de nado o actividad general de los renacuajos, entre otros (Peltzer et al., 2024). Por otra parte, este tipo de biomarcadores cuentan con la ventaja de ser rentables, además de que los parámetros son fáciles de medir e interpretar y no resultan destructivos para los animales ni el ecosistema (Denoël et al., 2012).

1.5. El organismo de prueba: *Boana pulchella*

La ranita del zarzal, *Boana pulchella* (Duméril & Bibron, 1841), es un anuro perteneciente a la familia Hylidae. Su distribución es principalmente pampeana, y en Uruguay se encuentra en todo el territorio, siendo uno de los anfibios más comunes de nuestra fauna (Maneyro & Carreira, 2012). Ocupa una gran diversidad de ambientes, tales como bosques ribereños, bañados con vegetación emergente o flotante, praderas inundables, pastizales cercanos a cuerpos de agua, e incluso es común en áreas urbanas y periurbanas (Maneyro & Carreira, 2012). Se trata de un taxón no amenazado, encontrándose en la categoría Preocupación menor (LC) tanto a nivel nacional (Carreira & Maneyro, 2015), como global (IUCN, 2023). No obstante, la expansión de la

agricultura y la contaminación de los cuerpos de agua debido, principalmente, a la escorrentía de pesticidas agrícolas constituyen amenazas localizadas para esta especie (IUCN, 2023).

Aunque los machos vocalizan durante todo el año (Achaval & Olmos, 2007), desde la vegetación emergente o marginal (Zaracho et al., 2012), se han registrado picos de actividad reproductiva al final del verano y comienzos del otoño (Maneyro & Carreira, 2012). El amplexo es axilar (Figura 1a) (Achaval & Olmos, 2007), y las puestas consisten en masas gelatinosas que contienen entre 600 a 900 huevos (Williams & Tettamanti, 2024), que quedan adheridas a la vegetación (Maneyro & Carreira, 2012). La metamorfosis puede llevar varios meses (Maneyro & Carreira, 2012). Las larvas presentan una coloración general castaño oscuro con reflejos dorados y las aletas son manchadas (Figura 1b) (Langone, 1994). Además, presentan hábitos bentónicos (Santos, 2022).

Las características reproductivas de esta especie (reproducción frecuente y gran número de huevos por puesta), sumado a que se encuentra en sitios agrícolas (Peltzer et al., 2006) y es fácil de mantener en el laboratorio, la vuelven un excelente organismo de prueba en estudios toxicológicos (Agostini et al., 2010). En este sentido, ha demostrado ser sensible a una amplia gama de contaminantes, entre los que se incluyen cipermetrina (Agostini et al., 2010), glifosato (Martinez Puppi, 2022), imazetapir (Pérez-Iglesias et al., 2018), pirimicarb (Natale et al., 2018) y picloram (Riero et al., 2024), todos ellos utilizados en nuestro país (OAN, 2022). Además, los efectos reportados en respuesta a xenobióticos abarcan tanto efectos letales (Agostini et al., 2010; Pérez-Iglesias et al., 2018; Riero et al., 2024), como subletales a distintos niveles de organización: celular (Martinez Puppi, 2022; Natale et al., 2018; Pérez-Iglesias et al., 2018; Riero et al., 2024), morfológico (Agostini et al., 2010; Natale et al., 2018; Pérez-Iglesias et al., 2018) y comportamental (Agostini et al., 2010; Natale et al., 2018); así como alteraciones en el desarrollo y crecimiento (Agostini et al., 2010; Pérez-Iglesias et al., 2018). Por último, cabe destacar que esta especie ha sido utilizada previamente en bioensayos con sedimentos, donde demostró ser un buen organismo de prueba (Sansiñena et al., 2018).



Figura 1. La especie de estudio: *Boana pulchella*. **(a)** Pareja de *Boana pulchella* en amplexo. **(b)** Vista dorsal (superior) y lateral (inferior) de una larva de *Boana pulchella* en estadio GS31. Escala: 1cm.

2 - Hipótesis y predicciones

Hipótesis A:

Los sedimentos extraídos de una cañada localizada en una zona bajo intensa producción de fruticultura de hoja caduca acumulan pesticidas potencialmente tóxicos para la biota.

Predicciones:

1. Los renacuajos de *Boana pulchella* expuestos a sedimentos extraídos de una zona con actividad frutícola presentarán una mayor frecuencia de daño genético, en comparación con las larvas expuestas a sedimentos extraídos de un sitio control sin actividad agrícola.
2. Los renacuajos de *B. pulchella* que se desarrollen en tratamientos con sedimentos provenientes de un sitio bajo fruticultura de hoja caduca verán alterada su actividad natatoria y presentarán una menor velocidad de nado, en comparación con larvas expuestas a sedimentos del sitio control.

Hipótesis B:

Los pesticidas que llegan a la cañada por corrientes naturales, escorrentía o lixiviación, se acumulan aguas abajo.

Predicciones:

1. Habrá una mayor concentración de pesticidas en los sedimentos extraídos del tramo final de la cañada.
2. Los renacuajos de *B. pulchella* expuestos a sedimentos extraídos del tramo final de la cañada presentarán una mayor frecuencia de MN y ANE; presentarán alteraciones en la actividad natatoria y una menor velocidad de nado, en comparación con las larvas expuestas a sedimentos extraídos del tramo inicial y medio.

3 - Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar a nivel genético y comportamental la toxicidad de los sedimentos de un sitio bajo fruticultura de hoja caduca, sobre larvas de *Boana pulchella* (Anura: Hylidae).

3.2. Objetivos específicos

- Analizar la frecuencia de micronúcleos y aberraciones nucleares en los eritrocitos de sangre periférica en las larvas de *Boana pulchella* expuestas a sedimentos de un sitio afectado por fruticultura de hoja caduca y a sedimentos de un sitio control.
- Evaluar y comparar comportamientos entre larvas de *B. pulchella* expuestas a los sedimentos provenientes de los cultivos frutícolas y a los sedimentos provenientes de un sitio control.

4 - Materiales y métodos

Los materiales y equipos necesarios para la realización de este trabajo fueron provistos por el Laboratorio de Herpetología de la Facultad de Ciencias, UdelaR.

4.1. Sitio de estudio

La Cañada del Dragón, Melilla, Montevideo, forma parte de la cuenca del Arroyo Colorado (Teixeira de Mello, 2007). La constitución de sus suelos (lodolitas, loess y fangolitas, arenas y arcillas), presenta una alta capacidad de retención de sustancias, incluyendo posibles contaminantes (International Atomic Energy Agency & Comisión Administradora del Mercado Modelo, 2011). Dicha cañada se encuentra inmersa en una zona con intensa producción de FHC (Acosta, 2013). El plan de manejo de los cultivos incluye el uso de los siguientes pesticidas: acetamiprid, abamectina, matrine, metoxifenozone, mirex, y clorantianiliprol, que se aplican en formulados comerciales. Se seleccionaron tres sitios de muestreo a diferentes alturas del curso de agua para la extracción de sedimentos: inicio (F1), medio (F2) y final (F3) (Figura 2). Además, se seleccionó como sitio control (C), un charco en las inmediaciones del Parque Lecocq, carente de actividad agrícola y ubicado a pocos kilómetros del sitio de estudio (Figura 2).

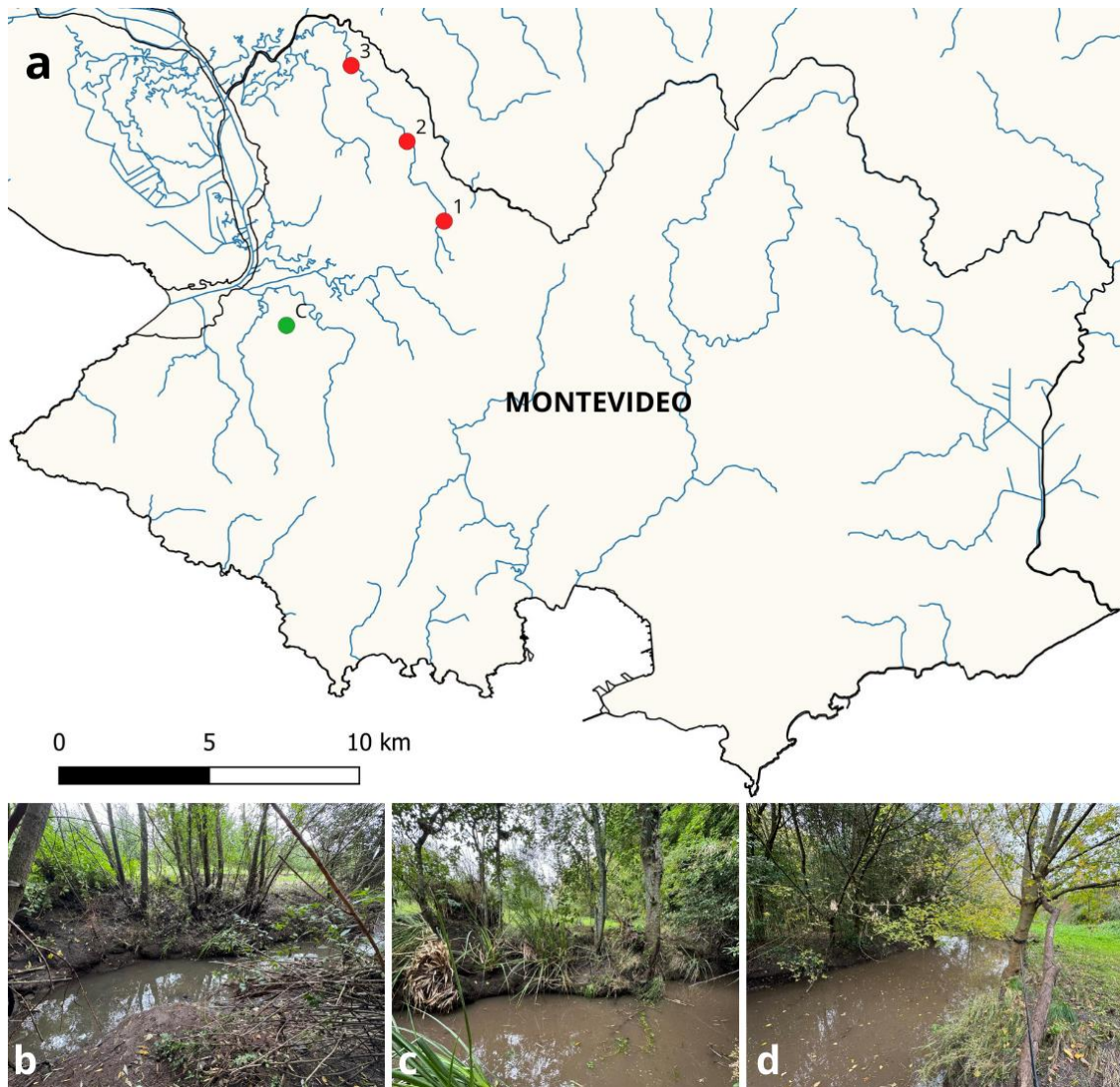


Figura 2. Sitios de estudio en la Cañada del Dragón de donde se extrajeron los sedimentos para los tratamientos de mesocosmos. **(a)** Mapa de Montevideo, Uruguay, donde se indica el sitio control en el Parque Lecoq (verde), y los sitios a las diferentes alturas de la Cañada del Dragón (rojo). **(b)** Sitio en el inicio **(c)** sitio en el medio y **(d)** sitio en el final de la cañada del Dragón.

4.2. Muestreo de sedimentos

Para cada uno de los sitios seleccionados se extrajeron sedimentos una única vez, de forma estandarizada (Gristo et al., 2002). La extracción se realizó mediante el uso de un corer, y hasta una profundidad de 10 cm, ya que los mayores niveles de contaminantes se concentran en las capas superficiales (Hoffman et al., 2003). Se tomaron seis muestras por cada sitio, compuestas por tres submuestras. Se acondicionaron en bolsas estériles, las cuales a su vez se colocaron dentro de bolsas oscuras, y se transportaron al Laboratorio de Herpetología, de la Facultad de Ciencias. Se almacenaron a -30°C hasta el comienzo

del experimento. Una submuestra de cada sitio (aprox. 1kg), fue enviada al Laboratorio Analítico Agroindustrial (LAAI) para analizar la presencia y concentración de los pesticidas utilizados en el manejo del cultivo, mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS).

4.3. Colecta y mantenimiento de larvas

Las larvas de *Boana pulchella* en un estadio de desarrollo temprano fueron colectadas mediante el uso de un calderín en una zona sin actividad agrícola, en Melilla, Montevideo. Los renacuajos fueron colectados bajo la autorización de la Dirección Nacional de Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos, Ministerio de Ambiente (Permiso de colecta - código EM2023/360001/012957). Se colocaron en recipientes de plástico con agua del sitio y fueron trasladadas al Laboratorio de Herpetología, de la Facultad de Ciencias. Se mantuvieron en acuarios de vidrio (15L de capacidad) con agua filtrada y declorada (filtro PSA, modelo senior 3), hasta que alcanzaron el estadio GS25 (Gosner, 1960), bajo las siguientes condiciones: temperatura ambiente $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo 12:12 horas luz/oscuridad, oxigenadores con burbujeo constante a ± 90 burbujas/min. Además, fueron alimentadas *ad libitum* con lechuga hervida hasta el comienzo del experimento (Junges et al., 2012; Lajmanovich et al., 2014).

4.4. Experimentos de mesocosmos

Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo el protocolo de experimentación ID1503, aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Ciencias, UdelaR.

Los experimentos de mesocosmos al aire libre se realizaron entre mayo y octubre del 2024, en la Facultad de Ciencias, UdelaR, siguiendo las metodologías de Peltzer et al. (2013) y USEPA (1996), con algunas modificaciones. Los sedimentos extraídos de cada sitio (C, T1, T2, T3) se colocaron en la base de acuarios de vidrio con una capacidad de 15,6L (25cm de largo x 25cm de ancho x 25cm de profundidad). Posteriormente, se agregó agua filtrada (filtro PSA, modelo senior 3) y declorada, en una proporción sedimento/agua de 1:4 (4cm de sedimento, columna de 16cm de agua, Figura 3a). Se cubrieron con una malla móvil de 2x2mm para evitar la oviposición de insectos y la

depredación por parte de otros animales. También se colocó una malla de sombra frente a las peceras, para proteger de la luz del sol directa, las lluvias y el viento fuerte. Luego de un reposo de 48hs, se colocaron 42 larvas de *B. pulchella* en estadio GS25 (Gosner, 1960) por cada réplica (día experimental 1, 9 de mayo). Cada tratamiento se realizó por triplicado y su disposición fue aleatoria (Figura 3b). Las larvas se alimentaron *ad libitum* cada dos días con lechuga hervida. Durante el transcurso del experimento, se extrajeron semanalmente dos larvas por réplica para el análisis de biomarcadores comportamentales. A su vez, el mismo día por la mañana (09:00hs), se registró para cada mesocosmo la temperatura (°C), conductividad (µS/cm), pH, turbidez (NTU) y concentración de oxígeno disuelto (mg/L) en agua utilizando un equipo multiparámetro HORIBA U-50. Al inicio y al final del experimento, se registró la concentración de nitratos y fosfatos disueltos en el agua siguiendo a Monteiro et al. (2003) y APHA (1995), respectivamente. Los mesocosmos fueron controlados diariamente, las larvas muertas fueron registradas e inmediatamente retiradas (Peltzer et al., 2013). El análisis de puntos finales comportamentales abarcó hasta el día 69 (semana 10), cuando uno de los tratamientos no alcanzó el número mínimo de individuos para los análisis (n=6).

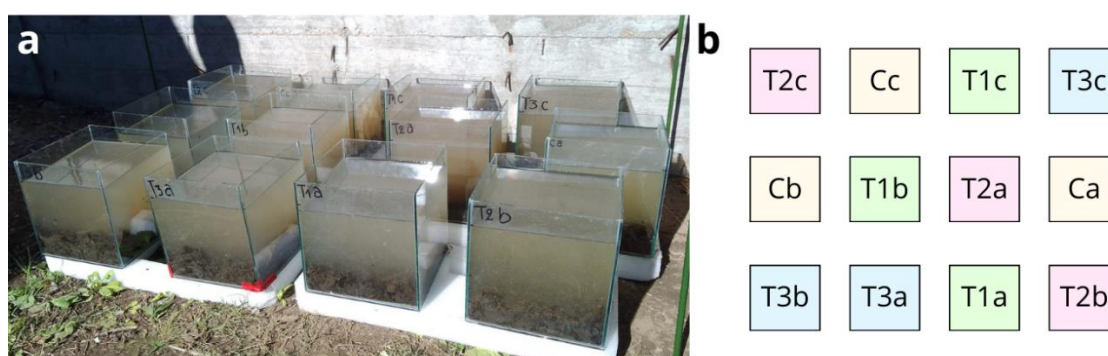


Figura 3. Experimentos de mesocosmos. **(a)** Acuarios con sedimentos y agua, en una proporción 1:4 respectivamente. **(b)** Disposición de los tratamientos de mesocosmos. Ca/Cb/Cc: tres réplicas del tratamiento control, con sedimentos extraídos de un sitio sin actividad agrícola. T1a/T1b/T1c: tres réplicas del tratamiento 1 (T1), con sedimentos extraídos del inicio de la cañada. T2a/T2b/T2c tres réplicas del tratamiento 2 (T2), con sedimentos extraídos del tramo medio de la cañada. T3a/T3b/T3c tres réplicas del tratamiento 3 (T3), con sedimentos extraídos del final de la cañada.

4.5. Parámetros en células sanguíneas

En el día 49 (semana 9), cuando las larvas alcanzaron el tamaño apropiado, fueron extraídas aleatoriamente seis larvas por tratamiento (dos larvas por réplica) para análisis de genotoxicidad. Las larvas fueron sacrificadas mediante inmersión en eugenol al 10% y se les extrajo sangre por decapitación, utilizando capilares heparinizados. Se prepararon

frotis de sangre periférica por duplicado sobre portaobjetos limpios, los cuales fueron fijados con alcohol absoluto durante 15 minutos, y luego se dejaron secar a oscuras a temperatura ambiente, durante 24 horas. Posteriormente, fueron teñidos mediante la técnica May Grünwald-Giemsa (Lajmanovich et al., 2014). Para la observación de los preparados se utilizó un microscopio óptico de campo claro ZEISS PRIMOSTAR 3, con una magnificación de 1000x. La observación fue realizada por un único observador. Se registró la presencia de MN y de ANE en 1000 eritrocitos por cada larva (Cabagna et al., 2006; Lajmanovich et al., 2014). Los frotis de sangre fueron fotografiados usando una cámara ZEISS de 8 Megapíxeles.

Para identificar correctamente a los MN se siguieron los criterios de Fenech (2000), Meintières et al., (2001) y Schmid (1975): presentan una morfología idéntica al núcleo principal, pero de diámetro menor (entre 1/16 y 1/3 del diámetro del núcleo principal); son circulares, con membrana nuclear; tienen la misma intensidad de tinción que el núcleo principal; los límites del núcleo principal y del micronúcleo son claramente diferenciables, puesto que no están conectados ni superpuestos; se encuentran dentro del citoplasma; y no son refractarios, pueden distinguirse fácilmente de otros artefactos.

Por otra parte, las ANE fueron identificadas y clasificadas siguiendo los criterios de Josende et al. (2015), Lajmanovich et al., (2014) y Pereira et al., (2024).

4.6. Biomarcadores etológicos

A partir del día 21 de exposición (semana 3) y hasta el día 69 (semana 10), una vez por semana, se evaluaron puntos finales comportamentales. Para ello, se extrajeron aleatoriamente seis larvas por tratamiento (dos por réplica) y se evaluó su actividad natatoria en dos procedimientos experimentales, en el orden en que se describen a continuación.

En primera instancia, se evaluó individualmente la actividad natatoria de las larvas siguiendo la metodología descrita en do Amaral et al., (2018). Para ello, se colocó a cada larva en un recipiente con 1L de agua filtrada y declorada. Luego de un periodo de aclimatación de 5 minutos, se agitó suavemente el agua durante 5 segundos con una varilla de vidrio. Durante 60 segundos, se observó y grabó a la larva utilizando un celular Samsung Galaxy A14, colocado a una altura de 55 cm sobre el recipiente. Los

comportamientos observados se clasificaron en las siguientes categorías de acuerdo a lo descrito en do Amaral et al., (2018):

- Natación normal (NS): los renacuajos nadaban activamente contra la corriente generada, con su patrón de natación normal.
- Natación anormal (NA): los renacuajos nadaban con poco esfuerzo contra la corriente generada, siendo mayor el tiempo que eran arrastrados por la corriente que el tiempo que pasaban nadando en su contra. También se incluyó en esta categoría renacuajos que presentaron patrones de nado anormales.
- Inmovilidad (IN): Ausencia total de movimiento, los renacuajos eran arrastrados por la corriente generada.

En segundo lugar, se evaluó la velocidad de natación individual realizando modificaciones a las metodologías descritas en Egea-Serrano & Tejedo (2014) y Silva et al. (2020; 2021). Se colocó a cada larva en un recinto con agua filtrada y declorada (2,5 cm ancho x 27 cm de largo x 1,5 cm de profundidad), de modo que quedó completamente cubierta por el agua, a la vez que la natación se vio limitada al plano horizontal. Luego de un periodo de aclimatación de 5 minutos, se indujo una respuesta natatoria al tocar suavemente la cola con una pipeta. Este procedimiento se realizó unas cinco veces por larva, dejando un minuto de aclimatación entre ensayos (Britson & Threlkeld, 1998). Se delimitó cada evento natatorio desde que la larva comenzó a desplazarse a causa del estímulo hasta que el movimiento de la cola se detuvo completamente. La distancia recorrida y el tiempo empleado en el evento natatorio se midieron utilizando un cronómetro y una regla graduada, respectivamente. Se calculó la velocidad total de natación (cm/s) como la distancia total recorrida (cm) sobre el tiempo que le llevó recorrer dicha distancia (s). Cada evento natatorio fue grabado utilizando un celular Samsung Galaxy A14, colocado sobre recinto, a una altura de 27 cm.

Durante los periodos de observación y grabación, el observador permaneció inmóvil y, en caso de ser necesario, se movió lentamente con el fin de no inducir cambios en el comportamiento de los renacuajos (Denoël et al., 2012). Para reducir posibles sesgos en el observador, el análisis de las grabaciones se realizó por un único observador, y sin tener conocimiento de a que tratamiento fueron expuestos los renacuajos observados (Brunelli et al., 2009).

Finalmente, las larvas fueron anestesiadas con benzocaína tópica, fijadas en formol al 10% y depositadas en la Colección de Zoología de Vertebrados de la Facultad de Ciencias (ZVCB).

4.7. Análisis de datos

La normalidad de los datos se probó mediante el test de Shapiro-Wilk, mientras que la homogeneidad de varianzas se probó utilizando el test de Levene (Zar, 2010). El nivel de significancia estadística para todos los análisis realizados se estableció en $\alpha=0.05$.

4.7.1. Parámetros fisicoquímicos del agua

El análisis de la variación de los parámetros fisicoquímicos del agua se realizó entre los diferentes tratamientos de mesocosmos y el control, considerando en conjunto las réplicas de cada tratamiento, independientemente del momento en que se midieron las variables. Se aplicó el Análisis de varianza paramétrico (ANOVA), cuando los datos fueron normales y homogéneos, y el análisis de varianza no – paramétrico de Kruskal Wallis, cuando los datos no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Al detectarse diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó la prueba de Tukey o el test de Mann-Whitney corregido por el criterio de Bonferroni (Zar, 2010), respectivamente, haciendo uso del software Past 4.13 (Hammer et al., 2001).

4.7.2. Parámetros en células sanguíneas

Se calculó la prevalencia de cada tipo de anomalía en los eritrocitos (MN y ANE) dividiendo el número de larvas que la presenta sobre el número de individuos examinados (Peltzer et al., 2013). La frecuencia de ANE se expresó como el valor medio (‰) de la suma de todos los tipos de aberraciones individuales observadas (Lajmanovich et al., 2014). Las frecuencias de MN y ANE se determinaron sobre un total de 1000 eritrocitos analizados por larva, y se expresaron como la media $\pm$ el error estándar. Las diferencias en las frecuencias de MN y de ANE entre cada tratamiento con sedimentos provenientes del sitio frutícola con el control, y entre todos los tratamientos, se analizaron mediante el test de proporción binomial (Margolin et al., 1983), utilizando el software BioEstat 5.3 (Ayres et al., 2007).

4.7.3. Actividad natatoria

Los datos de actividad natatoria no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo que, para evaluar las diferencias entre los tratamientos de mesocosmos, se utilizó el análisis de varianza no – paramétrico de Kruskal Wallis, y posteriormente el test de Mann-Whitney corregido por el criterio de Bonferroni (Zar, 2010), utilizando el software Past 4.13 (Hammer et al., 2001).

4.7.4. Velocidad de nado

Los datos de velocidad de nado (cm/s) se normalizaron dividiendo por el largo total de las larvas (cm). Para evaluar las diferencias en la velocidad de nado entre los diferentes tratamientos de mesocosmos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA), en el software el software Past 4.13 (Hammer et al., 2001).

5 - Resultados

5.1. Parámetros fisicoquímicos del agua y pesticidas en sedimentos

Se constató la presencia de pesticidas utilizados en el manejo de las plantaciones frutícolas en los sedimentos extraídos de la Cañada del Dragón. En todas las muestras de sedimento se buscaron los AQ acetamiprid, abamectina, matrine, metoxifenozone, mirex, y clorantraniliprol. Solamente se detectó el insecticida metoxifenozone en sedimentos provenientes del inicio de la cañada (T1); y la presencia de metoxifenozone y clorantraniliprol en sedimentos provenientes del medio (T2) y el final (T3) de la misma (Tabla 1).

Tabla 1. Variables fisicoquímicas del agua y residuos de pesticidas en sedimentos para cada tratamiento de mesocosmos. Media $\pm$ Desvío estándar. (C) sedimento proveniente de un sitio sin actividad agrícola; (T1) sedimento proveniente del inicio de una cañada inmersa en un sitio bajo fruticultura de hoja caduca; (T2) sedimento proveniente del medio de la cañada; (T3) sedimento proveniente del final de la cañada. LD: Límite de detección (5 $\mu\text{g/kg}$).

	Tratamientos			
	C	T1	T2	T3
Parámetros fisicoquímicos del agua				
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	13.66 $\pm$ 3.09	13.62 $\pm$ 3.10	13.59 $\pm$ 3.15	13.55 $\pm$ 3.16
Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	329.00 $\pm$ 47.58	395.05 $\pm$ 62.55	537.52 $\pm$ 132.07	551.24 $\pm$ 142.80
pH	6.74 $\pm$ 0.20	6.84 $\pm$ 0.22	7.21 $\pm$ 0.25	7.21 $\pm$ 0.26
Oxígeno disuelto (mg/L)	4.17 $\pm$ 2.68	2.04 $\pm$ 1.22	2.65 $\pm$ 1.70	2.15 $\pm$ 1.32
Turbidez (NTU)	52.32 $\pm$ 67.77	73.31 $\pm$ 89.73	53.05 $\pm$ 69.33	43.53 $\pm$ 51.58
Nitrato (mg/L)	0.447 $\pm$ 0.12	0.066 $\pm$ 0.035	0.467 $\pm$ 0.15	0.307 $\pm$ 0.12
Fósforo (mg/L)	0.237 $\pm$ 0.21	0.262 $\pm$ 0.24	0.722 $\pm$ 0.35	0.911 $\pm$ 38
Residuos de pesticidas en sedimentos				
Clorantraniliprol ($\mu\text{g/kg}$)	<LD	<LD	9	11
Metoxifenocida ($\mu\text{g/kg}$)	<LD	10	10	6

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos del agua, la temperatura del agua y la turbidez no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de mesocosmos ($H=0.82$, $p=0.844$; $H=3.31$, $p=0.346$, respectivamente). Se encontraron diferencias significativas en la conductividad del agua entre tratamientos ($H=39.2$, $p<0.05$), siendo menor en el control en comparación con el resto de los tratamientos ($p<0.05$ en todos los casos). A la vez que fue significativamente menor en T1 en comparación a T2 y T3

($p < 0.05$ en ambos casos) (Figura 4a). El oxígeno disuelto también difirió entre tratamientos ($H=13.5$, $p=0.003$), siendo significativamente menor en T1 y T3, en comparación al control ($p < 0.05$ en ambos casos; Figura 4b). El pH también presentó diferencias entre tratamientos ($H=38.09$, $p < 0.05$), siendo significativamente menor en el control en comparación a T2 y T3 ($p < 0.05$ en ambos casos), y en T1 en comparación a T2 y T3 ($p < 0.05$ en ambos casos; Figura 4c). Finalmente, la concentración de fósforo disuelto en agua presentó diferencias significativas entre tratamientos ($H=11.55$, $p < 0.05$), pero después de aplicar el test de Mann-Whitney corregido por el criterio de Bonferroni, las diferencias entre tratamientos no fueron significativas. Por otra parte, el nitrato también difirió entre tratamientos ($F=15.45$, $p < 0.05$), siendo significativamente menor en T1 en comparación al resto de los tratamientos ($p < 0.05$ en todos los casos). No obstante, cabe destacar que ambos parámetros se encontraron dentro de los rangos normales de calidad para la sustentabilidad de la vida acuática (Burton Jr & Pitt, 2001; USEPA, 1997).

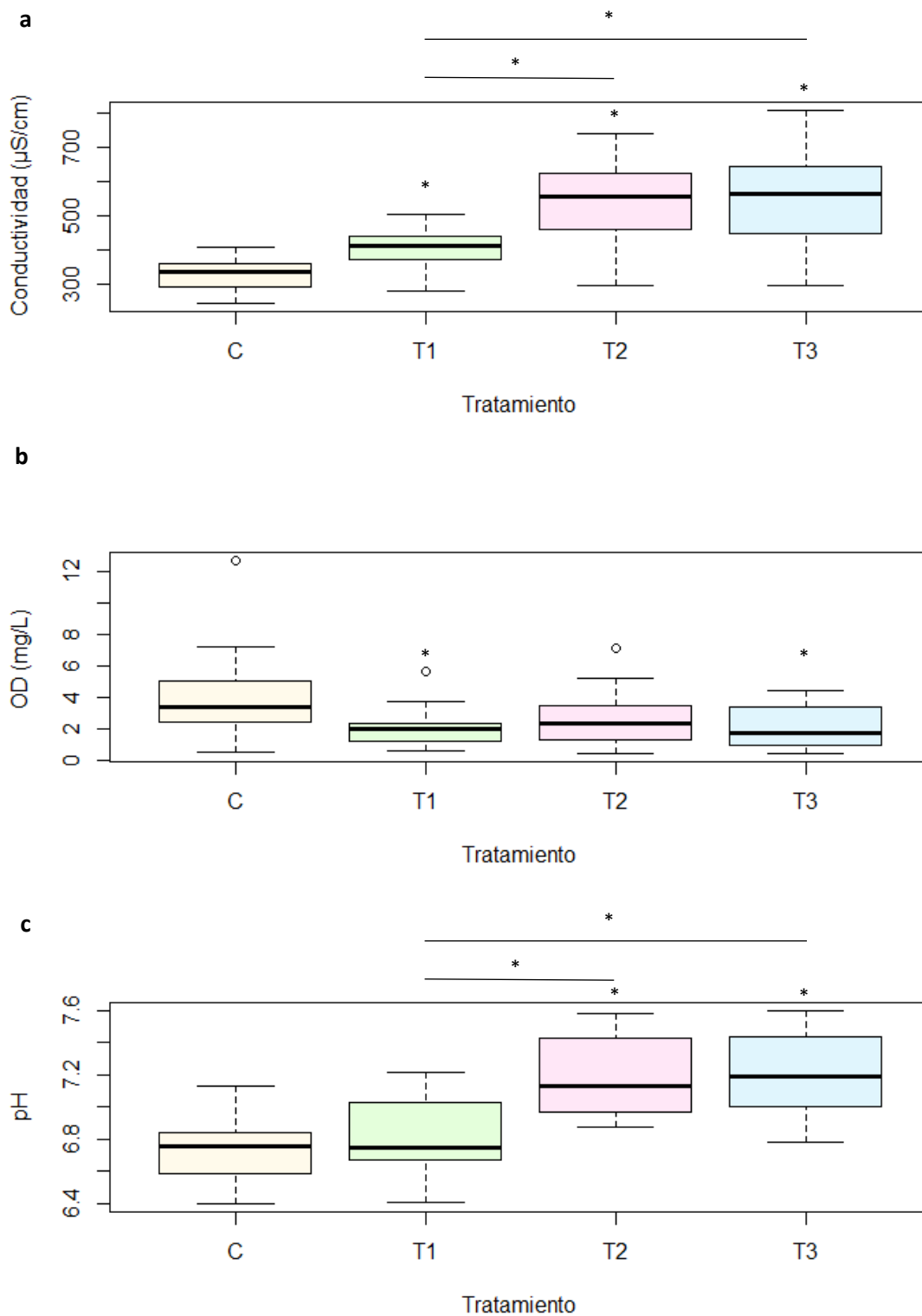


Figura 4. Variación de (a) la conductividad ($\mu\text{S/cm}$), (b) el oxígeno disuelto en agua (mg/L) y (c) el pH, a lo largo del experimento de mesocosmos, en los diferentes tratamientos con sedimentos. (C) sedimento proveniente de un sitio sin actividad agrícola; (T1) sedimento proveniente del inicio de una cañada inmersa en un sitio bajo fruticultura de hoja caduca; (T2) sedimento proveniente del medio de la cañada; (T3) sedimento proveniente del final de la cañada. * $p < 0.05$:

diferencias significativas en comparación con el control (Test de Kruskal Wallis, seguido del test de Mann-Whitney).

5.2. Parámetros en células sanguíneas

Se constató la presencia de micronúcleos (MN) y otras aberraciones nucleares en eritrocitos (ANE) de renacuajos de *Boana pulchella* expuestos a diferentes tratamientos con sedimentos. Su prevalencia se registró en 1000 eritrocitos por cada larva analizada (dos por réplica). La frecuencia de MN fue significativamente mayor en larvas expuestas a sedimentos de la Cañada del Dragón, en comparación con las larvas expuestas a sedimentos provenientes del sitio control (C) (C/T1: $Z=-2.00$, $p<0.05$; C/T3: $Z=-1.81$, $p<0.05$), exceptuando el tratamiento T2 (sedimentos extraídos del medio de la cañada), donde la frecuencia de MN no difirió del tratamiento control (C/T2: $Z=-0.91$, $p<0.05$) (Figura 5). La frecuencia de ANE también fue significativamente mayor en larvas expuestas a sedimentos provenientes del sitio frutícola en comparación con el control (C/T1: $Z=-9.17$, $p<0.05$; C/T2: $Z=-7.82$, $p<0.05$; C/T3: $Z=-11.38$, $p<0.05$). A su vez, la frecuencia de ANE en larvas expuestas a T3 fue significativamente mayor, en comparación con T1 y T2 (T1/T3: $Z=-2.35$; $p<0.05$; T2/T3: $Z=-3.77$, $p<0.05$) (Figura 6).

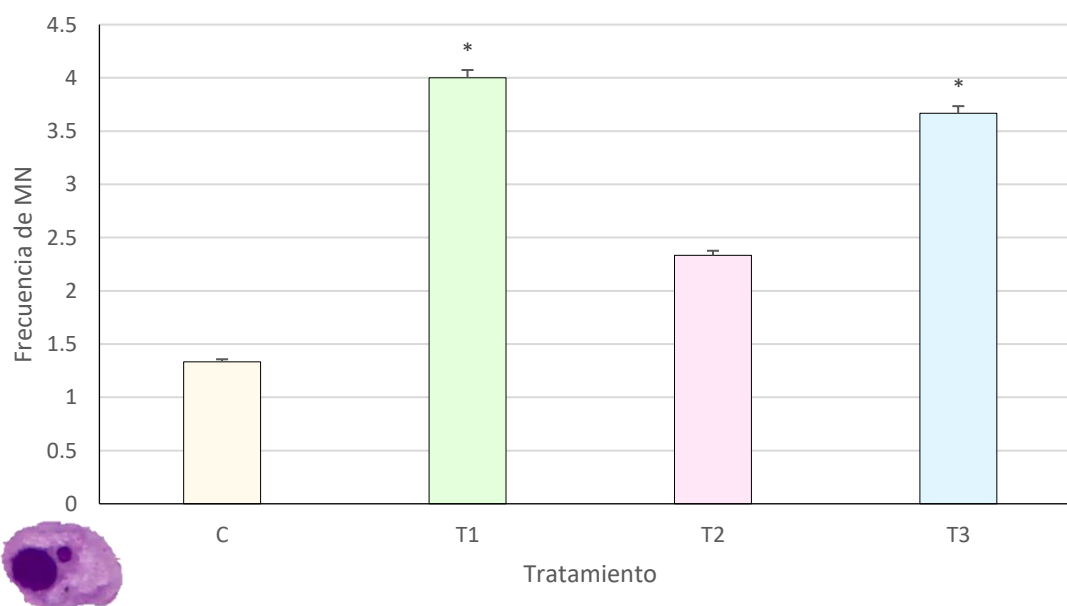


Figura 5. Frecuencia de micronúcleos (MN) en 1000 eritrocitos de larvas de *Boana pulchella* expuestas a diferentes tratamientos con sedimentos. (C) sedimento proveniente de un sitio sin actividad agrícola; (T1) sedimento proveniente del inicio de una cañada inmersa en un sitio bajo

fruticultura de hoja caduca; (T2) sedimento proveniente del medio de la cañada; (T3) sedimento proveniente del final de la cañada. * $p<0.05$: diferencias significativas en comparación con el control (Test de proporción binomial).

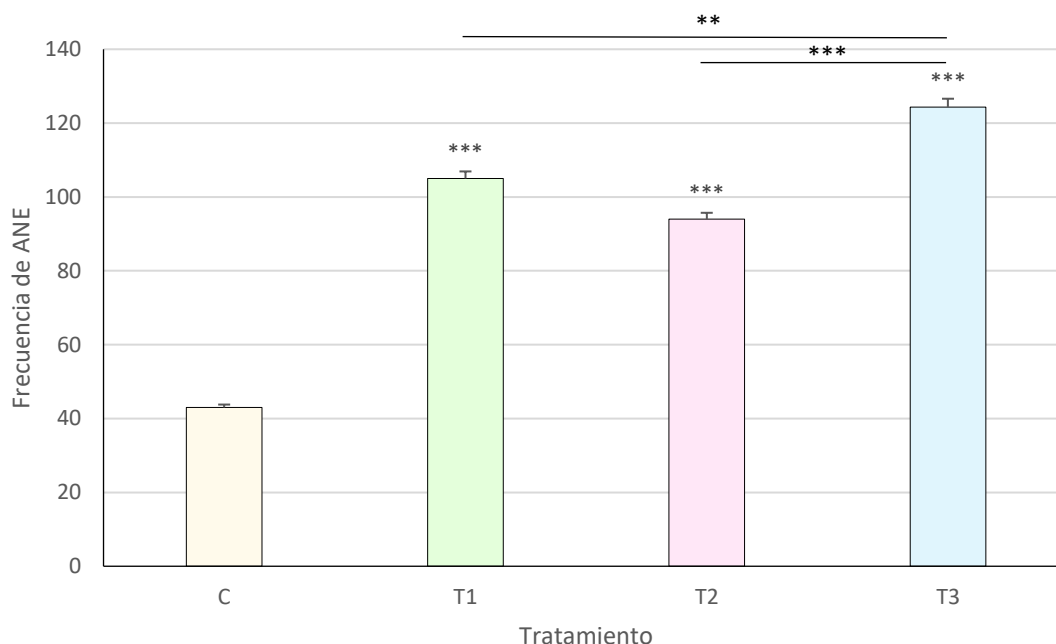


Figura 6. Frecuencia de aberraciones nucleares de los eritrocitos (ANE) en 1000 eritrocitos de larvas de *Boana pulchella* expuestas a diferentes tratamientos con sedimentos. (C) sedimento proveniente de un sitio sin actividad agrícola; (T1) sedimento proveniente del inicio de una cañada inmersa en un sitio bajo fruticultura de hoja caduca; (T2) sedimento proveniente del medio de la cañada; (T3) sedimento proveniente del final de la cañada. * $p<0.05$; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$: diferencias significativas en comparación con el control y entre tratamientos (Test de proporción binomial).

Se identificaron diez tipos de aberraciones nucleares: núcleo muescado (NN), núcleo ampollado (BbN), núcleo en forma de riñón (K), eritroplástido o eritrocito anucleado (EP), núcleo lobado (LN), núcleo con brote (BN), núcleo lobulado (LbN), eritrocito binucleado (BE), núcleo picnótico (PN) y eritroplástido con micronúcleo (MEP) (Figura 7c-7l). Las aberraciones más prevalentes fueron NN, BbN y K (Tabla 2, Figura 8), y sus frecuencias fueron significativamente mayores en todos los tratamientos en comparación al control (NN: C/T1: $Z=-3.69$, $p<0.05$; C/T2: $Z=-3.04$, $p<0.05$; C/T3: $Z=-6.33$, $p<0.05$; BbN: C/T1: $Z=-5.95$, $p<0.05$; C/T2: $Z=-4.50$, $p<0.05$; C/T3: $Z=-5.55$, $p<0.05$; K: C/T1: $Z=-2.66$, $p<0.05$; C/T2: $Z=-3.90$, $p<0.05$; C/T3: $Z=-3.59$, $p<0.05$, respectivamente). El mismo resultado se observó para LN (C/T1: $Z=-3.06$, $p<0.05$; C/T2: $Z=-2.51$, $p<0.05$; C/T3: $Z=-3.19$, $p<0.05$) (Tabla 2, Figura 8, Figura 9e). La frecuencia

de NN fue significativamente mayor en larvas provenientes de T3, en comparación a las larvas provenientes de T1 y T2 (T1/T3: $Z=-2.77$, $p<0.05$; T2/T3: $Z=-3.42$, $p<0.05$) (Figura 9a). Esto también ocurrió en el caso de EP (T1/T3: $Z=-1.88$, $p<0.05$; T2/T3: $Z=-2.67$, $p<0.05$) (Figura 9d), aunque no se encontraron diferencias significativas en su frecuencia entre el control y el T2 (C/T2: $Z=-1.40$, $p=0.0803$). La frecuencia de BN sólo fue significativamente mayor en T1 en comparación al control (C/T1: $Z=-2.05$, $p<0.05$) (Figura 9f), mientras que la frecuencia de LbN, fue significativamente mayor en T2 y T3 en comparación al control (C/T2: $Z=-2.19$, $p<0.05$; C/T3: $Z=-2.53$, $p<0.05$) (Figura 9g). Finalmente, BE y PN sólo fueron observados en células sanguíneas de larvas expuestas a sedimentos provenientes del sitio frutícola, mientras que el eritroplástido con micronúcleo (MEP) se registró una única vez, en T2 (Tabla 2, Figura 8).

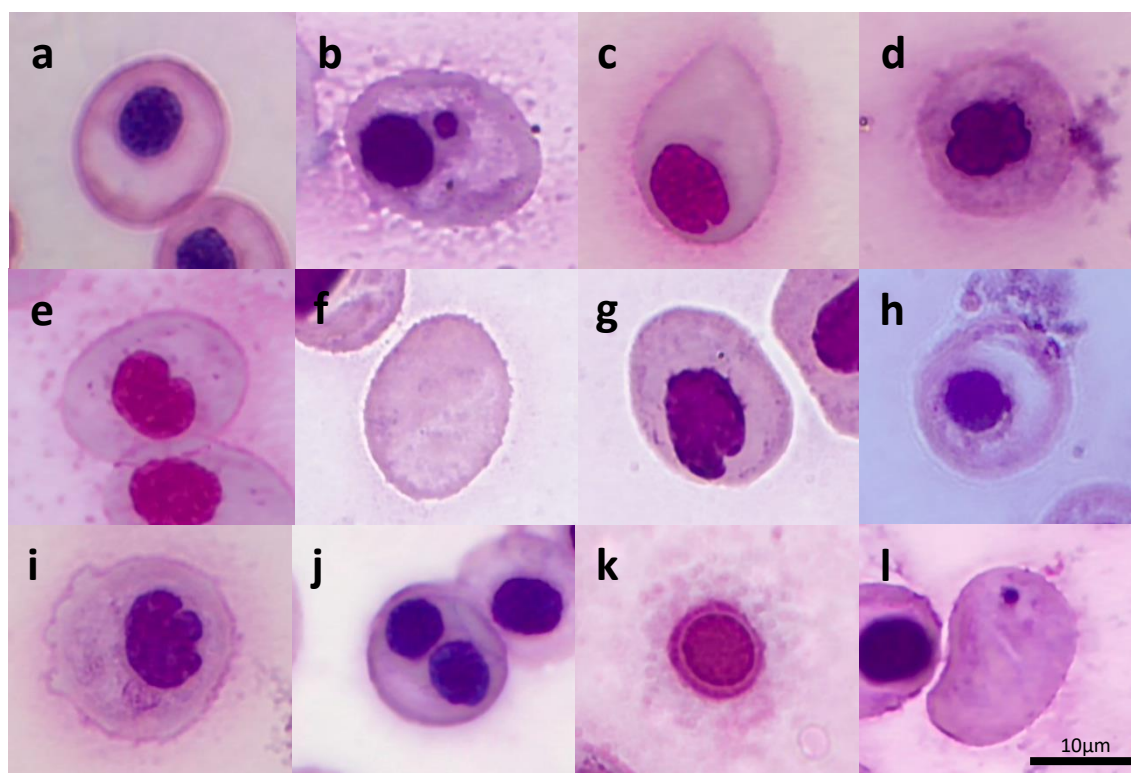


Figura 7. Micronúcleos (MN) y aberraciones nucleares de los eritrocitos (ANE) de larvas de *Boana pulchella* expuestas a sedimentos provenientes de un sitio bajo intensa producción de fruticultura de hoja caduca. (a) eritrocito normal; (b) micronúcleo (MN); (c) núcleo muescado (NN); (d) núcleo ampollado (BbN); (e) núcleo en forma de riñón (K); (f) eritroplástido o eritrocito anucleado (EP); (g) núcleo lobado (LN); (h) núcleo con brote (BN); (i) núcleo lobulado (LbN); (j) eritrocito binucleado (BE); (k) núcleo picnótico (PN); (l) eritroplástido con micronúcleo (MEP). Tinción May Grünwald-Giemsa, 100x. Escala: 10µm.

Tabla 2. Frecuencia relativa de las aberraciones nucleares en 1000 eritrocitos de renacuajos de *Boana pulchella* expuestos a diferentes tratamientos con sedimentos. Columnas: (C) sedimento proveniente de un sitio sin actividad agrícola; (T1) sedimento proveniente del inicio de una cañada inmersa en un sitio bajo fruticultura de hoja caduca; (T2) sedimento proveniente del medio de la cañada; (T3) sedimento proveniente del final de la cañada. Filas: (NN) núcleo muescado; (BbN) núcleo ampollado; (K) núcleo en forma de riñón; (EP) eritroplástido o eritrocito anucleado; (LN) núcleo lobado; (BN) núcleo con brote; (LbN) núcleo lobulado; (BE) eritrocito binucleado; (PN) núcleo picnótico; (MEP) eritroplástido con micronúcleo. Media $\pm$ Desvío estándar.

ANE	Tratamientos			
	C	T1	T2	T3
NN	18.00 $\pm$ 0.329	33.00 $\pm$ 0.602	30.00 $\pm$ 0.548	47.00 $\pm$ 0.858
BbN	12.00 $\pm$ 0.219	35.33 $\pm$ 0.645	28.33 $\pm$ 0.517	33.33 $\pm$ 0.609
K	4.00 $\pm$ 0.073	9.67 $\pm$ 0.176	13.33 $\pm$ 0.243	12.33 $\pm$ 0.225
EP	3.00 $\pm$ 0.055	7.00 $\pm$ 0.128	5.33 $\pm$ 0.097	11.67 $\pm$ 0.213
LN	2.33 $\pm$ 0.043	8.00 $\pm$ 0.146	6.67 $\pm$ 0.122	8.33 $\pm$ 0.152
BN	2.33 $\pm$ 0.043	5.67 $\pm$ 0.103	3.67 $\pm$ 0.067	4.33 $\pm$ 0.079
LbN	1.33 $\pm$ 0.024	2.33 $\pm$ 0.043	4.33 $\pm$ 0.079	5.00 $\pm$ 0.091
BE	0	4.00 $\pm$ 0.073	1.67 $\pm$ 0.030	2.00 $\pm$ 0.037
PN	0	0	0.33 $\pm$ 0.006	0.33 $\pm$ 0.006
MEP	0	0	0.33 $\pm$ 0.006	0

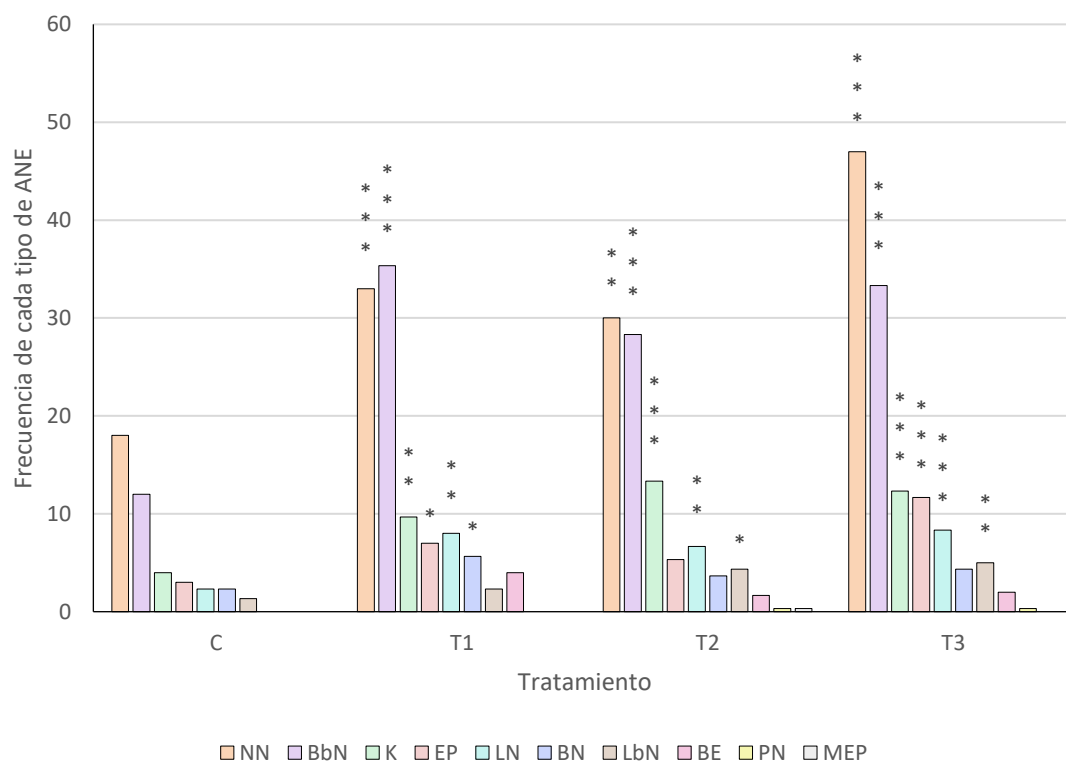


Figura 8. Frecuencia relativa de aberraciones nucleares de los eritrocitos (ANE) de larvas de *Boana pulchella* expuestas a sedimentos provenientes de un sitio sin actividad agrícola (C) y el inicio (T1), medio (T2) y final (T3) de una cañada inmersa en un sitio frutícola. (NN) núcleo muescado; (BbN) núcleo ampollado; (K) núcleo en forma de riñón; (EP) eritroplástido o eritrocito anucleado; (LN) núcleo lobado; (BN) núcleo con brote; (LbN) núcleo lobulado; (BE) eritrocito binucleado; (PN) núcleo picnótico; (MEP) eritroplástido con micronúcleo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: diferencias significativas en comparación con el control (Test de proporción binomial).

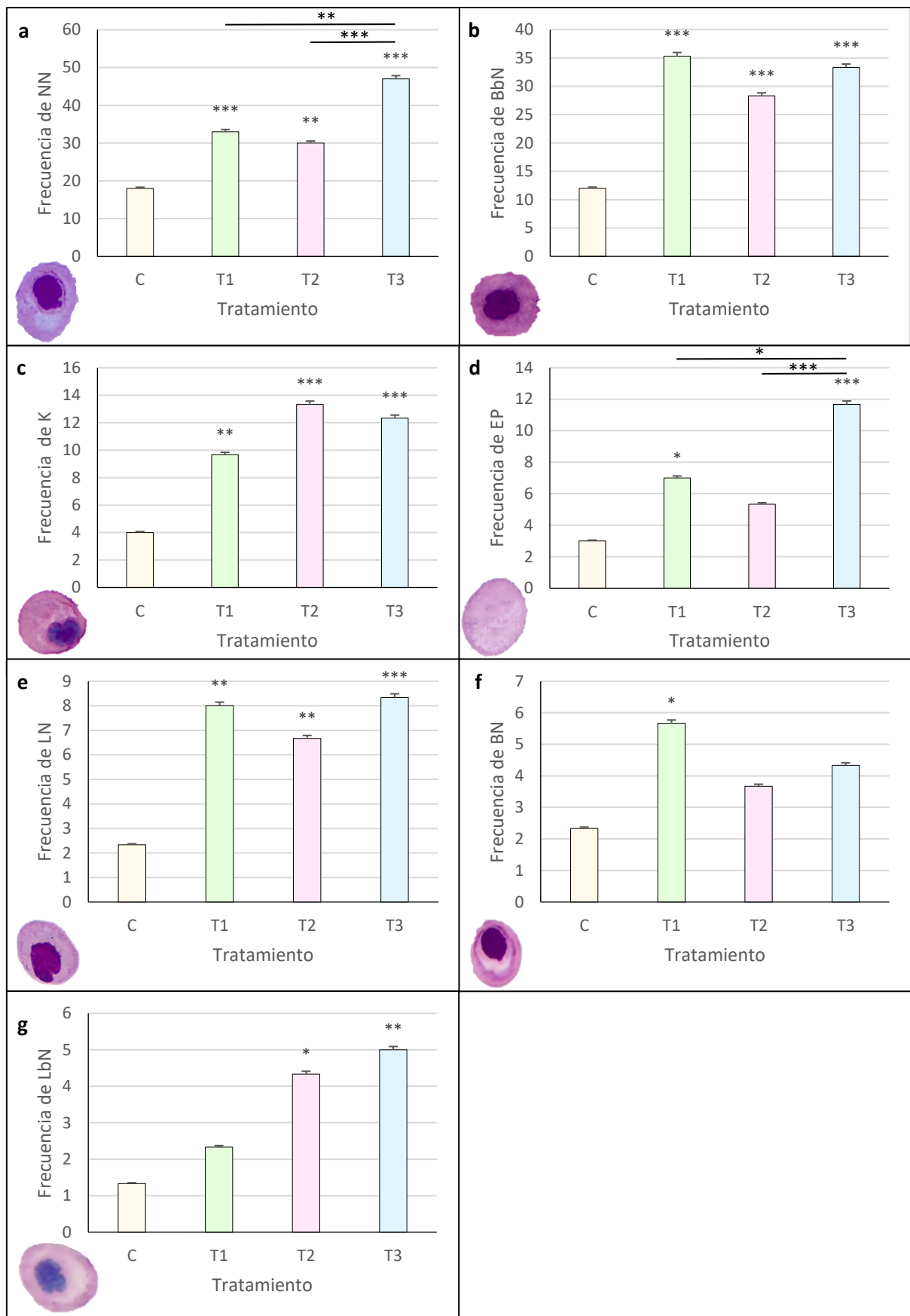


Figura 9. Frecuencia de los distintos tipos de aberraciones nucleares en 1000 eritrocitos contabilizados en larvas de *Boana pulchella* expuestas a diferentes tratamientos con sedimentos. (C) sedimento proveniente de un sitio sin actividad agrícola; (T1) sedimento proveniente del inicio de una cañada inmersa en un sitio bajo fruticultura de hoja caduca; (T2) sedimento proveniente del medio de la cañada; (T3) sedimento proveniente del final de la cañada. (a) Frecuencia relativa de núcleos muescados (NN); (b) Frecuencia relativa de núcleos ampollados (BbN); (c) Frecuencia relativa de núcleos con forma de riñón (K); (d) Frecuencia relativa de eritoplástido o eritrocito anucleado (EP); (e) Frecuencia relativa de núcleo lobado (LN); (f) Frecuencia relativa de núcleo con brote (BN); (g) Frecuencia relativa de núcleo lobulado (LbN). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: diferencias significativas en comparación con el control y entre tratamientos (Test de proporción binomial).

5.3. Actividad natatoria y velocidad de nado

No se encontraron diferencias entre el tiempo de expresión de los comportamientos “natación normal” e “inmovilidad”; entre los distintos tratamientos de sedimentos del sitio bajo FHC y el control ($H=4.21$, $p=0.24$ y $H=6.18$, $p=0.09$, respectivamente). Sin embargo, la actividad natatoria de las larvas provenientes difirió entre tratamientos ($H=9.46$, $p < 0.05$), ya que los renacuajos que se desarrollaron en T3 pasaron significativamente más tiempo exhibiendo “natación anormal” en comparación al control ($p < 0.05$). Sin embargo, no se observaron diferencias en la actividad natatoria entre los tratamientos T1 y T2 con el control ($p=0.92$, y $p=0.94$, respectivamente) (Figura 10).

Finalmente, no se encontraron diferencias significativas en la velocidad de nado entre los tratamientos y el control, ni entre los tratamientos entre sí ($F=1.959$, $p=0.123$).

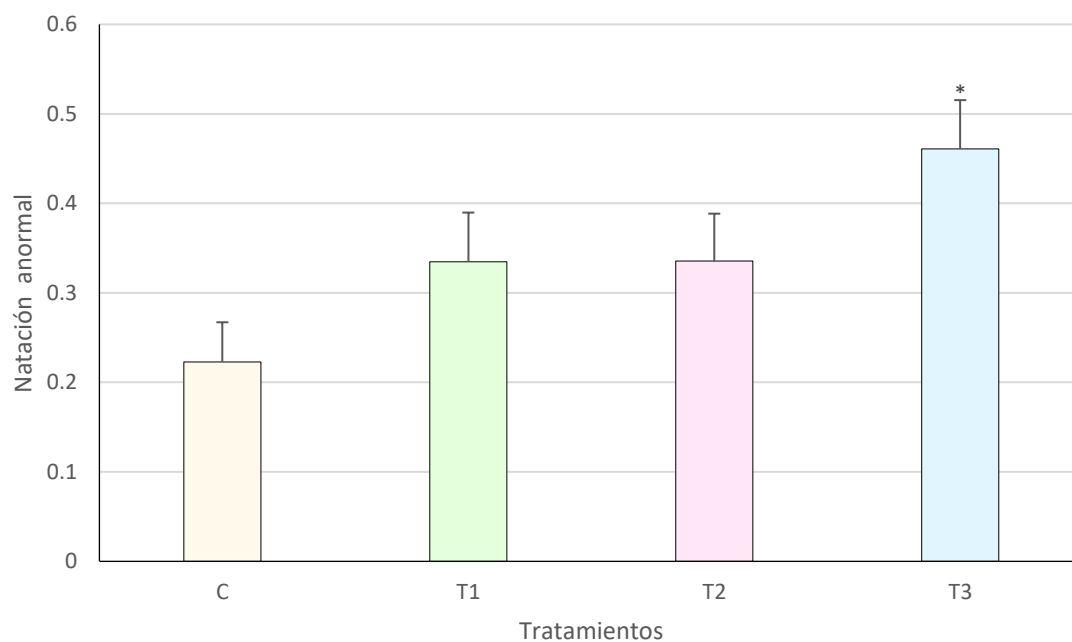


Figura 10. Frecuencia de nado anormal en larvas de *Boana pulchella* expuestas a diferentes tratamientos con sedimentos. (C) sedimento proveniente de un sitio sin actividad agrícola; (T1) sedimento proveniente del inicio de una cañada inmersa en un sitio bajo fruticultura de hoja caduca; (T2) sedimento proveniente del medio de la cañada; (T3) sedimento proveniente del final de la cañada. * $p < 0.05$: diferencia significativa en comparación con el control (Análisis de varianza no – paramétrico de Kruskal Wallis).

6 - Discusión

En el presente trabajo se pudo comprobar la presencia de los insecticidas clorantraniliprol y metoxifenozone en los sedimentos provenientes del sitio bajo FHC. El insecticida clorantraniliprol pertenece a la clase de las diamidas antranílicas, y es utilizado para el control de plagas. Afecta la regulación de la contracción muscular de los insectos expuestos, al interferir con los receptores de rianodina, causando un letargo general y parálisis muscular, derivando eventualmente en su muerte (Bentley et al., 2010). En Uruguay se importa desde el 2012, y es utilizado en cultivos de soja, maíz, sorgo, manzana y durazno (OAN, 2022). Este insecticida se encuentra en la lista de PAN Internacional de Plaguicidas Altamente Peligrosos, donde se destaca su toxicidad para organismos acuáticos, y su alta persistencia en agua, suelo o sedimentos (Pesticide Action Network Internacional, 2021). Si bien no se encontraron trabajos que constaten la toxicidad de este insecticida sobre *Boana pulchella*, Bitschinski et al. (2024) reportaron efectos del clorantraniliprol, sólo y en mezclas, a nivel de la actividad enzimática y a nivel histológico en otra especie del género: *Boana faber*. De este trabajo se destaca que las mezclas de agroquímicos fueron más dañinas que los compuestos aislados, ya que generaron efectos más pronunciados en los grupos expuestos. Wei et al. (2014) evaluaron la toxicidad aguda de tres agroquímicos, entre ellos el clorantraniliprol en otra especie de anfibio. Estos autores reportaron un incremento en la mortalidad en larvas de *Hoplobatrachus chinensis* en función del aumento de las concentraciones de este insecticida. Además, constataron su efecto sinérgico con el acaricida-insecticida flubendiamida-abamectina. Por otra parte, Wei et al. (2022) evaluaron los efectos del clorantraniliprol y otros tres pesticidas sobre las larvas de *Fejervarya limnocharis* y *Microhyla fissipes*, y encontraron que las tasas de supervivencia y crecimiento disminuyeron en respuesta a la exposición a este insecticida. En cuanto al potencial efecto genotóxico del clorantraniliprol, Odetti et al. (2023) reportaron genotoxicidad y daño oxidativo en el ADN de *Caiman latirostris* expuestos a este pesticida. Finalmente, aunque no se encontraron trabajos que evalúen el efecto del clorantraniliprol sobre el comportamiento en vertebrados, Rodrigues et al. (2016) reportaron que la exposición a este insecticida afectó la alimentación y las actividades locomotoras de la planaria de agua dulce (*Dugesia subtentaculata*).

En cuanto al metoxifenozone, también se trata de un insecticida, perteneciente al grupo de las diacilhidracinas. Actúa como un agonista del receptor de ecdisona, regulando

el crecimiento de los insectos al generar una muda precoz (IRAC, 2024). Se desconocen trabajos que se centren en evaluar posibles efectos tóxicos del metoxifenozone sobre anfibios, sin embargo, estudios realizados en mamíferos indican que este insecticida tiene una toxicidad aguda baja en ratas (EFESA, 2017). Además, se especifica que la probabilidad de que la sustancia sea genotóxica es baja y que no se observó potencial de neurotoxicidad. No obstante, se destaca que el riesgo agudo y crónico para los organismos acuáticos es alto (EFESA, 2017). Nuestros resultados aportan nueva evidencia de los efectos tóxicos de los pesticidas acumulados en los sedimentos de cuerpos de agua en sitios agrícolas sobre los anfibios que se desarrollan en agroecosistemas.

6.1. Parámetros de las células sanguíneas (MN y ANE)

A partir de los resultados de este estudio se pudo confirmar el potencial genocitotóxico de los contaminantes asociados a los sedimentos provenientes del sitio frutícola, ya que se observó un aumento en la frecuencia de MN y ANE en los distintos tratamientos con respecto al control (con la única excepción de T2).

Los núcleos muescados (NN) fueron la aberración nuclear más frecuente, y se encontraron en todos los tratamientos con sedimentos del sitio bajo FHC en mayor frecuencia que en el control. Si bien el mecanismo que lleva a su formación es desconocido (Pollo et al., 2015), se asocian a citotoxicidad (Bolognesi et al., 2006), es decir, con efectos que inhiben la proliferación celular (Fenech et al., 2003). Tanto los núcleos ampollados (BbN) como los núcleos con forma de riñón (K), se encontraron en todos los tratamientos de sedimentos provenientes del sitio frutícola con mayor frecuencia que en el control. Se ha postulado que los núcleos ampollados tienen un origen similar a los micronúcleos y son considerados análogos genotóxicos de los mismos (Serrano-García & Montero-Montoya, 2001), mientras que los núcleos en forma de riñón se corresponderían a posibles precursores de la formación de micronúcleos o células binucleadas (Harabawy & Mosleh, 2014). Al igual que los núcleos muescados, se asocian a citotoxicidad (Bolognesi et al., 2006). En cuanto a los eritroplátidos, Barni et al. (2007) plantea que su aparición puede constituir un mecanismo para aumentar la eficiencia del transporte de oxígeno al mejorar la relación superficie/volumen celular, particularmente en aguas contaminadas, esto es consistente con lo encontrado en este trabajo, ya que la frecuencia de eritroplástidos fue significativamente mayor en los tratamientos donde las concentraciones de oxígeno disuelto fueron significativamente menores (T1 y T3). Por

último, se ha propuesto que los núcleos lobulados (LbN), al igual que los núcleos con brote (BN), podrían originarse durante el proceso de eliminación del material hereditario excesivo. El exceso de ADN se ubicaría en la periferia del núcleo donde sería posteriormente eliminado por un mecanismo de extrusión que daría lugar a un micronúcleo. Sin embargo, la interrupción de este proceso derivaría en la generación de núcleos lobulados o núcleos con brote (Ruiz de Arcaute et al., 2021).

Las altas frecuencias de MN y ANE en las larvas expuestas a sedimentos provenientes del sitio frutícola en comparación con el control, no solo actúan como señales de alerta temprana, sino que también pueden ser responsables de efectos adversos en niveles superiores de organización biológica. Los renacuajos que completan su desarrollo expuestos a contaminantes, son particularmente vulnerables a los efectos genotóxicos. Los xenobióticos pueden causar alteraciones en el material genético, como la modificación de estructuras nucleotídicas, que deriven en mutaciones, roturas de las hebras de ADN y/o el deterioro de la expresión génica. Lo que a su vez puede generar efectos indirectos al alterar enzimas y proteínas que forman parte de los procesos de transcripción del ARN o replicación del ADN (de Melo e Silva et al., 2024). La metamorfosis de los anfibios involucra intensos procesos de apoptosis, proliferación y diferenciación celular, por lo que eventuales errores que afecten el ADN durante el transcurso de su proceso metamórfico pueden propagarse a las células hijas, siendo capaces de dar lugar a malformaciones que posteriormente afecten su capacidad de reproducirse y sobrevivir (de Melo e Silva et al., 2024).

6.2. Alteraciones en el comportamiento

En cuanto a los resultados obtenidos para los biomarcadores comportamentales, no se observaron diferencias significativas en la velocidad de nado entre las larvas expuestas a sedimentos del sitio bajo FHC y las larvas del grupo control. Sin embargo, se observó una mayor frecuencia de natación anormal en T3 (sedimentos del tramo final de la Cañada). La mayor frecuencia de natación anormal sugiere un efecto neurotóxico (Tu et al., 2010), aunque se desconocen los mecanismos subyacentes. Un aumento en la frecuencia de nado irregular puede resultar en una mayor vulnerabilidad de los renacuajos frente a los depredadores (do Amaral et al., 2018), comprometiendo su capacidad de sobrevivir; y en una disminución en la alimentación, lo que a su vez genera efectos perjudiciales sobre el crecimiento y el desarrollo de los renacuajos (Bach et al., 2016).

Esos efectos cobran una importancia aún mayor considerando que la aptitud de los anfibios se ve en gran medida determinada en la etapa larvaria, en relación al tiempo en que completan su desarrollo y el tamaño que alcanzan en la metamorfosis (Smith, 1987). Por tanto, los efectos individuales sobre el comportamiento pueden repercutir en niveles superiores, ya que pueden influir en el reclutamiento de juveniles y generar cambios en la estructura poblacional local (Silva et al., 2020).

En síntesis, tal como se esperaba, los sedimentos extraídos de la Cañada del Dragón, inmersa en una zona bajo intensa producción de fruticultura de hoja caduca, acumularon pesticidas utilizados en el manejo de estas plantaciones (clorantraniliprol y metoxifenozone), que resultaron tóxicos para los renacuajos de *Boana pulchella*. Las larvas de esta especie que se desarrollaron expuestas a los sedimentos extraídos de la zona frutícola, presentaron una mayor frecuencia de daño genético (delatado por la mayor frecuencia de MN y ANE), evidenciando un efecto genotóxico y citotóxico de los insecticidas acumulados en los sedimentos. A su vez, algunos renacuajos vieron alterada su actividad natatoria, exhibiendo más tiempo nado anormal, evidenciando un posible efecto neurotóxico.

Con respecto a las variables fisicoquímicas del agua, aunque la exposición a altos niveles de conductividad constituye un factor de estrés para los anfibios (Chambers, 2011), *Boana pulchella* ha demostrado ser tolerante a un rango de entre 150 y 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Calderon et al., 2019), y la conductividad en los tratamientos fluctuaron entre valores de 250 y 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Por otro lado, los valores de pH en todos los tratamientos de mesocosmos se mantuvieron dentro de rango de 6.0 a 7.5, el cual no debería causar daño a la mayoría de los organismos acuáticos (Sparling, 2009). Por lo tanto, si bien la conductividad y el pH presentaron diferencias significativas entre tratamientos, estos parámetros no explicarían los efectos adversos observados en los renacuajos de *Boana pulchella*.

Contrario a lo esperado, no se observó una mayor concentración de los insecticidas detectados, clorantraniliprol y metoxifenozone, aguas debajo de la Cañada del Dragón. Esto podría deberse a que, si bien los sitios de extracción de los sedimentos se encuentran en una misma cuenca hidrográfica, esta atraviesa diferentes plantaciones frutícolas, por lo que existen variaciones en cuanto al manejo de las mismas, y en la cantidad y tiempos de aplicación de los diferentes pesticidas. Por lo tanto, las diferencias de los efectos

observados entre T2 y T3 no se deben a una mayor concentración de los pesticidas detectados en dichas zonas. Las diferencias entre T1 y los demás tratamientos podrían deberse a que en los sedimentos pertenecientes a este tratamiento no se detectó clorantraniliprol, por lo que, en principio, los efectos observados podrían atribuirse al metoxifenozone. No obstante, no es posible descartar que los efectos observados sobre los renacuajos de *Boana pulchella* se deban, en parte, a la presencia de otros contaminantes que puedan llegar a la cañada y que no fueron analizados en este trabajo. Existen muchos excipientes de formulados comerciales de agroquímicos que generalmente son desconocidos, que podrían estar presentes en el sitio, e incluso ser más tóxicos que los propios ingredientes activos (Lajmanovich et al., 2014; Pereira et al., 2009). Sumado a esto, en análisis realizados entre diciembre de 2021 y marzo de 2022, se detectó la presencia de diclorodifeniltricloroetano (DDT), y sus productos de degradación diclorodifenildicloroetileno (DDE) y diclorodifenildicloroetano (DDD) en los tramos inicial, medio y final de la Cañada del Dragón (Riero com. pers., datos no publicados). Si bien no se analizó su presencia y concentración en los sedimentos utilizados en este experimento, se trata de compuestos altamente persistentes (Turusov et al., 2002) y se ha reportado previamente que causan efectos nocivos sobre los anfibios, como mortalidad, anomalías morfológicas y comportamentales, disrupción endocrina, alteraciones en el comportamiento reproductivo y en la capacidad de búsqueda de alimento (Cooke, 1972; Hoffmann & Kloas, 2016; Saka, 2009; South et al., 2019). No es posible descartar que los efectos observados en los tratamientos con sedimentos provenientes de sitios frutícolas, se deban en parte a la presencia de estos contaminantes no evaluados, y al posible efecto sinérgico o antagónico que puedan estar generando su mezcla con los insecticidas detectados: clorantraniliprol y metoxifenozone. En sistemas complejos, es difícil establecer una relación directa de causa-efecto con elementos específicos, además de que las interacciones sinérgicas o antagónicas entre sustancias pueden conducir a efectos difícilmente predecibles (Gauthier et al., 2004).

7 - Conclusiones y perspectivas

En conclusión, se confirmó la persistencia de los insecticidas clorantraniliprol y metoxifenozone, en los sedimentos provenientes del sitio bajo FHC. Se pudo comprobar la toxicidad de estos sedimentos sobre larvas de *Boana pulchella* a distintos niveles de organización. En este sentido, la frecuencia de micronúcleos y otras aberraciones

nucleares, constatan el efecto genotóxico y citotóxico de los sedimentos contaminados, así como el aumento en la actividad anormal evidencia un posible efecto neurotóxico de los mismos. Es relevante destacar que, como se mencionó previamente, estos efectos pueden tener consecuencias a nivel poblacional, si interfieren con las tasas de supervivencia, desarrollo y crecimiento, y ecosistémico debido al rol central que poseen los anfibios en las comunidades.

Por otra parte, los biomarcadores comportamentales, al carecer de especificidad, son ventajosos para evaluar contaminantes cuyos mecanismos de acción se desconocen (Peltzer et al., 2024), como es el caso del clorantraniliprol y metoxifenozone. Aun así, en investigaciones posteriores, para dilucidar los mecanismos de acción de estos insecticidas se propone implementar abordajes que involucren la evaluación de parámetros morfológicos, como alteraciones a nivel de la aleta caudal (Silva et al., 2020), y enzimáticos, como la actividad de la acetilcolinesterasa (Peltzer et al., 2019), que pueden explicar la alteración del comportamiento de los renacuajos.

Una vez más, se constata la efectividad de *Boana pulchella* como organismo de prueba en investigaciones ecotoxicológicas (ej. Agostini et al., 2010; Riero et al., 2024; Sansiñena et al., 2018). En particular, se remarca su utilidad como bioindicador en investigaciones que se centren en evaluar posible toxicidad asociada a sedimentos, ya que al poseer larvas bentónicas (Santos, 2022), se desarrollan estrechamente asociadas a estos. El abordaje experimental utilizado fue adecuado para evaluar los efectos tóxicos de los contaminantes en contexto similar al del entorno natural. No obstante, la incapacidad de establecer relaciones causa-efecto, es una de las grandes limitantes de este abordaje experimental. Esta falta se vuelve más evidente cuando hay poca evidencia previa de los efectos de los insecticidas sobre los anfibios. Los trabajos que evalúan los efectos del insecticida clorantraniliprol sobre anfibios son escasos. Para el caso del metoxifenozone se carece de estudios que evalúen sus efectos tóxicos sobre los anfibios. En consecuencia, es recomendable llevar a cabo bioensayos de exposición aguda y crónica que permitan determinar parámetros toxicológicos relevantes para estos pesticidas - tales como la concentración letal media, las concentraciones sin efecto observado, y con efecto observado más baja y establecer relaciones causa-efecto mediante ensayos de toxicidad aguda y crónica (Peluso, 2021). Además, dado el posible efecto sinérgico entre ambos contaminantes y a que ya se ha reportado la capacidad del clorantraniliprol para interactuar con otras sustancias, potenciando su toxicidad (ej. Bitschinski et al., 2024), sería relevante realizar bioensayos de exposición a mezclas de ambos insecticidas.

Finalmente, se destaca la importancia de continuar estudiando la potencial toxicidad asociada a los sedimentos, ya que los contaminantes pueden acumularse en estos aun cuando sus concentraciones en el agua puedan ser indetectables (Arocena, 2016), generando efectos adversos en los organismos acuáticos. En base a esto, se recomienda enfáticamente monitorear la contaminación de sedimentos en sitios frutícolas y zonas aledañas, y elaborar planes de gestión que consideren la toxicidad asociada a sedimentos con el fin de proteger un grupo que actualmente enfrenta serios problemas de conservación como lo son los anfibios.

Referencias bibliográficas

- Achaval, F., & Olmos, A. (2007). *Anfibios y Reptiles del Uruguay* (3era ed.). Facultad de Ciencias, Serie Fauna N°1. Zonalibro.
- Acosta Nogueira, M. (2013). *Manejo integrado de cuencas: uso del suelo y repercusiones en la calidad del agua de la Cañada del Dragón en Montevideo rural*. [Tesis de maestría en Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República]. Repositorio Institucional Colibri <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/8190>
- Agostini, M. G., Natale, G. S., & Ronco, A. E. (2010). Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. *Ecotoxicology*, 19 (8), 1545–1550. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0539-3>
- Altieri, M. A., Nicholls, C. I., & Montalba, R. (2014). El papel de la biodiversidad en la agricultura campesina en América Latina. *LEISA revista de agroecología*, 30(1), 5–8.
- Amé, V., Cazenave, J., & Menone, M. (2021). Biomarcadores de Contaminación. En P. Carriquiriborde (Ed.), *Principios de Ecotoxicología* (pp. 291–308). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
- APHA. (1995). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. PHA/AWWA/WPCF. Washington. 1268p.
- Arocena, R. (2016). *Principios y métodos de limnología: ejemplos de Uruguay*. DIRAC.
- Ayres, M., Ayres, J. R. M., Ayres, D. L., & Santos, A. S. (2007). *BioEstat 5.0-aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas: Sociedade Civil Mamirauá, Belém*. Brasília: CNPq.
- Babini, M. S., Bionda, C. L., Martino, A. L., & Peltzer, P. M. (2024). Impacts of horticultural environments on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) populations: exploring genocytotoxic damage and demographic life history traits. *Environmental Science and Pollution Research International*. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-32471-2>
- Bach, N. C., Natale, G. S., Somoza, G. M., & Ronco, A. E. (2016). Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole frog, *Leptodactylus latrans*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(23), 23959–23971. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7631-z>
- Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, A., Bertone, V., Freitas, I., Fasola, M., & Fenoglio, C. (2007). Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology*, 81(1), 45–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.10.012>
- Barron, M. G. (2003). Bioaccumulation and Bioconcentration in Aquatic Organisms. En D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burton Jr., & J. Cairns Jr. (Eds.), *Handbook of ecotoxicology* (2nd ed., pp. 877–892). CRC Press, Lewis Publishers.
- Bentley, K. S., Fletcher, J. L., & Woodward, M. D. (2010). Chlorantraniliprole: An Insecticide of the Anthranilic Diamide Class. En R. Krieger (Ed.), *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (3rd ed., pp. 2231–2242). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00102-6>

- Benvindo-Souza, M., Oliveira, E. A. S., Assis, R. A., Santos, C. G. A., Borges, R. E., e Silva, D. D. M., & de Souza Santos, L. R. (2020). Micronucleus test in tadpole erythrocytes: Trends in studies and new paths. *Chemosphere*, 240, 124910.
- Bitschinski, D., Warsneski, A., Rutkoski, C. F., Gonçalves, G. H. P., Giasson, L. O. M., Hasckel, R. P., Israel, N. G., da Silva, E. B., de Albuquerque, C. A. C., Lã, L., Alves, T. C., de Campos Guerreiro, F., & de Almeida, E. A. (2024). Exposure to pesticides used in rice farming (bentazone, chlorantraniliprole and tebuconazole) affects biochemical biomarkers and hepatic histopathological parameters of hammertoad tadpoles (*Boana faber*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 283. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2024.109960>
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D. M., & Sciutto, A. (2006). Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology*, 78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.015>
- Boone, M. D., & James, S. M. (2005). Aquatic and terrestrial mesocosms in amphibian ecotoxicology. *Applied Herpetology*, 2, 231–257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1163/1570754054507442>
- Bosch, B., Mañas, F., Gorla, N., & Aiassa, D. (2011). Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 3(6), 155–163. <http://www.academicjournals.org/JTEHS>
- Bridges, C. M. (1997). Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 16(9), 1935–1939.
- Britson, C. A., & Threlkeld, S. T. (1998). Abundance, Metamorphosis, Developmental, and Behavioral Abnormalities in *Hyla chrysoscelis* Tadpoles Following Exposure to Three Agrichemicals and Methyl Mercury in Outdoor Mesocosms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61, 154–161.
- Brunelli, E., Bernabò, I., Berg, C., Lundstedt-Enkel, K., Bonacci, A., & Tripepi, S. (2009). Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicology*, 91(2), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.09.006>
- Burton Jr, G. A., Denton, D. L., Ho, K., & Ireland, D. S. (2003). Sediment toxicity testing: issues and methods. En D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burton Jr, & J. Cairns Jr (Eds.), *Handbook of ecotoxicology* (2nd ed., pp. 111–150). Lewis Publishers, CRC Press.
- Burton Jr, G. A., & Pitt, R. (2001). Stormwater effects handbook: A toolbox for watershed managers, scientists, and engineers. CRC Press.
- Cabagna, M. C., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., & Ale, E. (2006). Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 88(4), 729–737. <https://doi.org/10.1080/02772240600903805>
- Cabagna Zenklusen, M. C., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Peltzer, P., Junges, C. M., Fiorenza Biancucci, G., & Bassó, A. (2014). Generalidades sobre la hematología de anfibios anuros. *Museo Provincial de Ciencias Naturales “Florentino Ameghino”. Nueva Serie*, 18(1), 1–18.

- Calderon, M. R., Almeida, C. A., González, P., & Jofré, M. B. (2019). Influence of water quality and habitat conditions on amphibian community metrics in rivers affected by urban activity. *Urban Ecosystems*, 22(4), 743–755. <https://doi.org/10.1007/s11252-019-00862-w>
- Carreira, S., & Maneyro, R. (2015). *Lista roja de los anfibios y reptiles del Uruguay. Una evaluación del estado de conservación de la herpetofauna de Uruguay sobre la base de los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza*. MVOTMA, (Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente), DINAMA (Dirección Nacional de Medio Ambiente).
- Carriquiriborde, P. (2021). *Principios de Ecotoxicología*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
- Chambers, D. L. (2011). Increased Conductivity Affects Corticosterone Levels and Prey Consumption in Larval Amphibians. *Journal of Herpetology*, 45(2), 219–223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1670/09-211.1>
- Chandana, M., Lakshmi, C. J., & Rani, J. U. (2019). Biomarkers for Environmental Monitoring in Ecotoxicology. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9(2), 24–31.
- Cooke, A. S. (1972). The effects of DDT, dieldrin and 2,4-D on amphibian spawn and tadpoles. *Environmental Pollution*, 3(1), 51–68. [https://doi.org/10.1016/0013-9327\(72\)90017-1](https://doi.org/10.1016/0013-9327(72)90017-1)
- Croteau, M. C., Hogan, N., Gibson, J. C., Lean, D., & Trudeau, V. L. (2008). Toxicological Threats to Amphibians and Reptiles in Urban Environments. En J. C. Mitchell, R. E. Jung Brown, & B. Bartholomew (Eds.), *Urban Herpetology* (pp. 197–209). Society for the Study of Amphibians and Reptiles.
- David, M., Marigoudar, S. R., Patil, V. K., & Halappa, R. (2012). Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.04.009>
- de Melo e Silva, D. M., Vieira, T. Q., de Souza, M. B., de Queiroz Batista, F. R., Nunes, H. F., Morais, A. R., & Alves de Almeida, E. (2024). Genotoxicity and Mutagenicity in Anuran Amphibians. En E. Alves de Almeida & J. Silberschmidt Freitas (Eds.), *Toxicology of Amphibian Tadpoles* (pp. 133–151). CRC Press, Tylor & Francis Group.
- Denoël, M., D’Hooghe, B., Ficetola, G. F., Brasseur, C., De Pauw, E., Thomé, J. P., & Kestemont, P. (2012). Using sets of behavioral biomarkers to assess short-term effects of pesticide: A study case with endosulfan on frog tadpoles. *Ecotoxicology*, 21, 1240–1250. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0878-3>
- do Amaral, D. F., Montalvão, M. F., de Oliveira Mendes, B., da Silva Castro, A. L., & Malafaia, G. (2018). Behavioral and mutagenic biomarkers in tadpoles exposed to different abamectin concentrations. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 12932–12946. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1562-9>
- Egea-Serrano, A., & Tejedo, M. (2014). Contrasting effects of nitrogenous pollution on fitness and swimming performance of Iberian waterfrog, *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885), larvae in mesocosms and field enclosures. *Aquatic Toxicology*, 146, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.003>
- European Food Safety Authority (EFESA), Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Bellisai, G., Brancato, A., Brocca, D., Bura, L., Byers, H., Chiusolo, A., Court Marques, D., Crivellente, F., De Lentdecker, C., De Maglie, M., Egsmose, M., Erdos, Z., Fait, G., Ferreira, L., Goumenou, M., ...

- Villamar-Bouza, L. (2017). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance methoxyfenozide. *EFSA Journal*, 15(9). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4978>
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1–2), 81–95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)
- Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., & Zeiger, E. (2003). HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesisblock micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1–2), 65–75.
- Ferrer, M., Camussi, G., Fourment, M., Varela, V., Pereyra, G., Taks, J., Contreras, S., Cruz, G., Astigarraga, L., & Picasso, V. (2013). Sensibilidad y capacidad adaptativa de la viticultura y la fruticultura frente al cambio climático. *Clima de cambios: nuevos desafíos de adaptación en Uruguay*. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca & Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 6.
- Fojut, T. L., Vasquez, M. E., Poulsen, A. H., & Tjeerdema, R. S. (2013). Methods for deriving pesticide aquatic life criteria for sediments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 224, 97–175. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5882-1_4
- Gagneten, A. M., & Regaldo, L. (2021). Efectos sobre las comunidades biológicas. En P. Carriquiriborde (Ed.), *Principios de Ecotoxicología*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
- García, S. (1998). Enfermedades a hongos que deben ser consideradas prioritariamente dentro de un programa de manejo integrado. *Guía para el manejo de plagas y enfermedades en frutales*. Boletín de Divulgación 66, 49–90. INIA, Canelones.
- García-Muñoz, E., Guerrero, F., Gilbert, J. D., & Parra, G. (2010). Paradoja del enriquecimiento agrícola. *Iniciación a la Investigación*, 5.
- García-Muñoz, E., Guerrero, F., & Parra, G. (2011). Larval escape behavior in anuran amphibians as a wetland rapid pollution biomarker. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 44(2), 109–123. <https://doi.org/10.1080/10236244.2011.557855>
- Gauthier, L., Tardy, E., Mouchet, F., & Marty, J. (2004). Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. *Science of the total environment*, 323(1–3), 47–61. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.10.014>
- Gómez-Meda, B. C., Zamora-Perez, A. L., Luna-Aguirre, J., González-Rodríguez, A., Ramos-Ibarra, M. L., Torres-Bugarín, O., Batista-González, C., & Zúñiga-González, G. M. (2006). Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (*Aratinga canicularis*) related to genotoxic damage. *Avian Pathology*, 35(3), 206–210. <https://doi.org/10.1080/03079450600711003>
- Gosner, K. L. (1960). A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica*, 16, 183–190.
- Gristo, P., Urruti, P., & Salvarrey, A. (2002). *Guía para el muestreo de suelos en áreas residenciales*. Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente. Dirección Nacional de Medio Ambiente. DINAMA.
- Gupta, R. C. (2014). *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press.

- Halliday, T. R. (2008). Why amphibians are important. *International Zoo Yearbook*, 42(1), 7–14. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2007.00037.x>
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.
- Harabawy, A. S. A., & Mosleh, Y. Y. I. (2014). The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.02.015>
- Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Allen Burton Jr., G., & Cairns Jr, J. (2003). *Handbook of Ecotoxicology* (2nd ed.). Lewis Publishers, CRC press.
- Hoffmann, F., & Kloas, W. (2016). p,p'-Dichlordiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE) can elicit antiandrogenic and estrogenic modes of action in the amphibian *Xenopus laevis*. *Physiology & Behavior*, 167, 172–178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.09.012>
- Holt, E. A., & Miller, S. W. (2011). Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts. *Nature Education Knowledge*, 2(2), 8.
- Hopkins, W. A. (2007). *Amphibians as Models for Studying Environmental Change*. <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/48/3/270/664179>
- Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). (2024). *Insecticide Resistance Action Committee Mode of Action Classification*. <https://irac-online.org/mode-of-action/classification-online/> Acceso: 12 noviembre de 2024.
- International Atomic Energy Agency & Comisión Administradora del Mercado Modelo. (2011). Aplicación de un sistema integrado de diagnóstico, empleando diversos indicadores, para evaluar contaminación en Cañada del Dragón-Melilla-Montevideo. En *Implementación de un sistema de diagnóstico para evaluar el impacto de la contaminación por plaguicidas en los compartimientos de alimentos y ambientales a escala de captación en la Región de América Latina y el Caribe*. Proyecto Regional ARCAL 5/053. Montevideo, Uruguay.
- IUCN. (2024). *The IUCN Red List of Threatened Species Version. 2024-1*. 2024. <https://www.iucnredlist.org> Acceso: 15 de octubre de 2024.
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. (2023). Boana pulchella. *The IUCN Red List of Threatened Species 2023*: e.T88331595A101438630. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023>
- Josende, M. E., Tozetti, A. M., Alalan, M. T., Filho, V. M., Ximenez, S. D. S., & Martins, S. E. (2015). Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. *Ecological Indicators*, 49, 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.10.007>
- Junges, C. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Cabagna Zenklusen, M. C., & Basso, A. (2012). Toxicity of the fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish-tadpole interaction. *Chemosphere*, 87(11), 1348–1354. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.026>
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Junges, C. M., & Cabagna, M. C. (2011). Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione S-transferase inhibitors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(4), 681–689. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9578-2>
- 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 - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 769, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.04.009>
- Lajmanovich, R. C., Cuzziol Boccioni, A. P., Curi, L. M., Attademo, A. M., Martinuzzi, C., Bassó, A., Colussi, C., & Peltzer, P. M. (2021). Técnicas para el relevamiento de anfibios en ambientes contaminados. En L. Pereyra, E. Etchepare, & M. Vaira (Eds.), *Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de anfibios en Argentina* (pp. 326–347). Editorial de la Universidad Nacional de Jujuy. <http://anfibios-ecotox-conser.blogspot.com/>
- 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.
- Langone, J. A. (1994). *Ranas y Sapos del Uruguay (Reconocimiento y aspectos biológicos)*. Museo Damaso Antonio Larrañaga, N°5, Serie de Divulgación.
- Lema, E., Machunda, R., & Njau, K. N. (2014). Agrochemicals use in horticulture industry in Tanzania and their potential impact to water resources. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(2), 831. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v8i2.38>
- Linari Fuentes, G. (2018). *Diversificación en frutales de hoja caduca como estrategia para enfrentar el granizo: aportes desde la agroecología*. [Tesis de Maestría]. Facultad de Agronomía. Universidad de la República.
- Luedtke, J. A., Chanson, J., Neam, K., Hobin, L., Maciel, A. O., Catenazzi, A., Borzée, A., Hamidy, A., Aowphol, A., Jean, A., Sosa-Bartuano, Á., Fong G, A., de Silva, A., Fouquet, A., Angulo, A., Kidov, A. A., Muñoz Saravia, A., Diesmos, A. C., Tominaga, A., ... Stuart, S. N. (2023). Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. *Nature*, 622(7982), 308–314. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06578-4>
- Maneyro, R., & Carreira, S. (2012). *Guía de Anfibios del Uruguay*. Ediciones de la Fuga.
- Margolin, B. H., Collings, B. J., & Mason, J. M. (1983). Statistical analysis and sample-size determinations for mutagenicity experiments with binomial responses. *Environmental mutagenesis*, 5(5), 705–716.
- Markert, B., Wappelhorst, O., Weckert, V., Herpin, U., Siewers, U., Friese, K., & Breulmann, G. (1999). The use of bioindicators for monitoring the heavy-metal status of the environment. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 240, 425–429. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02349387>
- Martinez Puppi, L. H. (2022). *Efectos del glifosato: antecedentes en anfibios pampeanos y estudio de genotoxicidad en Boana pulchella (Anura: Hylidae)* [Tesina de Grado]. Facultad de Ciencias - Universidad de la República.
- Martino, D., Methol, M., Oleaga, A., Pirelli, H., Rodríguez, L., Vidal, L., Acosta, P., García Préchac, F., Gorfinkiel, D., & Kindgard, A. (2008). Cambios en el uso de la tierra. En *GEOUruguay - Informe del estado del ambiente*. (pp. 56–117). PNUMA, CLAES, DINAMA.
- Meintières, S., Biola, A., & Pallardy, M. (2001). Apoptosis can be a confusing factor in in vitro clastogenic assays. En *Mutagenesis* (Vol. 16, Número 3).
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Dirección General de la Granja. (2023). *Reporte Preliminar - Registro Nacional Frutihortícola*.

- Monteiro, M. I. C., Ferreira, F. N., De Oliveira, N. M. M., & Avila, A. K. (2003). Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. *Analytica Chimica Acta*, 477(1), 125–129.
- Nardo, D., Evia, G., Castiglioni, E., Egaña, E., Galletta, 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. *INNOTECH*, (10), 64-70.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.007>
- Newman, M. C. (2015). *FUNDAMENTALS OF ECOTOXICOLOGY: The Science of Pollution* (4th ed.). CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Núñez, S., Maeso, D., Conde, P., Duarte, F., Nuñez, P., Mieres, I., & Bruno, A. (2007). Evaluación del impacto ambiental de los plaguicidas en la producción hortifrutícola (Parte 1/Producción Frutícola). *Revista INIA*, 12, 17–22.
- Núñez, S., & Scatoni, I. (2013). Tecnología disponible para el manejo de plagas en frutales de hoja caduca. En *Serie Técnica N°210*. <http://www.inia.org.uy>
- Observatorio Ambiental Nacional. (2022). *Datos abiertos. Datos propios y de otras instituciones vinculadas a la gestión ambiental*. Ministerio de Ambiente. Montevideo, Uruguay. <https://www.ambiente.gub.uy/oan/datos-abiertos/> Acceso: 24 de noviembre de 2022.
- Odeti, L. M., Chacón, C. F., Siroski, P. A., Simoniello, M. F., & Poletta, G. L. (2023). Effects of glyphosate, 2,4-D, chlorantraniliprole, and imidacloprid formulations, separately and in mixtures in *Caiman latirostris* hatchlings. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 469. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116544>
- Peltzer, P. M., Cuzziol Boccioni, A. P., Attademo, A. M., Curi, L. M., Sandoval, M. T., Bassó, A., Martinuzzi, C. S., León, E. J., Lajmanovich, R. F., & Lajmanovich, R. C. (2024). Hierarchical Levels of Biomarkers in Amphibian Tadpoles Exposed to Contaminants: From Enzyme Disruptions to Etho-Toxicology Studies in Argentina. En E. Alves de Almeida & J. Silberschmidt Freitas (Eds.), *Toxicology of Amphibian Tadpoles*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., & Beltzer, A. H. (2006). Diversity of anurans across agricultural ponds in Argentina. *Biodiversity and Conservation*, 15, 3499–3513. <https://doi.org/10.1007/s10531-004-2940-9>
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., Repetti, M. R., Sigrist, M. E., & Beldoménico, H. (2013). Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.010>
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Martinuzzi, C., Attademo, A. M., Curi, L. M., & Sandoval, M. T. (2019). Biototoxicity of diclofenac on two larval amphibians: Assessment of development, growth, cardiac function and rhythm, behavior and antioxidant system. *Science of the Total Environment*, 683, 624–637. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.275>
- Peluso, L. (2021). Bioensayos de toxicidad. En P. Carriquiriborde (Ed.), *Principios de Ecotoxicología* (pp. 268–290). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.

- Pereira, G., Riero, M., Lajmanovich, R., & Maneyro, R. (2024). Acute toxicity and genotoxicity of the S-metolachlor-based herbicide Dual Gold® on *Leptodactylus luctator* (Hudson, 1892) tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *Limnetica*, 43(2), 1. <https://doi.org/10.23818/limn.43.19>
- Pereira, J. L., Antunes, S. C., Castro, B. B., Marques, C. R., Gonçalves, A. M. M., Gonçalves, F., & Pereira, R. (2009). Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology*, 18, 455–463. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10646-009-0300-y>
- Pérez-Iglesias, J. M., Natale, G. S., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2018). Are the damaging effects induced by the imazethapyr formulation Pivot® H in *Boana pulchella* (Anura) reversible upon ceasing exposure? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.009>
- Pesticide Action Network Internacional. (2021). *Lista de Plaguicidas Altamente Peligrosos de PAN Internacional*.
- Planes, E., & Fuchs, J. (2015). CUALES SON LOS APORTES DE LA ECOTOXICOLOGÍA A LAS REGULACIONES AMBIENTALES. *Ciencia e investigación*, 65(2), 45–62.
- Pollo, F. E., Bionda, C. L., Salinas, Z. A., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2015). Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environmental monitoring and assessment*, 187, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4802-1>
- Pollo, F. E., Grenat, P. R., Otero, M. A., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2016). Assessment *in situ* of genotoxicity in tadpoles and adults of frog *Hypsiboas cordobae* (Barrio 1965) inhabiting aquatic ecosystems associated to fluorite mine. *Ecotoxicology and environmental safety*, 133, 466–474. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.003>
- Quaranta, A., Bellantuono, V., Cassano, G., & Lippe, C. (2009). Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. *PLoS ONE*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007699>
- Riero, M., Pereira, G., Olsson, D., Lajmanovich, R., & Maneyro, R. (2024). Genotoxicity Of The Herbicide Picloram (TORDON ® 24K) on tadpoles of *Boana pulchella* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 40. <https://doi.org/10.20937/RICA.54984>
- Rodrigues, A. C. M., Henriques, J. F., Domingues, I., Golovko, O., Žlábek, V., Barata, C., Soares, A. M. V. M., & Pestana, J. L. T. (2016). Behavioural responses of freshwater planarians after short-term exposure to the insecticide chlorantraniliprole. *Aquatic Toxicology*, 170, 371–376.
- Ruiz de Arcaute, C., Laborde, M., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2021). Genotoxicidad y carcinogénesis. En P. Carriquiriborde (Ed.), *Principios de Ecotoxicología* (pp. 148–183). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
- Saka, M. (2009). Developmental toxicity of p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane, 2,4,6-trinitrotoluene, their metabolites, and benzo[a]pyrene in *Xenopus laevis* embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4), 1065–1073. <https://doi.org/10.1897/03-272>
- Sansíñena, J. A., Peluso, L., Salgado Costa, C., Demetrio, P. M., Mac Loughlin, T. M., Marino, D. J. G., Alcalde, L., & Natale, G. S. (2018). Evaluation of the toxicity of the sediments from an agroecosystem to two native species, *Hyalella curvispina* (CRUSTACEA: AMPHIPODA) and *Boana pulchella* (AMPHIBIA: ANURA), as potential environmental indicators. *Ecological Indicators*, 93, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.061>

- Santos, T. G. (2022). *Girinos do Pampa*. Base de dados eletrônica acessível em: <https://girinosdopampa.com>. Versão 1.0. Acesso: 7 de outubro de 2024.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(1), 9–15. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8)
- Semlitsch, R. D., & Boone, M. D. (2009). Aquatic mesocosms. En C. Kenneth Dodd Jr. (Ed.), *Amphibian Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques* (pp. 87–104). Oxford University Press Inc.
- Serrano-García, L., & Montero-Montoya, R. (2001). Micronuclei and Chromatid Buds Are the Result of Related Genotoxic Events. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38, 38–45.
- Silva, M. B. Da, Fraga, R. E., Silva, F. L., Oliveira, L. A. A. De, Queiroz, T. S. De, Rocha, M. A., & Juncá, F. A. (2020). Effects of acute exposure of chlorpyrifos on the survival, morphology and swimming ability of *Odontophrynus carvalhoi* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 15(1), 37–42. <https://doi.org/10.5132/eec.2020.01.05>
- Silva, F. L., Prado, I. S., Fraga, R. E., Rocha, M. A., Juncá, F. A., & Silva, M. B. Da. (2021). Swimming ability in tadpoles of *Physalaemus cf. cuvieri*, *Scinax x-signatus* and *Leptodactylus latrans* (amphibia: anura) exposed to the insecticide chlorpyrifos. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 16(1), 13–18. <https://doi.org/10.5132/eec.2021.01.02>
- Smith, D. C. (1987). Adult recruitment in chorus frogs: Effects of size and date at metamorphosis. *Ecology*, 68, 344–350.
- South, J., Botha, T. L., Wolmarans, N. J., Wepener, V., & Weyl, O. L. F. (2019). Assessing predator-prey interactions in a chemically altered aquatic environment: the effects of DDT on *Xenopus laevis* and *Culex* sp. larvae interactions and behaviour. *Ecotoxicology*, 28(7), 771–780. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02075-5>
- Soutullo, A., Ríos, M., Zaldúa, N., & Teixeira-De-Mello, F. (2020). Soybean expansion and the challenge of the coexistence of agribusiness with local production and conservation initiatives: Pesticides in a Ramsar site in Uruguay. *Environmental Conservation*, 47(2), 97–103. <https://doi.org/10.1017/S0376892920000089>
- Sparling, D. W. (2009). Water-quality criteria for amphibians. En C. Kenneth Dodd Jr (Ed.), *Amphibian Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques* (pp. 105–120). Oxford University Press Inc.
- Teixeira de Mello, F. (2007). *Efecto del uso del suelo sobre la calidad del agua y las comunidades de peces en sistemas lóticos de la cuenca baja del río Santa Lucía (Uruguay)*. [Tesis de maestría, Facultad de Ciencias, Universidad de la República]. Repositorio Institucional Colibrí <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/4085>
- Tu, H. T., Silvestre, F., Phuong, N. T., & Kestemont, P. (2010). Effects of pesticides and antibiotics on penaeid shrimp with special emphases on behavioral and biomarker responses. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 29(4), 929–938.
- Turusov, V., Rakitsky, V., & Tomatis, L. (2002). Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, Persistence, and Risks. *Environmental Health Perspectives*, 110(2), 125–128. <http://ehpnet1.niehs.nih.gov/docs/2002/110p125-128turusov/abstract.html>
- Udroiu, I. (2008). The micronucleus test for aquatic toxicology. En E. Svensson (Ed.), *Aquatic Toxicology Research Focus* (pp. 145–160). Nova Science Publishers, Inc.

- Unrine, J. M., Hopkins, W. A., Romanek, C. S., & Jackson, B. P. (2007). Bioaccumulation of trace elements in omnivorous amphibian larvae: implications for amphibian health and contaminant transport. *Environmental Pollution*, 149(2), 182–192.
- USEPA. (1996). Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS850.1800. Tadpole/sediment Subchronic Toxicity Test. EPA 712-C-96-132. Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances.
- USEPA. (1997). Volunteer Stream Monitoring: A Methods Manual. EPA 841-B-97-003. Office of Water 4503F, Washington, 227 pp. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/stream.pdf>.
- Venturino, A., Rosenbaum, E., Caballero De Castro, A., Anguiano, O. L., Gauna, L., Fonovich de Schroeder, T., & Pechen de D'Angelo, A. M. (2003). Biomarkers of effect in toads and frogs. En *Biomarkers* (Vol. 8, Número 4/3, pp. 167–186). <https://doi.org/10.1080/1354700031000120116>
- Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., & Peakall, D. B. (2012). *Principles of Ecotoxicology* (4th ed.). CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Wei, L., Shao, W. W., & Lin, Z. H. (2022). Effects of Four Individual Pesticides and their Pairwise Combinations on the Survival and Growth of the Tadpoles of Two Anuran Species. *Pakistan Journal of Zoology*, 54(2), 791–800. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/20181124041148>
- Wei, L., Shao, W.-W., Ding, G.-H., Fan, X.-L., Yu, M.-L., & Lin, Z.-H. (2014). Acute and joint toxicity of three agrochemicals to Chinese tiger frog (*Hoplobatrachus chinensis*) tadpoles. *Zoological Research*, 35(4), 272–279. <https://doi.org/10.13918/j.issn.2095-8137.2014.4.272>
- Wells, K. D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press.
- Williams, J. D., & Tettamanti, G. (2024). *Anfibios de Buenos Aires*. Ediciones LBN.
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical Analysis* (5th ed.). Prentice Hall.
- Zaracho, V. H., Céspedes, J. A., Álvarez, B. B., & Lavilla E. O. (2012). *Guía de campo para la identificación de los anfibios de la provincia de Corrientes (Argentina)*. Fundación Miguel Lillo, Publicación Especial.