

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

*Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas*



**Tesis para la obtención del grado académico de Doctora en Ciencias Biológicas**

**“EFECTOS DE CONTAMINANTES DE PREOCUPACIÓN EMERGENTE EN LA  
MORFOLOGÍA, HISTOLOGÍA Y COMPOSICIÓN DE LA  
MICROBIOTA INTESTINAL EN LARVAS DE ANFIBIOS ANUROS”**

**Lic. ANA PAULA CUZZIOL BOCCIONI**

**Directora: Dra. PAOLA PELTZER**

**Co-Director: Dr. GUILLERMO GARCÍA-EFFRON**

Lugar de realización: Laboratorio de Ecotoxicología- Escuela Superior de Sanidad-  
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas- Universidad Nacional del Litoral

**Año 2024**

***“Hasta el pelo más delgado  
deja su sombra en el suelo”***

*José Hernández*

*Aplicable tanto al accionar humano en la naturaleza,  
como a los aportes en la ciencia.*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi enorme agradecimiento a quienes han colaborado y me han permitido realizar este trabajo de tesis:

A la **Universidad Nacional del Litoral** y la **Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas** por brindarme la posibilidad de realizar esta carrera y la gran contribución que ha significado en mi formación. A la **Secretaría de Posgrado** de la institución por su predisposición y acompañamiento durante toda la carrera.

Al **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas**, por otorgarme la beca que posibilitó la realización de este doctorado.

A mis **directores**, *Dra. Paola Peltzer* y *Dr. Rafael Lajmanovich*, por la confianza, apoyo y constante acompañamiento, por trasmitirme tanto conocimiento como vocación, por abrirme las puertas del **Laboratorio de Ecotoxicología** y permitirme formar parte de sus proyectos, desarrollarme profesionalmente, y hacerme sentir en casa.

A mi **co-director**, *Dr. Guillermo García-Effron* por su predisposición y acompañamiento al adentrarme en el mundo microbiológico. Extiendo el profundo agradecimiento a todo el equipo del **Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular**, por su paciencia, atención y amabilidad al recibirme en su espacio para desarrollar parte de esta tesis.

A mis **compañeros del laboratorio** de Ecotoxicología: *Candela* y *Carlina*, por su apoyo, enseñanzas y compañerismo, convertidos en una linda amistad; *Maxi*, *Agustín*, y *Evelina* por los momentos compartidos y hacer que todo sea más ameno. Mi enorme agradecimiento al *Dr. Maximiliano Attademo* por su gran contribución al análisis bioquímico.

A mi **familia**, *mamá*, *papá* y *Facu*, gracias por enseñarme de valores y de esfuerzos, por ser ejemplo y pilares. Gracias por su aliento y apoyo durante cada etapa académica, y también de vida. Valoro las alas que me han dado mis padres para alcanzar cada ideal, pero sobretodo, que me hayan enseñado a volar. Gracias por confiar en mí y estar presentes a pesar de la distancia.

A mi **pareja**, *Eric*, por acompañar mi camino y hacerlo más llevadero, por compartir la pasión por la naturaleza y aprender juntos; gracias por creer en mí y ser mi sostén incondicional.

Y a los **jurados** de esta tesis, *Dr. Pablo Collins*, *Dra. Delia Aiassa* y *Dr. Fabricio Cid*, por su tiempo y dedicación para la lectura objetiva y los aportes constructivos a mejorar la calidad del trabajo.

## APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS

Los resultados de esta tesis doctoral dieron lugar a las siguientes **publicaciones científicas** en revistas internacionales con referato:

1. **Cuzziol Boccioni, A. P.**, García-Effron, G., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C. (2023). Effect of glyphosate and ciprofloxacin exposure on enteric bacteria of tadpoles. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(2), 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.08.004>
2. **Cuzziol Boccioni, A. P.**, Lener, G., Peluso, J., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Aronzon, C., Lajmanovich, R. C. (2022). Comparative assessment of individual and mixture chronic toxicity of glyphosate and glufosinate ammonium on amphibian tadpoles: A multibiomarker approach. *Chemosphere*, 309, 136554. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136554>
3. Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Lener, G., **Cuzziol Boccioni, A. P.**, Peltzer, P. M., Martinuzzi, C. S., Repetti, M. R. (2022). Glyphosate and glufosinate ammonium, herbicides commonly used on genetically modified crops, and their interaction with microplastics: Ecotoxicity in anuran tadpoles. *Science of Total Environment*, 804, 150177. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150177>
4. **Cuzziol Boccioni, A. P.**, Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Martinuzzi, C. S. (2021). Toxicity assessment at different experimental scenarios with glyphosate, chlorpyrifos and antibiotics in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Chemosphere*, 273, 128475. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128475>
5. **Cuzziol Boccioni, A. P.**, Peltzer, P. M., Martinuzzi, C. S., Attademo, A. M., León, E. J., Lajmanovich, R. C. (2020). Morphological and histological abnormalities of the neotropical toad, *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) larvae exposed to dexamethasone. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 56(1), 41-53. <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1832410>

Además, los conocimientos adquiridos y generados durante el desarrollo de esta tesis han contribuido para la elaboración de los siguientes **capítulos de libro**:

1. Peltzer, P. M., **Cuzziol Boccioni, A. P.**, Attademo, A. M., Curi, L. M., Sandoval, M. T., Bassó, A., Lajmanovich, R. C. (2024). Hierarchical Levels of Biomarkers in Amphibian Tadpoles Exposed to Contaminants From Enzyme Disruptions to Etho-



- Toxicology Studies in Argentina. En: *Toxicology of Amphibian Tadpoles* (pp. 63-77). CRC Press. ISBN: 9781003091394. <https://doi.org/10.1201/9781003091394-4>
2. Peltzer, P. M., **Cuzziol Boccioni, A. P.**, Martinuzzi, C. S., Bassó, A., Attademo, A. M., Culzoni, M. J., Paradina-Fernandez, L., Lajmanovich, R. C. (2023). Chapter 5: Ecotoxicity and Risk Assessment Characterization of Veterinary Pharmaceuticals on Anuran Amphibian Larvae. En: Larramendy, M. L., & Liwzyc, G. E. (Eds.), *Amphibian Species in Environmental Risk Assessment Strategies* (pp. 81-101). The Royal Society Chemistry. ISBN: 978-1-83767-201-1. <https://doi.org/10.1039/9781837672004>
  3. Lajmanovich, R. C., Peltzer, P., M., **Cuzziol Boccioni, A. P.**, Attademo, A. M. (2021). El ecocidio de los anfibios y sus territorios. En: Palau, M (Ed.), *Con la soja al cuello 2021 Informe sobre Agronegocios en Paraguay* (pp. 104-109). BASE-IS, Asunción, ISBN: 978-99925-223-4-9
  4. Lajmanovich, R. C., **Cuzziol Boccioni, A. P.**, Curi, L. M., Attademo, A. M., Martinuzzi, C. S., Bassó, A., Peltzer, P. M. (2021). Técnicas para el relevamiento de anfibios en ambientes contaminados. En: Pereyra, L., Etchepare, E., Vaira, M. (Eds.), *Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de anfibios de Argentina Parte I* (pp. 326-347). Ediunju Editorial, San Salvador de Jujuy, ISBN: 978-959-721-587-2
  5. Peltzer, P. M., Curi, L. M., Attademo, A. M., **Cuzziol Boccioni, A. P.**, Lajmanovich, R. C. (2021). Registro de anormalidades macroscópicas y microscópicas en adultos y larvas de anfibios anuros. En: Pereyra, L., Etchepare, E., Vaira, M. (Eds.), *Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de anfibios de Argentina Parte I* (pp. 253-268). Ediunju Editorial, San Salvador de Jujuy. ISBN: 978-959-721-587-2

**ÍNDICE**

<b>ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	16
1.1. El sistema agro-ganadero argentino.....	17
1.2. El impacto de las matrices agroindustriales sobre la biodiversidad .....	22
1.3. Los anfibios anuros como bioindicadores.....	25
1.4. El uso de biomarcadores en estudios ecotoxicológicos.....	28
1.5. Objetivos e hipótesis .....	35
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	37
2.1. Especie en estudio.....	38
2.2. Contaminantes.....	41
2.3. Diseño experimental: Bioensayos.....	43
2.3.1. Bioensayo con herbicidas.....	44
2.3.2. Bioensayo con herbicida, insecticida y medicamentos.....	45
2.3.2.1. Primera etapa de exposición: herbicida y antibiótico.....	46
2.3.2.2. Segunda etapa de exposición: herbicida, insecticida y antibióticos.....	49
2.4. Selección de biomarcadores.....	49
2.4.1. Biomarcadores Bioquímicos .....	49
2.4.2. Biomarcadores Histológicos.....	50
2.4.3. Biomarcadores Morfológicos.....	53
2.4.4. Biomarcadores Bacteriológicos.....	53
2.4.3.1. Análisis de diversidad bacteriana intestinal.....	53
2.4.3.2. Análisis de sensibilidad bacteriana intestinal.....	57

2.5. Estadística y análisis numéricos.....	59
2.5.1. Análisis estadísticos de los biomarcadores. ....	59
2.5.2. Análisis integral de los biomarcadores. ....	60
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
3. 1. Bioensayo con herbicidas .....	63
3.1.1. Análisis bioquímico.....	63
3.1.2. Análisis histológico.....	64
3.1.3. Análisis morfológico.....	67
3.1.4. Análisis bacteriológico.....	69
3.1.5. Análisis integral de biomarcadores.....	71
3. 2. Bioensayo con herbicida, insecticida y antibióticos.....	73
3.2.1. Análisis bioquímico.....	73
3.2.2. Análisis histológico.....	75
3.2.3. Análisis morfológico .....	77
3.2.4. Análisis bacteriológico.....	80
3.2.4.1. Diversidad bacteriana intestinal.....	80
3.2.4.2. Análisis de sensibilidad bacteriana.....	83
3.2.5. Análisis integral de los biomarcadores.....	85
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>88</b>
4.1. Bioensayo con herbicidas .....	90
4.1.1. Análisis bioquímico.....	90
4.1.2. Análisis histológico.....	92
4.1.3. Análisis morfológico.....	94
4.1.4. Análisis bacteriológico.....	95
4.2. Bioensayo con herbicida, insecticida y antibióticos.....	97

4.2.1. Análisis bioquímico.....	97
4.2.2. Análisis histológico.....	102
4.2.3. Análisis morfológico.....	103
4.2.4. Análisis bacteriológico.....	104
4.3. Integración y vinculación de los resultados .....	110
4.3.1. Análisis integral de tratamientos y biomarcadores .....	110
4.3.1. Interacción de las mezclas.....	112
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>120</b>
<b>BIGLIOGRAFÍA.....</b>	<b>124</b>

## ABREVIATURAS

AChE: acetilcolinesterasa

AD: agua declorinada de red

AMX: amoxicilina

CIM: concentración inhibitoria mínima

CIP: ciprofloxacina

CO: control

CP: Clorpirifós

CPE: contaminante/s de preocupación emergente

EG: estadio de Gosner

GA: glufosinato de amonio

GLI: glifosato

IBR: Índice de respuesta biológica integrada

II: Índice de interacción

HBGLI: herbicida/s a base de glifosato

HBGA: herbicida/s a base de glufosinato de amonio

GST: glutatión S-transferasa

MM: melanomacrófagos

PCA: Análisis de componentes principales

T4: tiroxina

%AH: porcentaje del área hepática

## RESUMEN

Los contaminantes ambientales han incrementado su concentración y biodisponibilidad en diferentes ecosistemas acuáticos debido de la contaminación puntual o difusa de efluentes urbanos, escorrentía de suelos agrícolas, aplicación extensiva de fármacos veterinarios, y plaguicidas entre otros. La constante introducción de estos contaminantes a las matrices ambientales se traduce en exposiciones crónicas de los organismos acuáticos como los anfibios. El estudio de estos vertebrados resulta clave para la comprensión del efecto del deterioro de los sistemas acuáticos por varias razones. Los anfibios son componentes esenciales de los ecosistemas y están experimentando extensas pérdidas y sin precedentes en sus poblaciones. Además, por sus características biológicas son considerados organismos modelo para estudios transversales que permiten comprender mecanismos de desarrollo en vertebrados, como también excelentes bioindicadores de la salud de los ecosistemas por su sensibilidad a las condiciones ambientales adversas.

Por lo antes expuesto, el objetivo general de esta tesis fue evaluar la toxicidad de distintos contaminantes de preocupación emergente (CPE, principalmente fármacos de uso veterinario y plaguicidas) sobre biomarcadores bioquímicos, histológicos, morfológicos, y de funcionalidad ecológica en larvas de anuros. También se establecieron los siguientes objetivos específicos: 1) Describir las respuestas morfológicas de las larvas frente a la exposición de CPE, principalmente mediante productos farmacéuticos de uso veterinario y herbicidas. 2) Analizar la respuesta hepática a los contaminantes a través del estudio histológico de melanomacrófagos. 3) Comprobar si la exposición de las larvas a CPE altera la interacción ecológica de la microbiota bacteriana intestinal normal, y 4) Evaluar si ocurre variación en la sensibilidad de las bacterias del tubo digestivo de las larvas ante la exposición a contaminantes.

En el desarrollo de esta tesis doctoral se llevaron a cabo bioensayos crónicos con larvas del sapo común, *Rhinella arenarum*, expuestos a algunos de los contaminantes más frecuentes en los sistemas acuáticos con presión agrícola-ganadera. El primer bioensayo evaluó el efecto individual y mezcla 50:50 % de dos de los herbicidas más utilizados en el glifosato y glufosinato de amonio, mientras que el segundo bioensayo incluyó un primer escenario de contaminación donde se evaluó el efecto individual y mezcla de el herbicida glifosato y el antibiótico de uso humano y veterinario, ciprofloxacina, sobre la primera etapa de desarrollo de las larvas. El segundo escenario incluyó la evaluación de tratamientos adicionales a los del primer ensayo en larvas pre y prometamórficas, con mezclas binarias del herbicida glifosato con el insectida clorpirfós y del antibiótico ciprofloxacina con otro de uso frecuente, amoxicilina, además de una mezcla cuaternaria de los cuatro contaminantes para simular los escenarios complejos que atraviesan las matrices ambientales. Para ambos bioensayos se analizaron distintos biomarcadores, parámetros biológicos de distintos procesos y componentes a distinta escala de

las larvas que permiten comprender de manera más exhaustiva e integral, el efecto tóxico los CPE sobre la salud de los organismos. En orden jerárquico de organización, los biomarcadores incluyeron parámetros bioquímicos como niveles de hormona tiroidea tiroxina (T4), y de actividad enzimática de Acetilcolinesterasa (AChE), relacionada a la neurotoxicidad, y de Glutación-S-transferasa, asociada a la detoxificación y los procesos oxidativos; también se analizaron biomarcadores histológicos tanto a nivel general de la configuración corporal general interna de las larvas, y específicamente parámetros a nivel del hígado como órgano detoxificador relacionados con los melanomacrófagos; a nivel morfológico, se evaluó la tasa de crecimiento y desarrollo, además de la presencia de malformaciones; por último, se estudiaron las comunidades bacterianas de la microbiota intestinal en cuanto a la diversidad de géneros y dominancia, además del análisis de la sensibilidad de las bacterias aisladas a los contaminantes en exposición.

Los resultados de ambos ensayos evidenciaron diferencias importantes en cuanto al tipo de respuesta de las larvas de *R. arenarum* a cada contaminante, individualmente y en mezclas, destacando la importancia de considerar los efectos conjuntos que pueden presentar los compuestos en los sistemas reales. En el primer ensayo con herbicidas, la exposición crónica al herbicida a base de glifosato mostró una marcada respuesta del biomarcador bioquímico AChE, como así también un aumento en los estadios de desarrollo y de diversidad de géneros bacterianos. Por su parte, la exposición al herbicida a base de glufosinato de amonio también mostró importantes efectos sobre biomarcadores a de los mismos niveles de organización, aunque diferentes al glifosato, ya que incluyeron aumento en la tasa de malformaciones y dominancia bacteriana. La exposición a la mezcla de ambos herbicidas también afectó a la tasa de desarrollo y dominancia bacteriana, pero se diferenció de los tratamientos por una marcada respuesta a nivel histológico sobre el tamaño de los melanomacrófagos hepáticos.

En el segundo ensayo, la exposición crónica al herbicida a base de glifosato se destacó por una marcada respuesta de biomarcadores a nivel macroscópico en cuanto a la presencia de malformaciones, y a nivel de la microbiota bacteriana intestinal por un sorpresivo aumento en la diversidad de géneros bacterianos. Por su parte, el tratamiento con ciprofloxacina mostró importantes efectos disbióticos por la dominancia bacteriana, también a nivel histológico sobre el aumento de melanomacrófagos hepáticos y sobre las tasas de desarrollo a nivel morfológico. La mezcla de ambos contaminantes afectó a biomarcadores con respuesta en los tratamientos individuales, aún más marcadamente en cuanto al incremento de melanomacrófagos y disminución del estadio de desarrollo y diversidad bacteriana. Este tratamiento se diferenció del resto de los tratamientos por una marcada respuesta a nivel bioquímico sobre los niveles de T4. El análisis del segundo escenario de contaminación, mostró que las mezclas binarias de plaguicidas y las de antibióticos, así como la mezcla cuaternaria de todos los contaminantes

evaluados disminuyeron los niveles de hormonas tiroideas y de AChE, mientras que los tratamientos individuales no mostraron diferencias significativas respecto a los parámetros normales. El efecto potenciador de las mezclas fue aún más evidente en la actividad de la GST, que solamente fue inhibida por la mezcla cuaternaria.

En este estudio permitió abordar la toxicidad de CPE frecuentes de los sistemas acuáticos locales en larvas de anfibios a través de la integración de múltiples biomarcadores. Las alteraciones de estos parámetros en distintas etapas del desarrollo de los anuros revelan la implicancia que tiene la exposición crónica de estos contaminantes en el ambiente en la salud de los individuos, vulnerables a estos estresores a lo largo de su vida desde distintos aspectos biológicos. Asimismo, la evaluación de exposiciones tanto individuales como mezclas demostró la necesidad no sólo de contemplar el efecto de cada contaminante, sino también su efecto conjunto para la estimación del riesgo ecotoxicológico y ambiental. Estos resultados representan puntos esenciales para proporcionar información precisa sobre diferentes aspectos de la ecotoxicología, así como del manejo y regulación de los productos que se llegan a las matrices ambientales. En este sentido, se destaca la importancia de que las evaluaciones de riesgo ambiental consideren el análisis de múltiples biomarcadores y la exposición crónica a lo largo del desarrollo de anuros, ya que demuestran un potencial predictivo significativo sobre la salud del ecosistema. Finalmente, se resalta la necesidad de ahondar en estudios sobre mezclas complejas que apunten a decernir las interacciones específicas sobre los CPE que coexisten en las matrices ambientales y los mecanismos relacionados con los efectos toxicológicos de estas mezclas, y cómo estos diferentes químicos pueden interactuar y cambiar la disponibilidad mutua en el agua. El conocimiento sobre la interacción de contaminantes en mezclas y sobre su efecto combinado es esencial aproximarse a la situación real que atraviesan los organismos en ambientes contaminados.



## ABSTRACT

Pollutants have increased their concentration and bioavailability in different aquatic ecosystems through punctual or diffuse pollution of urban effluents, runoff from agricultural soils, extensive application of veterinary drugs, and pesticides, among others. The continuous introduction of these contaminants to environmental matrices results in chronic exposures of aquatic organisms such as amphibians. The study of these animals is key to understanding the effect of the collapse of aquatic systems for several reasons. Amphibians are essential components of ecosystems and are experiencing widespread and unprecedented losses in biodiversity. Furthermore, their biological characteristics make them not only good model organisms for cross-sectional studies to understand mechanisms shared with other vertebrates, but also excellent bioindicators of ecosystem health due to their sensitivity to adverse environmental conditions.

This thesis aimed to evaluate the toxicity of different contaminants of emerging concern (mainly veterinary drugs and plaguicides) on biochemical, histological, morphological, and ecological functionality biomarkers in anuran larvae. The specific objectives of this study were to: 1) describe the morphological responses of tadpoles to exposure to emerging contaminants, mainly through pharmaceutical products for veterinary use and herbicides; 2) analyze the liver response to contaminants through the histological study of melanomacrophages; 3) evaluate if the exposure of tadpoles to emerging contaminants alters the ecological interaction of the normal intestinal bacterial microbiota; and 4) evaluate the sensitivity of the microorganisms of the digestive tract of the tadpoles exposed to contaminants.

In the development of this doctoral thesis, chronic bioassays were carried out with larvae of the common toad, *Rhinella arenarum*, exposed to some of the most frequent contaminants in aquatic systems with agricultural-livestock pressure. The first bioassay evaluated the individual and combined effects of two of the most used herbicides, glyphosate and glufosinate ammonium. The second bioassay included a first contamination scenario where the individual and mixture effect of the herbicide glyphosate and the antibiotic ciprofloxacin, on the first stage of larval development. The second scenario included the evaluation of additional treatments to those of the first scenario in pre- and prometamorphic larvae, with binary mixtures of the herbicide glyphosate with the insecticide chlorpyrifos, and the antibiotic ciprofloxacin with another frequently used antibiotic, amoxicillin, in addition to a quaternary mixture of the four pollutants to simulate the complex scenarios of environmental matrices. For both bioassays, different biological parameters of different processes and components at different scales of the larvae were analyzed that allow a more exhaustive and broad understanding of the toxic effect of contaminants on the health of the organisms. In hierarchical order of organization, the

biomarkers included biochemical parameters such as levels of the thyroid hormone thyroxine (T4), and enzymatic activity of Acetylcholinesterase (AChE), related to neurotoxicity, and Glutathione-S-transferase (GST), linked with detoxification and oxidative processes. Histological biomarkers were also analyzed both at the general level of the general internal body configuration of the larvae, and specifically parameters at the level of the liver as a detoxifying organ related to melanomacrophages. At morphological level, the growth and development rate were evaluated, in addition to the presence of malformations. The bacterial communities of the intestinal microbiota were studied in terms of gender diversity and dominance, and analysis of the sensitivity of the isolated bacteria to the contaminants.

The results of both bioassays showed important differences in the type of response of *R. arenarum* larvae to each contaminant, individually and in mixtures, highlighting the importance of considering the joint effects that the compounds may present in real systems. In the first herbicides bioassay, chronic exposure to the glyphosate-based herbicide showed a marked response of the biochemical biomarker AChE, as well as an increase in developmental stages and diversity of bacterial genera of the gut microbiota. In contrast, exposure to the glufosinate ammonium-based herbicide also showed important effects on biomarkers at the same levels of organization including increase of malformations rates and bacterial dominance. Exposure to the mixture of both herbicides also affected the rate of bacterial development and dominance. However, the exposures have been differentiated from the individual treatments by a marked response at the histological level on the size of hepatic melanomacrophages.

In the second bioassay, chronic exposure to the glyphosate-based herbicide showed significant malformations and alterations of the intestinal bacterial microbiota by an unexpected increase in the diversity of bacterial genera. On the other hand, ciprofloxacin treatment showed important dysbiotic effects due to bacterial dominance, increase in hepatic melanomacrophages and development rates. The mixture of both contaminants affected biomarkers with response in the individual treatments, even more markedly in terms of the increase in melanomacrophages and a decrease in the stage of development and bacterial diversity. This treatment differentiated from the rest of the treatments by a marked biochemical response on T4 levels. The analysis of the second contamination scenario showed that the binary mixtures of pesticides and antibiotics, as well as the quaternary mixture of all the contaminants evaluated, decreased the levels of thyroid hormones and AChE, while the individual treatments did not show significant differences regarding to normal parameters. The enhancing effect of the mixtures was even more evident in the activity of GST, which was only inhibited by the quaternary mixture.

This study allowed to evaluate the toxicity of frequent contaminants of local aquatic systems in amphibian larvae through the integration of multiple biomarkers. The alterations of

these parameters at different stages of anuran development show the implication that chronic exposure to these pollutants in the environment has on the health of individuals, susceptible to these stressors throughout their lives from different biological sublethal endpoints. Likewise, the evaluation of both individual and mixture exposures demonstrated the need to consider not only the effect of each contaminant, but also their joint effect for the estimation of ecotoxicological and environmental risk. These results represent essential points to provide precise information on different aspects of ecotoxicology, as well as the management and regulation of products that reach environmental matrices. In this sense, the importance of environmental risk assessments considering the analysis of multiple biomarkers and chronic exposure throughout anuran development is highlighted, as they demonstrate significant predictive potential for ecosystem health. Finally, the need to delve into studies on complex mixtures that aim to determine the specific interactions of the contaminants that coexist in environmental matrices and the mechanisms related to the toxicological effects of these mixtures, and how these different chemicals can interact and change, is highlighted. mutual availability in the water. Knowledge about the interaction of contaminants in mixtures and their combined effect is essential to get closer to the real situation that organisms go through in contaminated environments.

# 1. INTRODUCCIÓN



**1.1. El sistema agro-ganadero argentino**

**1.2. El impacto de las matrices agroindustriales sobre la biodiversidad**

**1.3. Los anfibios anuros como bioindicadores**

**1.4. El uso de biomarcadores en estudios ecotoxicológicos**

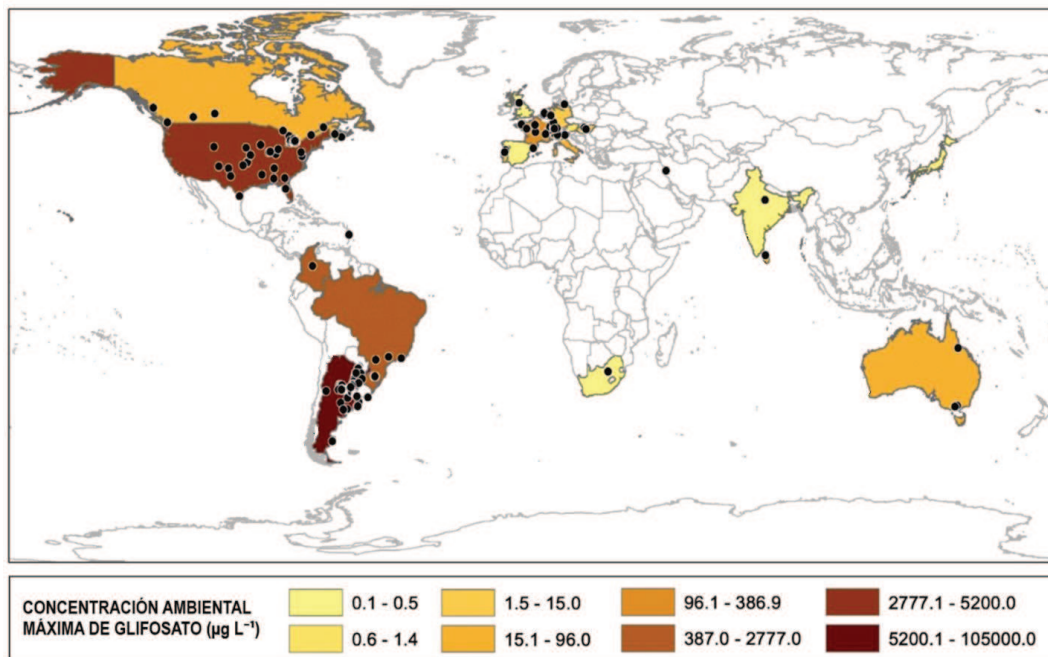
**1.5. Objetivos e hipótesis**

## 1. 1. El sistema agro-ganadero argentino

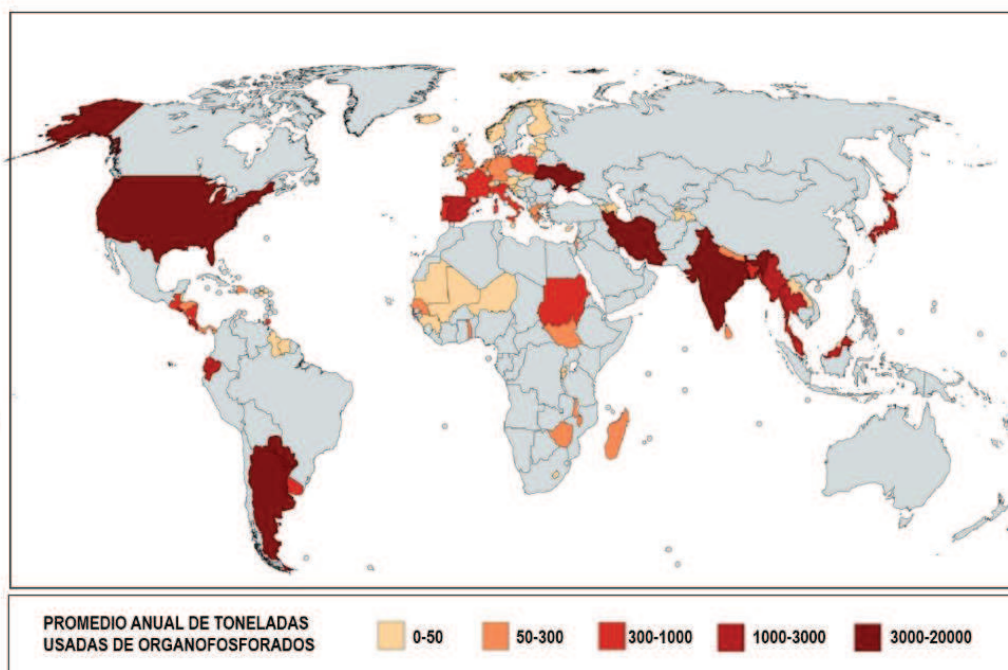
Argentina posee una vasta diversidad de características topográficas, climatológicas y gran cantidad de recursos naturales que hacen que un tercio de su superficie sea apta para cultivos y otro tanto para la ganadería (Di Paola, 2005). La agroindustria es una de las actividades más extendidas en país, representando el 25% de la industria manufacturera y el 40% de las exportaciones. El sistema agroindustrial ha tenido una gran expansión e intensificación en las últimas décadas (Graesser *et al.*, 2018; Paruelo & Sierra, 2023). Este crecimiento está dado en gran medida por la incorporación de los paquetes tecnológicos que favorecen la aplicación de agroquímicos como plaguicidas y fertilizantes en cultivos transgénicos (Lajmanovich *et al.*, 2012). Dado que las plagas pueden generar hasta un 40% de pérdida de los cultivos alimentarios (FAO- Producción y protección vegetal, n.d.), el uso de plaguicidas pretende incrementar el rendimiento de la producción. Además, la intensificación del uso de agroquímicos conlleva, en muchos casos, a la adquisición de resistencia en los organismos blancos y consecuentemente, al aumento de aplicación de dichos productos en términos de dosis o frecuencia (Coalova *et al.*, 2013).

Argentina es el tercer país del mundo con mayores cantidades de cultivos transgénicos, luego de Estados Unidos y Brasil. Según la base de datos ArgenBio (2024), actualmente existen 76 eventos transgénicos aprobados, principalmente para maíz, soja y algodón, y en menor medida para trigo, papa, alfalfa y cártamo. El agroquímico más utilizado desde el primer evento transgénico en la soja en 1996 es el glifosato (GLI), un herbicida de amplio espectro desarrollado para eliminación de hierbas y arbustos. A pesar de que Argentina no cuenta con estadísticas oficiales sobre el uso de agroquímicos, lidera el récord mundial de concentraciones de GLI medidas en agua dulce ( $105 \text{ mg L}^{-1}$ , Sasal *et al.*, 2017; Brovini *et al.*, 2021, **Figura 1**). Además, el glufosinato de amonio (GA) es otro herbicida de amplio espectro clave para el manejo de malezas resistentes al GLI, cuyo uso continúa aumentando indiscriminadamente (Scursoni *et al.*, 2019).

Actualmente, más del 60% de los eventos existentes en el país incluyen tolerancia a GLI, GA o a ambos. En los cultivos de las regiones agrícolas tradicionales de Argentina y a nivel mundial, los herbicidas se utilizan simultáneamente con insecticidas (Pérez *et al.*, 2021). Entre los insecticidas más conocidos, los organofosforados han sido utilizados globalmente para el manejo de las plagas en los últimos 50 años (**Figura 2**, Saborío *et al.*, 2019). Entre estos plaguicidas conocidos por su gran toxicidad, lenta degradación y bioacumulación se destaca el clorpirifos (CP), que comúnmente se rocía a altas dosis (Casabé *et al.*, 2007) y es relativamente persistente en aguas superficiales (Palma *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Mapa modificado de la revisión de Brovini *et al.* (2021), que muestra las concentraciones máximas de glifosato (GLI) registradas en distintos estudios de sistemas de agua dulce de todo el mundo. Los puntos negros indican los sitios de estudio.



**Figura 2.** Mapa adaptado de la revisión de Hertz-Picciotto *et al.* (2018), que muestra el promedio anual (del período comprendido entre 2010-2015) de toneladas de insecticidas organofosforados usados por país, sobre la base de distintos estudios.



La creciente expansión de la agricultura implica su avance sobre los ecosistemas naturales, y con ello, grandes impactos sobre el ambiente. En las últimas décadas, extensas áreas de selvas, bosques nativos y humedales han sido deforestadas, drenadas y quemadas en Sudamérica para monocultivos (Torremorel *et al.*, 2021; García, 2021). Las superficies de las regiones arrasadas para plantar principalmente soja representan un alarmante crecimiento hace más de una década, superando los 25 millones de ha en nuestro país (Bravo, 2006). Además, las últimas décadas se han caracterizado por un avance del proceso de “sojización” hacia áreas marginales, indicando que Argentina está llegando a sus límites productivos en las zonas núcleo (Palau, 2021). La fragmentación de sistemas naturales conlleva a grandes riesgos para la diversidad biológica a través de la pérdida de hábitat, reducción del tamaño de parches y aislamiento de los mismos (Peltzer, 2006). A su vez, la industria tiene un fuerte impacto sobre las cuencas hidrográficas, ya que las actividades agroindustriales se desarrollan generalmente en la ribera de ríos o terminan conectando a ellos por escorrentía (Martino *et al.*, 2008). Es así que la contaminación de los sistemas a raíz de los sistemas productivos es una de las consecuencias más graves.

Generalmente solo un 0.1% de la cantidad de plaguicidas que se aplican en los cultivos llega efectivamente al objetivo, mientras que el resto circula en el ambiente, actuando como fuente de contaminación emergente para el suelo, el agua, y la biota (Carvalho *et al.*, 1998). En este sentido, los distintos agroquímicos utilizados en la agricultura terminan en el suelo y cuerpos de agua superficiales donde llegan por escorrentía (Martino *et al.*, 2008; De Liguoro *et al.*, 2014). El destino y la persistencia de los plaguicidas en el ambiente es complejo y depende de varios factores entre los que se destacan las condiciones y características ambientales y las propias de los compuestos (Mann *et al.*, 2009). En general, los plaguicidas persisten en el agua y tienden a acumularse en los sedimentos, representando una potencial amenaza tóxica para diversos organismos no blanco (Zhelev *et al.*, 2018). Particularmente en Argentina, hay cada vez más informes de daños a la salud ambiental de comunidades animales y humanas debido a exposiciones generadas por la proximidad a campos de cultivo (por ejemplo, Attademo *et al.*, 2007; Simoniello *et al.*, 2008; Bernardi *et al.*, 2015; Ávila Vázquez *et al.*, 2017; Verzeñassi *et al.*, 2023).

En paralelo al desarrollo agrícola, el avance de la frontera pecuaria también tuvo lugar en las últimas décadas. Las prácticas ganaderas se han ido adaptando para sostener su rentabilidad frente a los cambios introducidos a raíz del fenómeno de agriculturización consolidándose en un modelo de rotación de cultivos con pasturas y forrajes anuales, bajo condiciones extensivas o semi-intensivas (Michelena *et al.*, 2013). Así, parte de los productos generados en las grandes extensiones de cultivo (cereales, forrajeras) se destinan a la

alimentación de los animales y delimitan cierta dependencia entre producciones (Abad & Martínez, 1997; Sarmah *et al.*, 2006). Por otro lado, existe un creciente avance de los sistemas modernos de cría en “feedlots” que intentan dar respuesta a la demanda de productos en una superficie cada vez más reducida. Estos sistemas intensivos se caracterizan no sólo por una alta densidad animal (por ejemplo, en la producción avícola, más de 13 aves/m<sup>2</sup>), sino también por tiempos de cría acelerados (Minagri, 2020). Esta práctica propicia el uso de alimento balanceado y antibióticos de uso veterinario con fines preventivos para diversas afecciones potenciadas por la elevada densidad animal (Benedict *et al.*, 2012). Cabe destacar que el uso de productos farmacéuticos veterinarios no tiene un marco regulatorio específico en la producción, por lo que su aplicación resulta cada vez más excesiva (Da Silva *et al.*, 2023).

Por lo antes expuesto, las prácticas ganaderas extensivas también contribuyen a la contaminación de las matrices ambientales. Las condiciones de hacinamiento que delimita el sistema de feedlot favorecen la proliferación de enfermedades y su rápida propagación. Además del riesgo económico-sanitario a lo que ello conlleva, esta práctica fomenta el uso masivo de fármacos veterinarios (Chapman *et al.*, 2010). A pesar de la variedad de dosis y tratamientos, los residuos de los fármacos generalmente son excretados por las heces y/u orina (Yoshida *et al.*, 2009). Los antibióticos proporcionados al ganado a gran escala pueden ingresar al ambiente por el uso de desechos de los animales como abono en los agroecosistemas (Kivits *et al.*, 2018). En este sentido, los antibióticos terminan con el mismo destino que los plaguicidas, en las matrices agrícolas, o directamente en las cuencas hídricas por escorrentía (Agudelo-Londoño *et al.*, 2012).

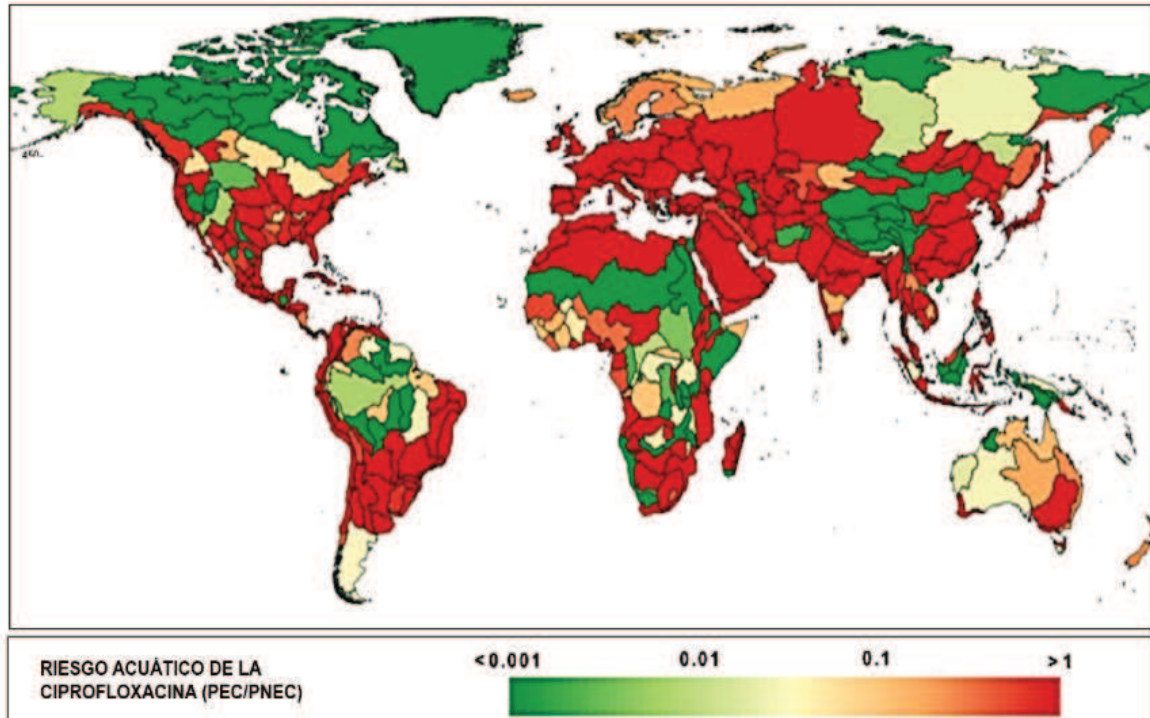
Al igual que lo que ocurre con fármacos de uso humano, el aumento a gran escala tanto del consumo de este tipo de fármacos y su excreción e introducción en el ambiente los han convertido en contaminantes de preocupación emergente (CPE) desde la década de los 90 (Zuccato & Castiglioni, 2009). Más de 2.000 productos farmacéuticos veterinarios se fabrican a partir de 400 ingredientes químicos activos para tratar diversas especies de animales (FDA, 2012; Sarmah *et al.*, 2006). Si bien no existen datos oficiales respecto a cantidades de uso/comercialización de estos compuestos en Argentina, y hay escasos valores mundiales), la ciprofloxacina (CIP) y la amoxicilina (AMX) se encuentran entre los antibióticos más utilizados en medicina veterinaria, también en humana (Githinji *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012). Además de su uso veterinario tradicional, los antibióticos se aplican como promotores de crecimiento, lo que se traduce en un mayor aumento de la carga ambiental de sus residuos (Niewold, 2007). Por ejemplo, en las producciones intensivas de bovinos, cerdos, aves, y peces de América Latina, bajas dosis de antibióticos se añaden regularmente al pienso de los animales con el fin



de acelerar su crecimiento y el rendimiento de la producción (Bacacela Arévalo & Quizhpe Peralta, 2022).

La CIP es de los fármacos más utilizados en medicina humana (desde los años 1980) y veterinaria (desde los años 1990) para el tratamiento de infecciones del tracto urinario, entérico, del tracto respiratorio bajo y de los huesos, siendo principalmente activos contra Gram - bacterias negativas (López-Cadenas *et al.*, 2013). La AMX es una forma de ampicilina modificada químicamente para mejorar sus características de absorción, que también ha alarmado con su presencia en cuencas hidrográficas urbanas y aguas residuales (Watkinson *et al.*, 2009). Estos y otros antibióticos han demostrado ser persistentes durante mucho tiempo en el ambiente acuático debido a su dosis masiva y a la aplicación frecuente tanto en humanos y ganado (Qin & Liu, 2013; Wang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). Su presencia en los sistemas acuáticos es motivo de creciente preocupación a nivel mundial debido al desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos, así como cada vez más efectos sobre organismos no-blanco (Redgrave *et al.*, 2014; Kurenbach *et al.*, 2018). En un estudio reciente, Oldenkamp *et al.* (2019) advirtieron alto nivel de riesgo ecológico de fármacos como la CIP en las ecoregiones del centro y norte del país junto con otras regiones del mundo, como se muestra en la **Figura 3**.

**Figura 3.** Mapa adaptado Oldenkamp *et al.* (2019) que muestra el riesgo acuático de la ciprofloxacina



por ecoregión del mundo, expresado como la proporción entre las concentraciones ambientales predictas (PEC)/concentraciones predictas sin efecto (PNEC).

## 1.2. El impacto de las matrices agroindustriales sobre la biodiversidad

La degradación de la calidad del agua en ríos y arroyos de todo el mundo se está convirtiendo en una preocupación importante, especialmente a medida que aumentan las tensiones derivadas del cambio climático (Murdoch *et al.*, 2000). La principal causa de deterioro de las aguas superficiales se debe a la contaminación difusa, que incluye la escorrentía urbana, de construcción y agrícola, que contienen nutrientes, sedimentos en suspensión, pesticidas, antibióticos y otros productos farmacéuticos, metales pesados, entre otros (Panthi *et al.*, 2019). La contaminación por nutrientes como el nitrato (NO<sub>3</sub>) procedente de las aplicaciones de fertilizantes, es persistente en los ríos y es la forma más común a nivel mundial de contaminación química en las aguas subterráneas, lo que hace que sea una de las principales causas del deterioro del agua potable (Karpuzcu *et al.*, 2012). Además, la complejidad de la mezcla de residuos de pesticidas aumenta la toxicidad potencial con su cada vez más creciente aplicación y combinación. Por su parte, la práctica ampliamente utilizada en agricultura, en particular en nuestro país, de aplicar estiércol como abono para suelos agrícolas conlleva a la acumulación de los residuos de antibióticos veterinarios en suelos agrícolas y entornos acuáticos (Alonso *et al.*, 2024). Si bien los pesticidas y los antibióticos son importantes para que la productividad agrícola sustente a una población mundial cada vez mayor, estos productos químicos se han vuelto omnipresentes en las vías fluviales de todo el mundo, con efectos significativos en los entornos de los agroecosistemas a distintas escalas (Nottingham *et al.*, 2021).

Los plaguicidas suelen ser cócteles de uno o más ingredientes activos y otras sustancias que no tienen acción biocida directa, por lo que se etiquetan como “inertes”, “coadyuvantes” o “coformulantes”. Estas otras sustancias se añaden al ingrediente activo con el fin de mejorar su disolución, estabilidad, absorción y acción pesticida del ingrediente activo (Cox & Sorgan, 2006). Los principales coformulantes aumentan la solubilidad del ingrediente activo formando micelas y lo protegen de la degradación natural (Cserhati, 1995). También se pueden utilizar disolventes orgánicos e inorgánicos para aumentar la movilidad del ingrediente activo (Yusoff *et al.*, 2016). La necesidad de agregar adyuvantes depende de las propiedades fisicoquímicas del ingrediente activo, así como del estado de la formulación del producto (suspensión concentrada, solución, polvo humectable, gránulos, etc.). La presencia de adyuvantes puede no sólo promover la penetración del ingrediente activo en el organismo objetivo, sino también en los organismos no blanco. Por otro lado, los adyuvantes considerados “inertes” pueden tener actividad biológica por sí solos y pueden ser tanto o más tóxicos para los humanos que los ingredientes activos de los pesticidas, o los componentes pueden tener efectos sinérgicos (Cox & Sorgan, 2006). La composición exacta de los pesticidas en forma de formulados comerciales, y la identidad de otros ingredientes en estas formulaciones a menudo no se revelan porque las compañías productoras no estaban obligadas por ley a brindar información sobre otros

ingredientes a los consumidores, a menos que tuvieran intrínsecamente un potencial peligroso (Nagy *et al.*, 2020). En general, los peligros y riesgos relacionados a los pesticidas se evalúan mediante la toxicidad del ingrediente activo, ignorando en gran medida el daño potencial de otros componentes y/o los posibles efectos combinados de las mezclas. En este sentido, es fundamental evaluar los plaguicidas en la forma en la que son introducidas al ambiente, en mezclas complejas como formulados comerciales (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2021).

También es importante comprender los efectos de los pesticidas en conjunto, ya que estos no sólo pueden aplicarse de manera conjunta en los cultivos en combinaciones específicas, sino que también terminan confluyendo en las distintas matrices por contaminación difusa. Por ejemplo, entre los herbicidas más utilizados sobre todo en cultivos con eventos transgénicos de resistencia a ambos, el GLI y GA pueden coexistir no sólo en el sitio de aplicación, sino también a las aguas superficiales y subterráneas de las cuencas agrícolas. Dado el creciente interés por el estudio de estos contaminantes, individualmente y en mezcla, se conocen cada vez más los riesgos del GLI y GA para los organismos acuáticos que ocurren en agroecosistemas y la potencial contaminación del agua potable (Geng *et al.* 2021), pero las interacciones a nivel químico entre los compuestos aún son poco exploradas (Lajmanovich *et al.*, 2022). Entre los efectos más reconocidos de ambos herbicidas, varios estudios reiteran la teratogénesis, disrupción endócrina de la tiroides, estrés oxidativo, y genotoxicidad, entre otros (Alavanja, 2009; Peltzer *et al.*, 2013; de Araujo *et al.*, 2016; Lajmanovich *et al.*, 2014; 2022; Babalola *et al.* 2021).

La combinación herbicidas e insecticidas también resulta común en los cultivos para controlar malezas y plagas de insectos (Choung *et al.*, 2013). Estos contaminantes se han detectado simultáneamente en suelos y ambientes acuáticos, y plantean escenarios de exposición complejos para los organismos que habitan estos ambientes. Por ejemplo, se conocen algunos efectos nocivos y el impacto ecotoxicológico de GLI y CP en el crecimiento de peces *Cnesterodon decemmaculatus*, que incluyen la disminución de la longitud y el peso corporal, además de la alteración de algunos parámetros bioquímicos, histológicos, y comportamentales (Bonifacio & Hued, 2019). También se ha informado el efecto genotóxico de dicha mezcla en yacarés, *Caiman latirostris* (López-Gonzalez *et al.*, 2019). Los anfibios también han demostrado ser altamente sensibles a la exposición ambiental a GLI y CP, provocando alteraciones endocrinas, celulares, metabólicas y conductuales, así como en el desarrollo y diferenciación gonadal y neurogénesis (Lajmanovich *et al.*, 2010; Bernabo *et al.*, 2011; Annet *et al.*, 2014).

Otros estudios han demostrado recientemente que un número significativo de CPE como fármacos (por ejemplo, hormonas, esteroides y antibióticos) tienen gran influencia en la

contaminación de los ambientes acuáticos al igual que los pesticidas (Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2020; Alvarez-Ruiz & Picó, 2020). La acción conjunta como plaguicidas y antibióticos veterinarios, apenas han comenzado a investigarse con respecto a su impacto en procesos ecológicamente importantes (Pontius *et al.*, 2021). Los avances industriales y tecnológicos con respecto a la producción han superado ampliamente las prácticas regulatorias (Bolong *et al.*, 2009). Como se ha mencionado anteriormente, además de la falta de marco regulatorio para los fármacos, aún no se han determinado límites para los criterios de tratamiento de agua y aguas residuales sobre muchos antibióticos. Un estudio reciente en la región detectó varios residuos de antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas como la CIP en ríos y aguas residuales de Argentina (Teglia *et al.*, 2019). Los análisis ecotoxicológico de este antibiótico reportan efectos sobre el desarrollo, crecimiento, y sistema antioxidante y endócrino de organismos indicadores como los anfibios (Peltzer *et al.*, 2017). Por su parte, la AMX es reconocida por su baja tasa de metabolización en los organismos, pudiendo excretarse en un 60 a 90% como su forma sin modificación (Patel *et al.*, 2019). Los escasos estudios que han analizado la toxicidad de la AMX en organismos no-blanco han reportado toxicidad en algunas algas de los géneros *Microcystis* y *Synechococcus*, y alteraciones en la formación de embriones en el pez cebra, *D. rerio* (Oliveira *et al.*, 2013; González Pleiter *et al.*, 2013; de Moraes *et al.*, 2022). También se ha reportado que la presencia de AMX en el ambiente incrementa la resistencia bacteriana secundaria (Paterson & Bonomo, 2005).

Es necesario considerar posible absorción/acumulación de residuos de fármacos por las plantas (rizofiltración, fitoextracción, fitoacumulación, etc), principalmente aquellas expuestas a la fertilización por estiércol o al riego con aguas residuales (Tasho & Cho, 2016). Aunque muchos productos farmacéuticos no presentan toxicidad aguda, pueden tener un efecto acumulativo significativo en el metabolismo de los organismos y en el ecosistema en su conjunto. Los compuestos farmacéuticos se dirigen a receptores específicos, y en muchos casos, los receptores del organismo blanco son comunes a otras especies, incluso grandes grupos de animales (mamíferos, vertebrados o animales en general). Más importante aún, muchas veces la toxicidad de un compuesto individual resulta insignificante, pero puede actuar de manera aditiva en mezcla con otros metabolitos que exhiben el mismo modo de acción (Radjenovic *et al.*, 2009). En contraste con la gran cantidad de datos analíticos sobre la existencia de residuos farmacéuticos en aguas residuales y matrices de agua, los estudios que evalúan los posibles efectos ecotoxicológicos de los residuos de medicamentos detectados son escasos y muy pocos contienen datos sobre la toxicidad de las mezclas (Fatta-Kassinos *et al.*, 2011). Estos estudios son importantes porque los residuos de medicamentos que se encuentran en el medio ambiente suelen presentarse como mezclas, no como contaminantes únicos. Por lo tanto, la evaluación científica del riesgo debe considerar esta compleja situación de exposición (Clevers, 2004).

### 1.3. Los anfibios anuros como bioindicadores

Los anfibios son los vertebrados más amenazados a nivel mundial, con más del 40% de las especies en peligro de extinción (IUCN, 2023; Luedtke *et al.*, 2023). Dentro de las principales amenazas para este grupo, tanto a nivel global como local, se destaca la pérdida y degradación del hábitat provocada principalmente por la actividad agrícola (Peltzer, 2006; Collins *et al.*, 2009; IUCN, 2023, Luedtke *et al.*, 2023). Los anfibios son muy sensibles a la degradación del ambiente debido a varias de sus características biológicas y fisiológicas (Wells, 2007). La mayoría de las especies de la región presentan un ciclo de bifásico, con una fase larval acuática y una etapa adulta terrestre. Esto los define como un grupo clave para detectar variaciones en los ecosistemas, ya que están expuestos a alteraciones tanto en el medio acuático (receptor de contaminación) como en el terrestre, y responden a los cambios en las condiciones ambientales en ambos ecosistemas (Becker *et al.*, 2007). También poseen una piel delgada y permeable, que propicia la entrada de diversas sustancias tóxicas que pueden estar disueltas en el agua, y presentan una alta tasa de bioacumulación comparada con otros animales de su misma posición trófica (Unrine *et al.*, 2007). Además, son animales que en general presentan una baja capacidad de dispersión y una alta permanencia en el mismo entorno (Caldwell & Shepard, 2007), siendo particularmente vulnerables a las alteraciones a nivel del paisaje (Cayuela *et al.*, 2015). La similitud de la metamorfosis de los anfibios con desarrollo de otros vertebrados, incluyendo remodelación intestinal, el desarrollo cerebral y la diferenciación ósea, los hace organismos de interés transversal (Buchholz, 2015). En este sentido, la metamorfosis de los anfibios mediada por la hormona tiroidea, representa un importante modelo perinatal para la endocrinología durante la gestación de los mamíferos (Wada, 2008; Holzer & Laudet, 2013).

Cabe destacar que los anfibios cumplen con las principales características que debe poseer un indicador biológico, siendo ubicuos, abundantes, fácilmente detectables, de fácil muestreo, y relativamente sedentarios, entre otras cosas (Metcalf, 1989). Por estas características y por su alta sensibilidad son utilizados como bioindicadores de calidad ambiental, para investigar los efectos de la degradación del hábitat (i.e. Eterovick *et al.*, 2016; Saccol *et al.*, 2017; Bionda *et al.*, 2018). Como se mencionó anteriormente, los distintos agroquímicos utilizados en la actividad agrícola, pueden llegar a los cuerpos de agua y acumularse en los sedimentos. Esto puede afectar a las larvas de anfibios especialmente a las especies con hábitos bentónicos, que están en contacto más estrecho con el sedimento, ya que se alimentan en o cerca del fondo de los cuerpos de agua (McDiarmid & Altig, 1999). Además, durante los últimos años, se ha registrado un incremento de los estudios que utilizan a los anfibios como modelos experimentales, con el objetivo de identificar y caracterizar el peligro

potencial y los mecanismos de acción de los plaguicidas asociados a la actividad agrícola (Peltzer *et al.*, 2023). Los efectos de estos contaminantes químicos pueden evaluarse tanto en los estadios acuáticos como en los terrestres, pudiendo afectar a los individuos directamente (por ejemplo, reduciendo las tasas de crecimiento y desarrollo) o indirectamente, mediante la alteración de sus interacciones con otros organismos (Hanlon & Relyea, 2013). Si bien los animales en estadios posmetamórficos pueden servir como modelos para el estudio del efecto de algunos contaminantes químicos (Mann & Bidwell, 1999; Relyea, 2005), la fase larval es la más utilizada en los estudios ecotoxicológicos, ya que existe evidencia de que son más sensibles que los adultos frente a los cambios ambientales (Hopkins, 2007). Además, el número de individuos obtenidos por muestreo es alto, y las larvas pueden mantenerse con mayor facilidad en condiciones experimentales (Lajmanovich *et al.*, 2021).

En Argentina, existe una vasta línea de investigaciones ecotoxicológicas en anfibios. Los primeros estudios ecotoxicológicos en especies de anuros autóctonos fueron llevados a cabo desde la década de 1960 por el grupo del Dr. Alfredo Salibián en la Universidad Nacional de Luján, afianzándose con publicaciones sobre larvas de anuros expuestas a diferentes plaguicidas en ensayos toxicológicos y utilizando extensivamente el sapo común *Rhinella arenarum* como especie modelo, para estandarizar bioensayos en evaluaciones de toxicidad de agua en ríos urbanos contaminados y evaluando diferentes parámetros hematológicos como puntos finales (Salibián 1992, Ferrari *et al.*, 1997; Demichelis *et al.*, 2001, Chiesa *et al.*, 2006).

Por otro lado, a partir de la década del 90 hasta la actualidad, el Dr. Herkovits publican sus resultados evaluando los efectos a nivel individual en anuros como la rana africana de uñas *Xenopus laevis* y *R. arenarum* expuestos experimentalmente a varios estresores ambientales como metales pesados y plaguicidas (Pérez-Coll *et al.*, 1988, Herkovits & Pérez-Coll, 1993, Herkovits & Helguero, 1998; Brodeur *et al.*, 2009; Aronzon *et al.*, 2011); lo que posteriormente concluye en el desarrollo del test de toxicidad para estudios ecotoxicológicos estandarizados para embriones de anfibios utilizando muestras ambientales del área de Buenos Aires, ensayo conocido como AMPHITOX (Herkovits *et al.*, 2002, Herkovits & Perez-Coll 2003).

En el centro este de la Argentina, el modelo agrícola avanzó marcadamente luego de la aprobación en Argentina en 1996 de la soja “Roundup Ready” resistente al GLI. En esta región las primeras evaluaciones experimentales exploratorias sobre la toxicidad de agroquímicos de uso masivo en las especies regionales han sido llevadas a cabo por el grupo del Dr. Lajmanovich desde fines de la década del 1990. Los estudios también destacaron la influencia de distintas perturbaciones antrópicas, el riesgo ecotoxicológico de los agroecosistemas y otros escenarios ambientales de la región Litoral sobre los anfibios anuros *in situ* (Lajmanovich *et al.*, 1998; Izaguirre *et al.*, 2000; Lajmanovich & Peltzer, 2001; Peltzer *et al.*, 2003, 2006). Además, las

evaluaciones *in situ* de anfibios en los ambientes agrícolas también ha posibilitado la determinación de distintas respuestas biológicas y bioquímicas, y la implementación de un índice de riesgo ecotoxicológico, integrando información micro y microbiológica (Peltzer *et al.*, 2008; Lajmanovich *et al.* 2010). Los diversos efectos observados en la biología y ecología en estos vertebrados, tanto en su fase larval como adulta, han permitido la valoración de riesgos de contaminantes ante distintos escenarios y concentraciones ambientalmente previstas (CAP) y la obtención de distintas líneas de evidencias de efecto y exposición relacionadas con anomalías morfológicas (Peltzer *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2014), alteraciones inmunológicas (Cabagna *et al.*, 2005), estrés oxidativo (Attademo *et al.*, 2022), hormonal (Lajmanovich *et al.*, 2019; 2022), neurotoxicidad (Peltzer *et al.*, 2013), genotoxicidad (Lajmanovich *et al.*, 2005; 2022), alteraciones fisiológicas (Peltzer *et al.*, 2024) y de funcionalidad ecológica (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2023), entre otras.

Por otra parte, los estudios ecotoxicológicos experimentales con larvas de anfibios pueden incluir experimentos de mesocosmos al aire libre, que ofrecen condiciones ecológicas más realistas y se consideran un nivel intermedio entre los estudios de campo y ensayos de laboratorio (Peltzer *et al.*, 2013). Este tipo de experimentos minimizan los riesgos de simplificar en exceso el entorno y de las grandes variaciones entre réplicas, y han resultado ser efectivos para estudiar la toxicidad de sedimentos sobre larvas de anuros (Boone & James, 2005; Sansiñena *et al.*, 2018). Los estudios experimentales también pueden incluir bioensayos de laboratorio (microcosmo), donde la exposición de larvas a diferentes concentraciones de el/los contaminante/s de interés durante un tiempo determinado tiene lugar bajo condiciones controladas y los efectos biológicos pueden relacionarse directamente con la concentración y con el tiempo de exposición (relación concentración/respuesta) (Sansiñena, 2020). A partir de este tipo de bioensayos, se pueden determinar parámetros toxicológicos importantes que permiten comparar el grado de toxicidad de un compuesto; la sensibilidad de diferentes especies (Peluso & Carriquiriborde, 2021). Además de la letalidad de los compuestos, pueden estudiarse respuestas a distinta escala de la salud de los organismos ante la exposición a los contaminantes (Lajmanovich *et al.*, 2021). Asimismo, existen numerosos estudios que evalúan los efectos a distinto tiempo de exposición, incluyendo el análisis de respuestas agudas, que suelen ser más severas, o respuestas crónicas, que por lo general son a largo plazo sobre el crecimiento, comportamiento y fisiología de los animales (Peluso & Carriquiriborde, 2021)

A la actualidad, existen estudios que confirman la presencia de más de 20 residuos de plaguicidas en anfibios anuros en zonas de intensa explotación agrícola (Lajmanovich *et al.*, 2002, 2005; Brodeur *et al.* 2022). Recientemente, también se informó la bioacumulación de productos farmacéuticos en tejidos de *R. arenarum*, en concentraciones más altas que en los

propios cuerpos de agua (Salgado Costa *et al.* 2023). El conocimiento sobre los efectos de distintos CPE que incluyen tanto plaguicidas como fármacos es sumamente diverso en el país e incluyen un amplio abanico de biomarcadores que permiten comprender exhaustivamente el impacto de los sistemas agroindustriales sobre estos organismos (**Tabla 1**).

#### 1.4. El uso de biomarcadores en estudios ecotoxicológicos

Los biomarcadores pueden definirse como las diversas respuestas biológicas o cambios mensurables a nivel bioquímico, fisiológico, morfológico o histológico de los sistemas biológicos en respuesta a los contaminantes o estresores ambientales (Gupta *et al.*, 2014). De esta manera, se busca relacionar el estado de salud de un individuo expuesto a un tóxico con la intensidad de los cambios registrados en el biomarcador, considerando el desmejoramiento de su condición fisiológica normal en función de la concentración del contaminante. Las respuestas de los organismos que se obtienen a través del análisis de los biomarcadores también pueden interpretarse como señales de alerta confiables del grado de deterioro del ambiente. En general, se busca que un parámetro considerado biomarcador debe tener la suficiente sensibilidad, especificidad y precocidad en su respuesta. La utilización de distintos tipos de marcadores permite un análisis más exhaustivo, preciso e integrado sobre la acción de los contaminantes al conocer que estos no son específicos.

Existe una gran diversidad de tipos de biomarcadores y criterios para clasificarlos. Según el tipo de información que brindan, pueden diferenciarse en biomarcadores de exposición, de respuesta y sensibilidad. Los biomarcadores de exposición pueden tratarse de compuestos exógenos (o metabolitos) dentro del organismo que refleja la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se realiza en fluidos corporales (sangre y orina, fundamentalmente). En el caso de tóxicos acumulativos, la dosis interna puede también reflejar la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales. Bernard & Lauwerys (1986) dividen los biomarcadores de exposición en dos subgrupos: selectivos y no selectivos, basándose en la especificidad de las pruebas de detección. Los biomarcadores selectivos se basan en la medida directa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos (por ejemplo, plomo en sangre) y los no selectivos constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición (por ejemplo, tioéteres en orina como indicadores de exposición a sustancias electrófilas y, por tanto, reflejo de la absorción de sustancias mutagénicas y cancerígenas). En cambio, los biomarcadores de respuesta (o efecto tóxico): son indicativos de cambios bioquímicos en un organismo que producen un daño de salud o potencial como resultado de la exposición a xenobióticos. Incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas (acetilcolinesterasa), aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARNm, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos



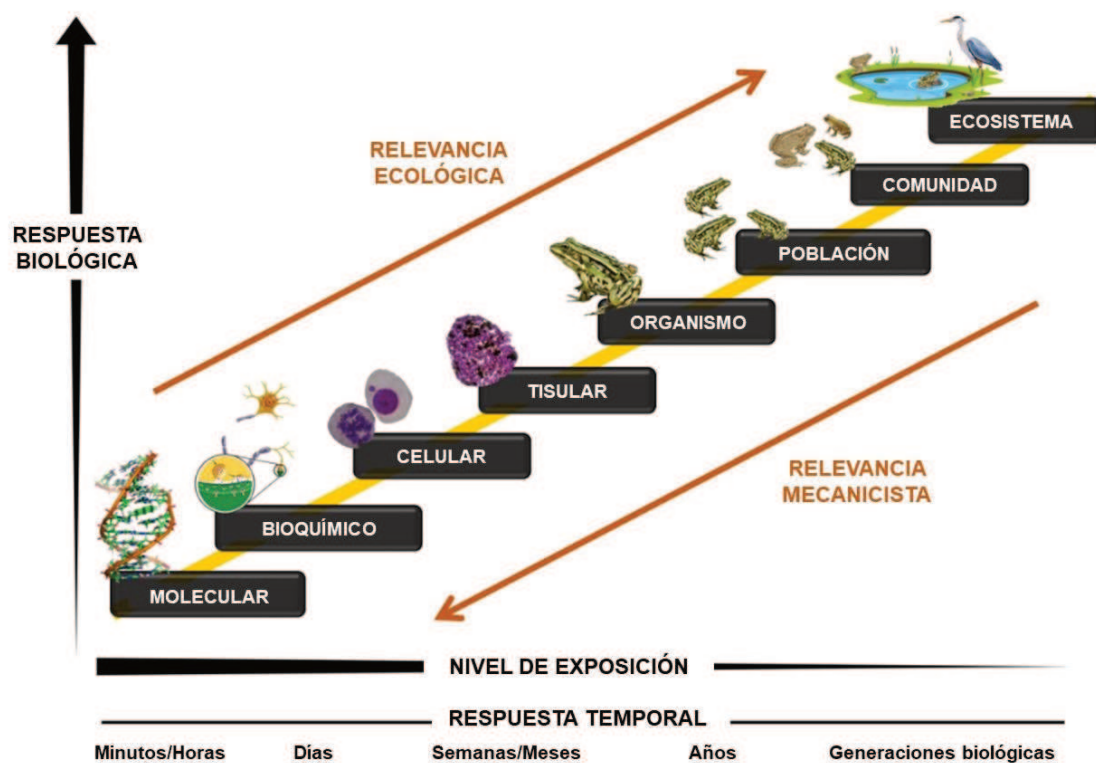
(autoanticuerpos) contra un xenobiótico. Por su parte, los biomarcadores de susceptibilidad: refieren a la sensibilidad organismo-específica y la capacidad individual de responder al agente.

Según si es requerido o no el sacrificio del organismo para la determinación, se distinguen los biomarcadores destructivos y no destructivos, respectivamente. Otro criterio de clasificación que define a los biomarcadores es el nivel de organización biológica al que corresponde el parámetro de estudio, pudiendo definirse como biomarcadores moleculares, citogenéticos, bioquímicos, fisiológicos, histológicos, morfológicos, etológicos, entre otros (van der Oost *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2006; Conti, 2008). Al considerar que las respuestas biológicas tienen lugar a raíz de la interacción del agente estresor con biomoléculas en un dado sitio o célula blanco del organismo (Van der Oost *et al.*, 2003; Newman, 2014), la evaluación de los efectos tóxicos desde la escala molecular hasta niveles de organización superiores que representen la totalidad del organismo, permite una mejor comprensión e inferencia sobre la toxicidad del agente y su mecanismo de acción (Venturino *et al.*, 2003; Sparling *et al.*, 2010; Connon *et al.*, 2012; Chapman, 2002, **Figura 4**), incluyendo variaciones ontogenéticas para el caso de larvas.

Entre los biomarcadores más utilizados en anfibios (**Tabla 1**), se destacan los biomarcadores bioquímicos que contemplan las alteraciones en la actividad enzimática y los niveles hormonales (Lajmanovich *et al.*, 2021). Por ejemplo, la enzima acetilcolinesterasa (AChE), es inhibida por compuestos organofosforados (Aldridge, 1953), evidenciando su presencia. La actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST), también se utiliza como un biomarcador (Attademo *et al.*, 2007), debido a su papel en el metabolismo de los pesticidas (Jokanovic, 2001). Además, las hormonas tiroideas proporcionan información sobre los mecanismos que ocurren a lo largo de las etapas de desarrollo, lo que hace a estas hormonas esenciales unos buenos bioindicadores (Denver *et al.*, 2002). Varios productos químicos, incluidos los pesticidas y antibióticos, pueden ejercer cambios sobre las hormonas tiroideas y consecuentemente, alteraciones estructurales y funcionales, cambios en los tejidos y la fisiología de las larvas (Miyata & Ose, 2012; Lanctot *et al.*, 2013; Lajmanovich *et al.* 2019).

Los biomarcadores histológicos que refieren a las alteraciones en el número, estructura o función de las células también se consideran buenos indicadores de los efectos de los contaminantes (López-González *et al.*, 2017). En este sentido, la configuración, composición y apariencia de algunas células y tejidos se utilizan frecuentemente como biomarcadores histológicos para evaluar los efectos de los contaminantes sobre anfibios (Peltzer *et al.*, 2023). Los cambios histológicos en los tejidos pueden revelar los efectos de los xenobióticos ambientales como antibióticos veterinarios en los órganos diana, y la histopatología refleja las lesiones según la toxicidad de la sustancia, la duración e intensidad de la exposición del organismo y la capacidad de los tejidos para responder y adaptarse (Albinati *et al.*, 2009).

**Figura 4.** Paradigma de las mediciones en ecotoxicología y su relevancia ecológica (Modificado de Chapman, 2002 y Peltzer *et al.*, 2023).



Como el hígado participa en la biotransformación de compuestos tóxicos, su histología brinda información relevante sobre los efectos de los contaminantes (Bonomo *et al.*, 2021). El estudio histopatológico del hígado puede incluir el análisis de la configuración general del órgano o de algunas células específicas. Alteraciones como cambios en el tamaño total del órgano, infiltración inflamatoria y aumento de irrigación se describen entre las alteraciones más frecuentes a nivel hepático en anfibios expuestos a distintos contaminantes (Curi *et al.*, 2017; Cuzziol Boccioni *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2022; Rutkoski *et al.*, 2022). Los melanomacrófagos, células fagocitadoras pigmentadas del hígado, son particularmente interesantes ya que sus

cambios tanto en número como en tamaño y número de pigmentos pueden indicar respuestas fisiológicas e inmunológicas, y también representan un parámetro frecuente de evaluación en estudios ecotoxicológicos en anfibios (Peltzer *et al.*, 2024).

Por otra parte, el uso de biomarcadores morfológicos (por ejemplo, longitud/masa corporal; tasa de crecimiento/desarrollo; presencia de anomalías morfológicas) en larvas de anuros también resulta útil para determinar los efectos a nivel individual provocados por diversos contaminantes (Peltzer *et al.*, 2013; Pérez-Iglesias *et al.*, 2015; 2020; Babini *et al.*, 2016; Curi *et al.*, 2019). La alta incidencia de malformaciones durante el desarrollo temprano es un tema importante a considerar en el declive de los anfibios porque puede perjudicar el éxito de la metamorfosis y aumentar las pérdidas naturales de población debido a la depredación, la competencia y el parasitismo (Collins, 2010).

La microbiota intestinal es conocida por sus funciones clave en el mantenimiento de la salud del huésped, incluida la defensa contra patógenos, la digestión de los alimentos, el metabolismo y almacenamiento de energía, la síntesis de vitaminas y aminoácidos, así como la adaptación ecológica y la regulación del comportamiento (Jandhyala *et al.* 2015; Milani *et al.*, 2017). Los contaminantes pueden interactuar con la microbiota intestinal a través de diferentes vías y, por lo tanto, alterar su composición y homeostasis, provocando trastornos metabólicos, malabsorción de nutrientes y disfunción del sistema inmunológico (Zhang *et al.*, 2015). Aunque los contaminantes no se dirigen directamente a la microbiota intestinal, algunos de ellos pueden alterar la estructura normal de las comunidades del microbioma intestinal (disbiosis) y provocar un desequilibrio de las especies bacterianas, lo que a su vez puede suponer un riesgo para la salud (Pindling *et al.*, 2017). Hasta el momento, la microbiota intestinal como biomarcador del efecto de contaminantes a nivel de comunidad, ha sido poco explorada en anfibios (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2023). Entre los efectos en la comunidad microbiana del intestino debido a la exposición de contaminantes como antibióticos y en menor frecuencia, herbicidas, los cambios en la abundancia relativa y la dominancia de géneros y filos son los más reportados (Tong *et al.*, 2022; Cuzziol Boccioni *et al.* 2023). Además, también se está informando de una menor susceptibilidad y adquisición de resistencia a los antibióticos en la microbiota bacteriana intestinal de anfibios expuestos a productos farmacéuticos (Peltzer *et al.*, 2024). Teniendo en cuenta que las larvas de anfibios representan reservorios de bacterias de interés sanitario, la disbiosis de su microbiota intestinal debido a la exposición a contaminantes puede conducir a la aparición de patógenos resistentes (Lajmanovich *et al.*, 2001).

**Tabla 1.** Resumen de los principales biomarcadores utilizados en estudios ecotoxicológicos en Argentina. Para cada parámetro, se detalla: las metodologías y/o herramientas empleadas para su análisis; los compuestos específicos o muestras ambientales para los que fueron estudiados (\* refiere a aquellos estudios a campo, en los cuales la composición de las mezclas que contienen los contaminantes no se conoce con exactitud debido a la propia naturaleza de la muestra); la etapa en la que se estudió, definida según el criterio de los autores en cada trabajo (A: adulto; J: juvenil; M: metamórfico; L: larva; E: embrión, y la referencia bibliográfica correspondiente. (Adaptado y actualizado de Lajmanovich *et al.*, 2021)

BIOMARCADORES	MÉTODO	COMPUESTOS	ETAPA	REFERENCIA
<b>BIOQUÍMICOS</b>				
Acetilcolinesterasa (AChE) (total)	Espectrofotometría (EFM)	Herbicidas (glifosato; picloram, metasulfuron-metil, bispiribac-sodio, glufosinato de amonio) Insecticida (clorpirifos; piretroides, dimetoato; Piriproxifenos, Spinosad); Otros plaguicidas: metaldehído; Medicamentos (diclofenac); Arsénico. Muestras ambientales (efluentes industriales)	L	Junges <i>et al.</i> , 2013; Peltzer <i>et al.</i> , 2013b, 2019; Lajmanovich <i>et al.</i> , 2013, 2018, 2019a, 2019b; Attademo <i>et al.</i> , 2016; Martinuzzi <i>et al.</i> , 2020; Barreto <i>et al.</i> , 2020; Bahl <i>et al.</i> , 2021; Peluso <i>et al.</i> , 2022.
(plasma)		Muestras ambientales (agroecosistemas*), Insecticida (clorpirifos); Herbicidas (glifosato, 2-4 D)	A	Lajmanovich <i>et al.</i> , 2004, 2015; Cabagna <i>et al.</i> , 2005
(tejidos)		Muestras ambientales (agua; agroecosistemas*); Insecticida (fenitrotion)	A L	Peltzer <i>et al.</i> , 2008; Junges <i>et al.</i> , 2010; Ossana, 2011; Attademo <i>et al.</i> , 2014
Butirilcolin-esterasa (BChE) (total)	EFM	Herbicidas (glifosato; picloram, metasulfuron-metil, bispiribac-sodio, glufosinato de amonio), Muestras ambientales (sedimentos, efluentes industriales)	L	Junges <i>et al.</i> , 2013; Peltzer <i>et al.</i> , 2013a,b; Lajmanovich <i>et al.</i> , 2013; Peluso <i>et al.</i> , 2022
(plasma)		Muestras ambientales (agroecosistemas*); Insecticidas (clorpirifos); Herbicida (glifosato, 2-4 D)	A	Attademo <i>et al.</i> , 2007, 2011; Lajmanovich <i>et al.</i> , 2015
(tejidos)		Insecticida (fenitrotion)	L	Junges <i>et al.</i> , 2010
Carboxilesterasa (CbE) (total)	EFM	Insecticidas (clorpirifos; piretroides, dimetoato, piriproxifeno)	L	Lajmanovich <i>et al.</i> , 2018, 2019a; Martinuzzi <i>et al.</i> , 2020; Barreto <i>et al.</i> , 2020
(plasma)		Muestras ambientales (agroecosistemas*); Insecticidas (clorpirifos); Herbicidas (glifosato, 2-4 D)	A	Attademo <i>et al.</i> , 2007, 2011; Lajmanovich <i>et al.</i> , 2015
(tejidos)		Muestras ambientales (agroecosistemas*)	L A	Attademo <i>et al.</i> , 2014
Glutati on-S-Transferasa (GST) (total)	EFM	Muestras ambientales (sedimentos; camas de pollo, efluentes industriales); Herbicidas (glifosato, picloram, metasulfuron-metil, bispiribac-sodio), Insecticida (clorpirifos; piriproxifeno, dimetoato); Otros plaguicidas: metaldehído; Medicamentos (enrofloxacina, ciprofloxacina, diclofenac); nanopartículas; arsénico	L, A	Lajmanovich <i>et al.</i> , 2013, 2018b, 2019a, 2019b; Peltzer <i>et al.</i> , 2013a, 2017, 2019; Attademo <i>et al.</i> , 2016; Curi <i>et al.</i> , 2017; Martinuzzi <i>et al.</i> , 2020; Barreto <i>et al.</i> , 2020; Peluso <i>et al.</i> , 2022
(plasma)		Muestras ambientales (agroecosistemas*); Herbicidas (glifosato, 2-4 D); Insecticidas (clorpirifos)	A	Attademo <i>et al.</i> , 2007; Lajmanovich <i>et al.</i> , 2015
(tejidos)		Muestras ambientales (agua, agroecosistemas*)	L, A	Ossana, 2011; Huespe <i>et al.</i> , 2017
Catalasa (CAT) (total)	EFM	Muestras ambientales (sedimentos; camas de pollo, efluentes industriales) Insecticida (clorpirifos); Otros plaguicidas: metaldehído; Medicamentos (enrofloxacina, ciprofloxacina)	L, E	Peltzer <i>et al.</i> , 2013a, 2017; Attademo <i>et al.</i> , 2016; Curi <i>et al.</i> , 2017; Barreto <i>et al.</i> , 2020; Peluso <i>et al.</i> , 2022.
(tejidos)		Muestras ambientales (agua)	L	Ossana, 2011
Peroxidación Lipídica (hígado)	EFM	Muestras ambientales (agua)	L	Ossana, 2011
(total)		Insecticidas (clorpirifos)	L	Barreto <i>et al.</i> , 2020
(eritrocitos)	Ensayo T-bars	Insecticidas (clorpirifos); Herbicidas (glifosato, 2-4 D)	A	Lajmanovich <i>et al.</i> , 2015
Glutati on (GSH) (total)	EFM	Insecticidas (clorpirifos)	L	Barreto <i>et al.</i> , 2020
Ácido Retinoico	Quimioluminiscencia	Herbicidas (glifosato)	E	Paganelli <i>et al.</i> , 2010
	Cromatografía Líquida (HPLC)	Muestras ambientales (agroecosistemas)	A	Teglia <i>et al.</i> , 2015

Hormonas tiroideas (T3 y T4)	Inmunoensayo electroquímico mixto	Insecticida (piriproxi-feno), Herbicida (glifosato, glufosinato de amonio), Medicamentos (ciprofloraxina, amoxicilina), arsénico. Muestras ambientales (efluentes industriales*), litio.	L	Lajmanovich <i>et al.</i> , 2019a, 2019b; 2022. Cuzziol Boccioni <i>et al.</i> , 2020, 2021, 2023; Peltzer <i>et al.</i> , 2024.
<b>CITOTÓXICOS Y GENOTÓXICOS</b>				
Micronúcleos	MMG	Muestras ambientales (sedimentos; agroecosistemas*, efluentes industriales*; minas de fluorita*); Insecticida (endosulfán; cipermetrina; imidacloprida; pirimicarbamatos; piretroides, imidazolinona); Herbicidas (glifosato, glufosinato de amonio; a base de flurocloridona; picloram, metasulfuron-metil, bispiribac-sodio); Medicamentos (ciclofosfamida); Alimentos (Soja Bt-resistente); Nanopartículas, Litio	A, M, L	Campana <i>et al.</i> , 2003; Lajmanovich <i>et al.</i> , 2005, 2013, 2014, 2017; 2018b; 2022; Cabagna <i>et al.</i> , 2006; Candioti <i>et al.</i> , 2010; Peltzer <i>et al.</i> , 2008, 2013; 2014, 2017; 2018b; 2022; 2014, 2015, 2016; Nikoloff <i>et al.</i> , 2014; Ruiz de Arcaute <i>et al.</i> , 2014; Babini <i>et al.</i> , 2016; Pollo <i>et al.</i> , 2017, 2018; Salinas, 2019; Peluso <i>et al.</i> , 2022; Cuzziol Boccioni <i>et al.</i> , 2024.
Otras anomalías nucleares entrocitárias	MMG	Muestras ambientales (sedimentos, agroecosistemas*, efluentes industriales*, minas de fluorita*); Insecticidas (imidacloprida; imidazolinona, pirimicarbamatos); Herbicidas (glifosato, glufosinato de amonio, a base de flurocloridona, picloram, metasulfuron-metil, bispiribac-sodio); Alimentos (soja Bt-resistente); arsénico, litio, nanopartículas	A, L	Attademo <i>et al.</i> , 2011; Lajmanovich <i>et al.</i> , 2013; 2014, 2017, 2018b; Peltzer <i>et al.</i> , 2013; 2014, 2015, 2016; Ruiz de Arcaute <i>et al.</i> , 2014; Nikoloff <i>et al.</i> , 2014; Babini <i>et al.</i> , 2016; Natale <i>et al.</i> , 2018; Pollo <i>et al.</i> , 2017, 2018; Cuzziol Boccioni <i>et al.</i> , 2024.
Daño ADN (en célula individual)	Ensayo cometa	Muestras ambientales (carne de pollos); Herbicidas (imazetapir; glifosato; a base de flurocloridona, 2-4 D); Insecticidas (clorpirifos; imidacloprida, imidazolinona); Arsénico	A, L	Pérez-Iglesias <i>et al.</i> , 2014, 2015, 2017; Nikoloff <i>et al.</i> , 2014; Lajmanovich <i>et al.</i> , 2015, 2019b; Curi <i>et al.</i> , 2017
Índice mitótico	MMG	Alimentos (soja Bt-resistente); Muestras ambientales (minas de fluorita*). Herbicida (glifosato), Arsénico	A, L	Lajmanovich <i>et al.</i> , 2017, 2019b; Pollo <i>et al.</i> , 2017
Frecuencia de entroblastos	MMG	Insecticida (pirimicarbamato)	L	Candioti <i>et al.</i> , 2010; Natale <i>et al.</i> , 2018
Apoptosis (tejido específico)	Tunel / Fragmentación de ADN por electroforesis	Insecticida (cipermetrina)	L	Casco <i>et al.</i> , 2006
<b>HISTOLÓGICOS</b>				
Hígado	Hematoxilina-Eosina (HE)	Herbicidas (glifosato, 2-4 D, atrizina)	A, L	Pérez-Iglesias <i>et al.</i> , 2016, 2019; Curi <i>et al.</i> , 2019
Melanomacró-fagos (cantidad)	HE - Software Image Pro Plus	Herbicidas (glifosato; 2-4 D, atrizina), Insecticidas (clorpirifos); Medicamentos (dexametasona) Muestras ambientales (agroecosistemas*)	A, L	Pérez-Iglesias <i>et al.</i> , 2016, 2019; Huespe <i>et al.</i> , 2017; Curi <i>et al.</i> , 2019; Cuzziol Boccioni <i>et al.</i> , 2020.
(morfometría)	HE-Software Image Pro Plus	Muestras ambientales (agroecosistemas*)	A	Huespe <i>et al.</i> , 2017
(contenido pigmentario)	Tinciones diferenciales Software Image Pro Plus	Herbicida (glifosato)	A	Pérez-Iglesias <i>et al.</i> , 2016
(presencia en la dermis)	Por contraste bajo lupa	Herbicida (atrazina)	L	Pérez-Iglesias <i>et al.</i> , 2019
Intestino (grosor de pared)	HE- Software Image Pro Plus	Alimentos (soja BT-resistente)	L	Lajmanovich <i>et al.</i> , 2017
Testículos (Anomalías, pigmentos, túbulos seminíferos)	HE	Muestras ambientales (agroecosistemas*)	A	Sánchez <i>et al.</i> , 2014
Infección parasitaria	Giemsa	Muestras ambientales (agroecosistemas*)	L	Peltzer <i>et al.</i> , 2008
Encéfalo	Microscopía electrónica de transmisión Azul de Toluidina	Insecticida (cipermetrina)	L	Izaguirre <i>et al.</i> , 2000; Casco <i>et al.</i> , 2006
Fórmula leucocitaria	May-Grünwald-Giemsa (MGG)	Muestras ambientales (agroecosistemas*, minas de fluorita*); Insecticidas (clorpirifos); Herbicidas (glifosato, 2-4 D)	A	Cabagna <i>et al.</i> , 2006; Lajmanovich <i>et al.</i> , 2015; Pollo <i>et al.</i> , 2017
Recuento de células sanguíneas	Muestra fresca en Cámara de Neubauer	Muestras ambientales (agroecosistemas*)	A	Cabagna <i>et al.</i> , 2006
<b>MORFOLÓGICOS</b>				
Longitud corporal	Observación bajo lupa (OL) Medición con calibre digital o manual, o mediante análisis digital de fotografías.	Insecticidas (clorpirifos, cipermetrina; imidazolinona, pirimicarbamato); Herbicidas (glifosato, 2-4 D, glifosato); Resinas epoxi (bisfenol); Medicamentos (enrofloxacina, ciprofloxacina, diclofenac) Muestras ambientales (sedimentos y agua de agroecosistemas* sitios ganaderos y urbanos*; minas de fluorita*; aguas con fluoruro*, camas de pollo); Alimentos (soja Bt-resistente)	A, L, E	Attademo <i>et al.</i> , 2007, 2011; Peltzer <i>et al.</i> , 2008, 2013 a, 2017; Agostini <i>et al.</i> , 2010; Aronzon <i>et al.</i> , 2010; Bionda <i>et al.</i> , 2011, 2018; Sánchez <i>et al.</i> , 2014; Pérez-Iglesias <i>et al.</i> , 2015, 2016, 2019; Hutter <i>et al.</i> , 2016; Babini <i>et al.</i> , 2016; Curi <i>et al.</i> , 2017; Huespe <i>et al.</i> , 2017; Lajmanovich <i>et al.</i> , 2017; 2019a;

				Pollo <i>et al.</i> , 2017, 2018, 2019; Natale <i>et al.</i> , 2018; Salinas, 2019; Barreto <i>et al.</i> , 2020
Masa corporal	Balanza digital	Medicamentos (enrofloxacina, ciprofloxacina, diclofenac); Herbicidas (glifosato, 2-4 D) Muestras ambientales (cama de pollos, agroecosistemas*, suburbanos*, aguas con fluoruro*); Alimentos (soja Bt-resistente)	A, L, E	Attademo <i>et al.</i> , 2007, 2011; Peltzer <i>et al.</i> , 2008, 2017, 2019; Brunelli <i>et al.</i> , 2009; Sánchez <i>et al.</i> , 2014; Babini <i>et al.</i> , 2016; Pérez-Iglesias <i>et al.</i> , 2016; Lajmanovich <i>et al.</i> , 2017; Huespe <i>et al.</i> , 2017; Curi <i>et al.</i> , 2019; Pollo <i>et al.</i> , 2019.
Otros parámetros longitudinales	OL (Medición)	Medicamentos (enrofloxacina, ciprofloxacina); muestras ambientales (sedimentos)	L	Peltzer <i>et al.</i> , 2013a, 2017
Tasa de crecimiento/ Tasa de desarrollo o metamorfosis	OL (Medición longitud)	Muestras ambientales (sedimentos, agroecosistemas*, sitios ganaderos y urbanos*); Medicamentos (enrofloxacina, ciprofloxacina, diclofenac); Herbicidas (2-4 D)	A, L	Brodeur <i>et al.</i> , 2013; Peltzer <i>et al.</i> , 2013, 2017, 2019; Bionda <i>et al.</i> , 2018; Curi <i>et al.</i> , 2019
	OL (determinación de estadios)/ Esqueletocronología (determinación de edad)	Herbicidas (atrazina); Resinas epoxi (bisfenol; epiclorhidrina); Muestras ambientales (agroecosistemas, sitios ganaderos y urbanos*)	A, L	Brodeur <i>et al.</i> , 2009; Hutler <i>et al.</i> , 2013, 2016; Bionda <i>et al.</i> , 2018
Condición animal/Factor de condición	Ecuación parámetros morfométricos	Muestras ambientales (agroecosistemas*, suburbanos*); Herbicida (atrazina); Medicamentos (diclofenac)	A, L	Attademo <i>et al.</i> , 2007, 2011; Bionda <i>et al.</i> , 2011; Brodeur <i>et al.</i> , 2013; Teglia <i>et al.</i> , 2015; Huespe <i>et al.</i> , 2017; Vera-Candiotti <i>et al.</i> , 2019; Peltzer <i>et al.</i> , 2019
Anormalidades morfológicas	Observación directa/OL/ Radiografía	Muestras ambientales (agroecosistemas*, suburbanos*). Herbicidas (glifosato, glufosinato), Insecticidas (spinosad), Medicamentos (dexametasona, ciprofloxacina)	A, J	Peltzer <i>et al.</i> , 2011, 2019, Agostini <i>et al.</i> , 2013; Cuzziol Boccioni <i>et al.</i> , 2020, 2021; 2022; Bahl <i>et al.</i> , 2021.
	OL/ Diafanización	Insecticidas (clorpirifos, cipermetrina, piricarbamato); Herbicidas (glifosato; atrazina; 2-4 D); Resinas epoxi (bisfenol, epiclorhidrina); Muestras ambientales (cama de pollo; agroecosistemas); Medicamentos (diclofenac)	L	Lajmanovich <i>et al.</i> , 2003; Brunelli <i>et al.</i> , 2009; Agostini <i>et al.</i> , 2010; Svartz & Pérez Coll, 2013; Hutler <i>et al.</i> , 2013, 2016; Pérez-Iglesias <i>et al.</i> , 2015, 2019; Babini <i>et al.</i> , 2016; Curi <i>et al.</i> , 2017, 2019; Natale <i>et al.</i> , 2018; Peltzer <i>et al.</i> , 2019; Barreto <i>et al.</i> , 2020
	OL/ Microscopía electrónica de Barrido	Muestras ambientales (agua); Resinas epoxi (epiclorhidrina); Herbicidas (2-4 D)	L, E	Herkovits <i>et al.</i> , 1996; Aronzon <i>et al.</i> , 2010; Hutler <i>et al.</i> , 2013, 2016; Ossana <i>et al.</i> , 2011
	Hibridación in situ de montaje completo con ácido retinoico	Herbicidas (glifosato)	E	Paganelli <i>et al.</i> , 2010
Índice hepato/gonad o somático	Balanza digital	Muestras ambientales (agua)	L	Ossana, 2011
<b>FISIOLÓGICOS</b>				
Tasa de depredación	Conteo de larvas	Insecticida (fenitroion)	L	Junges <i>et al.</i> , 2010
Función cardíaca	OL/transiluminación/ análisis digital (Software iMovie)	Insecticida (piriproxi-feno) Medicamentos (diclofenac); Derivados Plásticos (bisfenol), Dióxido de Cloro, Litio	L	Hutler <i>et al.</i> , 2016; Peltzer <i>et al.</i> , 2019, 2022, 2024; Lajmanovich <i>et al.</i> , 2019;
Producción de pellets fecales	Observación directa y cálculo de % cobertura	Litio	L	Peltzer <i>et al.</i> , 2024.
<b>ETOLÓGICOS</b>				
Comportamiento general/natación	OD/ Registro digital	Insecticidas (cipermetrina, clorpirifos, pirimicarbamato) Plomo, Zinc, Resinas epoxi (bisfenol), muestras ambientales (agroecosistemas)	L	Herkovits & Pérez-Coll, 1991; Brunelli <i>et al.</i> , 2009; Agostini <i>et al.</i> , 2010; Hutler <i>et al.</i> , 2016; Babini <i>et al.</i> , 2016; Natale <i>et al.</i> , 2018; Salinas, 2019; Barreto <i>et al.</i> , 2020
	Análisis digital de videos Softwares: Smart, MedeaLab	Herbicidas (glufosinato de amonio); Insecticidas (piretroides; imidazolinona, Piriproxi-feno) Otros plaguicidas (metaldehido); Medicamentos (diclofenac)	L	Peltzer <i>et al.</i> , 2013b, 2019; Pérez-Iglesias <i>et al.</i> , 2015; Attademo <i>et al.</i> , 2016; Lajmanovich <i>et al.</i> , 2018, 2019*
Alimentación	Observación directa			Hutler <i>et al.</i> , 2016
Vocalizaciones (canto de anuncio)	Registro acústico y análisis de sonogramas (Software Raven Pro)	Muestras ambientales (agroecosistemas*; contaminación acústica*)	A	Sánchez <i>et al.</i> , 2013; León <i>et al.</i> , 2019
<b>DE FUNCIONALIDAD ECOLÓGICA</b>				
Diversidad bacteriana de la microbiota intestinal	Pruebas bioquímicas y MALDI-TOF	Glifosato, Ciprofloxacina	L	Cuzziol Boccioni <i>et al.</i> , 2023
Dominancia bacteriana de la microbiota intestinal	Pruebas bioquímicas y MALDI-TOF	Glifosato, Ciprofloxacina	L	Cuzziol Boccioni <i>et al.</i> , 2023

### 1.5. Objetivos e hipótesis

El paradigma de las mediciones ecotoxicológicas que definen a distinta escala la toxicidad de los diferentes CPE en términos de relevancia biológica son sumamente necesarios ante el deterioro de los sistemas acuáticos, principalmente para aquellos organismos indicadores y de alerta temprana, como los anfibios (Peltzer *et al.*, 2023). Ante el riesgo ambiental de diversos contaminantes como herbicidas, insecticidas y antibióticos de uso veterinario, es fundamental ahondar en las consecuencias biológicas de la exposición tanto individual como combinada de estos compuestos. A raíz de esto, ha surgido esta tesis original cuyo objetivo general fue evaluar la toxicidad de distintos CPE de interés (herbicidas, insecticidas y antibióticos de uso veterinario) sobre biomarcadores bioquímicos, histológicos, morfológicos, y de funcionalidad ecológica de larvas de anuros.

Por lo antes expuesto, se establecieron los objetivos específicos que se describen a continuación, con sus correspondientes hipótesis derivadas.

- Determinar el efecto de los CPE seleccionados a nivel bioquímico en base a los niveles de hormona tiroidea y actividad de enzimas relacionadas al estrés oxidativo (GST) y neurotoxicidad (AChE).

*Hipótesis 1: La exposición crónica de larvas de anfibios a los CPE seleccionados produce alteraciones en los niveles de hormona tiroidea, así como en la actividad de la GST y AChE.*

- Analizar la respuesta hepática a los CPE seleccionados a través del estudio histológico de melanomacrófagos.

*Hipótesis 2: La exposición crónica de larvas de anfibios a CPE seleccionados produce alteraciones en la organogénesis del hígado.*

- Describir las respuestas morfológicas en las larvas frente a la exposición CPE seleccionados.

*Hipótesis 3: El desarrollo morfológico de anfibios anuros en su etapa larval resulta afectado por los CPE seleccionados.*

- Comprobar si la exposición de las larvas a CPE seleccionados altera la funcionalidad ecológica de la microbiota bacteriana intestinal normal.

*Hipótesis 4: La exposición de las larvas a CPE seleccionados provoca una alteración en la composición de la microbiota bacteriana intestinal.*

- Evaluar la variación en la sensibilidad de las bacterias intestinales de las larvas expuestas a CPE seleccionados.

*Hipótesis 5: La exposición de las larvas a los CPE seleccionados altera la sensibilidad de la microbiota bacteriana intestinal a mismos contaminantes a los que fueron expuestos, convirtiéndolas en importantes reservorios de microorganismos resistentes.*





## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

**2.1. Especie en estudio**

**2.2. Contaminantes**

**2.3. Diseño experimental: Bioensayos**

**2.4. Selección de biomarcadores**

**2.5. Estadística y análisis numéricos**

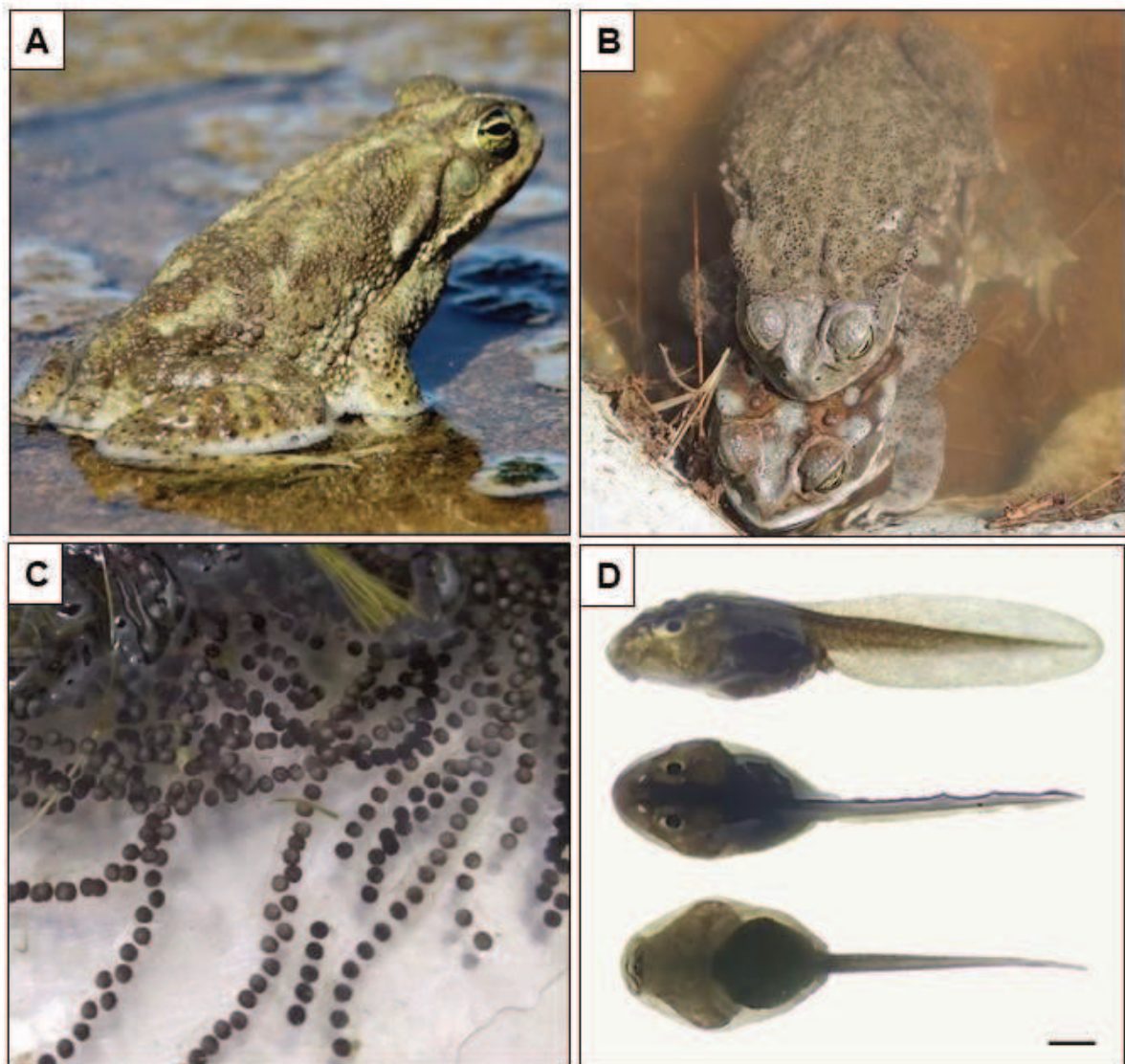
## 2.1. Especie en estudio

Para el desarrollo de los bioensayos, se seleccionó la especie *R. arenarum* (Hensel, 1867), vulgarmente conocida como “sapo común”. Las características ecológicas de esta especie como su representatividad en la región, su filopatria y su flexibilidad en el tipo de ambiente que habita, así como su sensibilidad a los cambios ambientales, permiten valorarla como especie centinela (Otero *et al.*, 2023). Además, su fácil manejo y buena adaptación a condiciones de laboratorio la convierten en una de las especies locales más utilizadas para estudios ecotoxicológicos (Kwet *et al.*, 2004)

Los adultos de la especie son de cuerpo robusto y verrugoso, de tamaño mediano a grande. Por lo general presentan dimorfismo sexual en cuanto al tamaño corporal, siendo las hembras más grandes que los machos (♀: 9,3-14 cm, ♂: 8,8-10,8 cm; Gallardo, 1974). El patrón de coloración dorsal varía entre marrón, verde oliváceo a gris, uniforme sin manchas o con manchas irregulares de color verde claro a amarillento, dependiendo de la población, estacionalidad y fisiología (Aronzón, 2013). El patrón ventral es uniforme, blancuzco, gris o amarillo verdoso (**Figura 5 A**). La cabeza es ancha, con hocico corto y redondeado tanto en vista dorsal como de perfil. Los ojos presentan pupila horizontal e iris de color amarillo oscuro a cobrizo. Las glándulas parotoideas, de contorno irregular y alargadas, están bien desarrolladas y se extienden más allá de las axilas (Ceí, 1980). Los machos poseen saco vocal simple de color azulado.

Como la mayoría de los anuros, *R. arenarum* presenta un ciclo de vida que comprende un período embrionario y larval acuáticos, y un período juvenil y adulto menos dependientes del agua. Los adultos tienden a ocultarse durante la mayor parte del año en refugios naturales, bajo rocas, en cañerías o bajo tierra, de modo que es difícil verlos. Hibernan desde junio hasta agosto, y son unos de los primeros anfibios en emerger. Se reproducen a partir de agosto-septiembre, hasta abril. El modo de oviposición más común en el género *Rhinella* consiste en la deposición de huevos en ristras o cordones gelatinosos (Pereyra *et al.*, 2015). En particular, la especie *R. arenarum* es considerada reproductora oportunista o explosiva, debido a que su comportamiento de apareamiento se desencadena con el comienzo de las fuertes lluvias de primavera-verano (Gallardo, 1974). Durante el período reproductivo, los machos cantan tanto de día como de noche semisumergidos o en la orilla de cuerpos de agua dulce temporarios o semipermanentes formados como consecuencia de la actividad pluvial. En el amplexo axilar, la hembra puede depositar hasta 40.000 ovocitos (Aronzón, 2013; **Figura 5 B**). Los huevos, de color oscuro, quedan dispersos en el agua en cordones gelatinosos (ristras) que se adhieren a objetos sumergidos (Pereyra *et al.*, 2015). Los embriones son pigmentados y pueden llegar a observarse dentro del cordón gelatinoso (Del Conte & Sirlin, 1952; **Figura 5 C**). Las larvas

son de vida libre y capaces de alimentarse por sí mismos. Presentan ojos dorsales, espiráculo (abertura que permite la salida del agua bombeada dentro de la cavidad bucofaríngea para la alimentación y respiración) de apertura posterior y aleta caudal medianamente desarrollada (Ceï, 1980). Tanto el cuerpo como la cola son oscuros (**Figura 5 D**). Son de hábitos bentónicos, hallándose principalmente en el fondo de charcas y lagunas. La alimentación es de tipo herbívora detritívora, compuesta mayormente de microalgas, restos vegetales y pequeños invertebrados (Ceï, 1980; Lajmanovich, 2000), aunque se reportaron casos de canibalismo bajo condiciones de estrés (Raices, 2018).



**Figura 5.** Especie en estudio, *Rhinella arenarum*. **A.** Adulto; **B.** Amplexo axilar; **C.** Ristra de huevos; **C.** Detalle lateral, dorsal y ventral de renacuajo; escala 1 mm.

*Rhinella arenarum* se distribuye por la región costera del sur de Brasil, este y sur de Uruguay, región central de Bolivia (al este de los Andes), Argentina y probablemente Paraguay, desde el nivel del mar hasta los 2.600 m de altitud (Frost, 2024). En Argentina se encuentra en casi todas las provincias, con excepción de Corrientes, Formosa, Misiones, Santa Cruz y Tierra del Fuego (Vaira *et al.*, 2012). La especie habita en un amplio rango de hábitats, incluyendo ambientes costeros, bosques tropicales y subtropicales, regiones montañosas, pedemontanas, de estepa, monte y espinal, encontrándose tanto en ambientes naturales como en áreas urbanas y periurbanas (Bionda *et al.*, 2011).

Actualmente el sapo común se encuentra categorizado como especie de “preocupación menor” según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2020) y como “no amenazada” según la Categorización de Anfibios de Argentina (Vaira *et al.*, 2012). La especie está adaptada a ambientes perturbados, y es capaz de vivir y poner huevos en ambientes fuertemente antropizados. Sin embargo, al igual que para otros anfibios, las principales amenazas de la especie son la degradación, fragmentación y contaminación de su hábitat debido a la agricultura y urbanización. Múltiples estudios reportaron que ésto representa una amenaza por la exposición a contaminantes químicos, productos industriales, agroquímicos y pesticidas que pueden resultar tóxicos y ocasionar anormalidades tanto en larvas como en adultos, reducir el crecimiento o causar la muerte (e.g., Casco *et al.*, 2006; Bionda *et al.*, 2012, 2018; Aronzón, 2013). La especie *R. arenarum* ha sido muy utilizada como animal modelo en estudios de laboratorio para análisis fisiológicos, anatómicos y toxicológicos (e.g., Farias *et al.*, 2003; Cabagna *et al.*, 2005; Brodeur *et al.*, 2009; Yslas, 2016; Pérez Coll *et al.*, 2017; Sotelo *et al.*, 2019). Además, es considerada un importante controlador biológico, debido a que son enemigos naturales de muchas especies de insectos perjudiciales para los cultivos (e.g., Attademo *et al.*, 2005).

Para este estudio, se recolectaron ristras de huevos de *R. arenarum* durante los meses de primavera verano del período 2019-2021 en estanques temporales de la llanura aluvial natural del Río Paraná (31° 39' 45" S, 60° 34' 36" O, y 31° 11' 31" S, 60° 9' 29" O, **Figura 6**) considerados libres de contaminación en previas investigaciones (Lajmanovich *et al.*, 2019; Cuzziol Boccioni *et al.*, 2021; 2023). Los experimentos con embriones y larvas siguieron las regulaciones de ASIH (2004). Para los individuos que tuvieron que ser sacrificados, se utilizó una solución de 0.1% de tricaina metanosulfonato (TMS, MS-222) tamponada a pH 7.8 con NaHCO<sub>3</sub> siguiendo el protocolo de la Guía de Eutanasia Animal propuesta por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC), y el del comité de bioética de la FBCB-UNL (Res. N° 388/06).





**Figura 6.** Sitios de recolección de huevos de *R. arenarum* durante la temporada reproductiva de la especie.

## 2.2. Contaminantes

Los tratamientos para cada bioensayo fueron preparados a partir de formulados comerciales de distintos contaminantes, ya que es la forma en la que se aplican e introducen al ambiente, y por lo tanto representan un escenario más realista (Lionetto *et al.*, 2016). Considerando que los coadyuvantes -muchas veces no especificados- también pueden contribuir al efecto de los compuestos sobre los organismos (Relyea & Jones, 2009; Lajmanovich *et al.*, 2010), se considera el estudio de las formulaciones comerciales de mayor relevancia ecológica que los ingredientes activos por sí mismos. Los productos comerciales utilizados para los bioensayos se resumen en la **Tabla 2**. Las concentraciones nominales ensayadas pretendieron representar escenarios realistas de estos contaminantes, factibles de ocurrir simultáneamente en los estanques de reproducción de anfibios (por ejemplo, sistemas acuáticos lénticos, humedales de aguas residuales, otros; Cuzziol Boccioni *et al.*, 2021). Para la elección de las concentraciones a ensayar, se han tenido en cuenta las concentraciones ambientalmente relevantes de los compuestos, pero también las relacionadas con los hábitats

de los anfibios (pequeñas charcas temporales) donde los niveles de los contaminantes pueden ser aún más elevados. Se consideraron también los “peores escenarios” de contaminación para las larvas de anfibios silvestres (Mann & Bidwell, 1999), correspondientes a los niveles de plaguicidas después de una pulverización de herbicida a base de glifosato (HBGLI) directa en una pequeña masa de agua superficial (de 5 a 10 cm de profundidad) a la tasa máxima de aplicación autorizada (valores registrados de aproximadamente 21 mg L<sup>-1</sup> de HBGLI). Además, considerando que los HBGLI y herbicida a base de glufosinato de amonio (HBGA) se aplican a tasas similares (entre 600–980 g de ingrediente activo por hectárea; Costa *et al.*, 2018) y que tienen un potencial similar para contaminar las aguas superficiales (0,031 y 0,064 % del ingrediente activo aplicado, respectivamente; Screpanti & Accinelli, 2005), los peores escenarios en los estanques temporales donde habitan naturalmente las larvas, serían similares para ambos compuestos (Lajmanovich *et al.*, 2022).

**Tabla 2.** Productos comerciales empleados para los bioensayos, con su correspondiente composición y concentración nominal ensayada.

Formulado comercial	Composición	Vida media	Bioensayo	Concentración
Herbicida a base de Glufosinato de amonio Timón® Chimagro	20% p/v glufosinato de amonio en 100 ml de solución	3-10 días (Behrendt <i>et al.</i> , 1990)	I	2,5 mg L <sup>-1</sup>
Herbicida a base de Glifosato Mifós® Chemotecnica	48 g glifosato en 100 ml de coformulantes	7-142 días (Annett <i>et al.</i> , 2014)	I	2,5 mg L <sup>-1</sup>
Herbicida a base de Glifosato Roundup Ultramax® Monsanto	Equivalente a ≈80 g de glifosato monoamonio en 1 kg de coformulantes		II	2,5 mg L <sup>-1</sup>
Insecticida a base de Clorpirifós Manchester® Feit y Olivari S.A	10,5 g de Clorpirifós en 100 ml de compuestos inertes	35-78 días (Kamrin, 1997)	II	2,5 µg L <sup>-1</sup>
Antibiótico ciprofloaxina Ciriax® Megalabs	200 mg de ciprofloxacina en 100 ml de solución	60 horas (Cardoza <i>et al.</i> , 2005)	II	100 µg L <sup>-1</sup>

Antibiótico	amoxicilina	1000 mg amoxicilina en 1 g	$\approx 7$ days	II	$100 \mu\text{g L}^{-1}$
Amoxidal®	Roemmers		(Längin et al., 2009)		

### 2.3. Diseño experimental: Bioensayos

Dada la complejidad de las matrices ambientales en cuanto a la variedad de contaminantes que coexisten, los bioensayos apuntaron a la evaluación de posibles mezclas factibles en sistemas cultivo-ganaderos donde los plaguicidas se aplican a los cultivos mientras que los medicamentos veterinarios son suministrados al ganado. Estos compuestos se acumulan en los cuerpos de agua donde se reproducen los anfibios anuros de la región (lagunas semipermanentes y permanentes), por lo que han sido considerados como escenarios *in situ* de exposición crónica durante su desarrollo larval (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2021).

Previo a la realización de los bioensayos, se indagó acerca de la información disponible para definir las concentraciones de los contaminantes a utilizar. Se seleccionaron concentraciones ambientalmente relevantes de los compuestos en las matrices acuáticas, valores de concentración de no-efecto (NOEC) y concentración más baja a la cual se observa efecto (LOEC), así como de concentración letal media (CL50) para organismos semejantes.

Los bioensayos tuvieron una duración de 45 días, y consistieron en tratamientos con contaminantes individuales y tratamientos con mezclas. Si bien cada bioensayo fue independiente y llevado a cabo en períodos independientes y con distintos individuos, fueron ejecutados bajo las mismas condiciones:

- Tuvieron lugar en el módulo experimental del Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (**Figura 7**).
- Durante su ejecución, el módulo se mantuvo un fotoperíodo programado de 12h:12h luz-oscuridad, temperatura de  $25 \pm 1$  °C.
- Se empleó agua declorinada de red (AD, pH  $7.4 \pm 0.05$ , conductividad de  $162 \pm 10.5 \mu\text{mhos cm}^{-1}$ , concentración de oxígeno disuelto  $6.5 \pm 1.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) para la preparación de soluciones correspondientes a los distintos tratamientos, y también como control negativo en todos los bioensayos.
- Fueron de carácter semiestático, con renovación de soluciones cada 48 hs.
- En todos los casos, cuando los organismos alcanzaron el estadio de Gosner (EG, Gosner, 1960) 23–24 se proporcionaron raciones de aproximadamente 0,2 g de lechuga orgánica hervida por recipiente cada 48 h.



**Figura 7.** Módulo experimental durante la preparación de ensayos.

### 2.3.1. Bioensayo con herbicidas

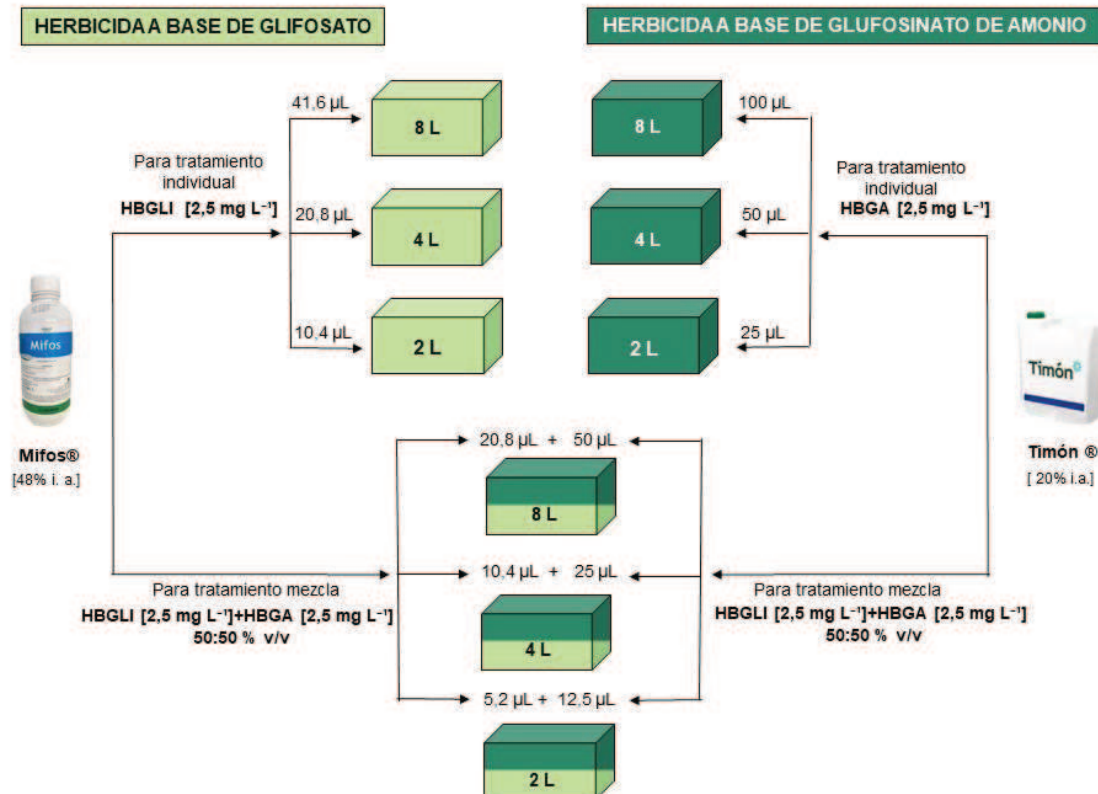
En este bioensayo (definido de aquí en más como Bioensayo I) se utilizó el herbicida a base de glifosato (HBGLI) Mifós® y el herbicida a base de glufosinato de amonio (HBGA) Timón®. La evaluación de la mezcla de ambos compuestos resulta relevante dado que su coexistencia en los ambientes es cada vez más frecuente por su uso combinado en los cultivos genéticamente modificados resistentes a ambos herbicidas, o a al menos alguno de ellos (Lajmanovich *et al.*, 2022). Se establecieron cuatro tratamientos para el Bioensayo I: Control negativo (CO); HBGLI ( $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), HBGA ( $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y HBGLI+HBGA (Mezcla 50:50% v/v de los tratamientos individuales). Las soluciones fueron preparadas con AD como se muestra en la **Figura 8**.

En primera instancia, se dispusieron aproximadamente 100 huevos en peceras con 8 L de solución para cada tratamiento, por duplicado. Cuando los organismos alcanzaron el EG 23-24, se administraron raciones de aproximadamente 0,2 g de lechuga hervida cada 48 horas y se redujo el volumen de cada recipiente a la mitad (4 L). Al cabo de 12 días, el volumen se redujo nuevamente a la mitad (2L). El ensayo crónico finalizó a los 45 días, cuando la mayoría de los individuos del control alcanzaron los estadios 31- 34 (prometamorfosis). Se obtuvieron muestras y fotografías para el análisis morfológico a las 48 horas, a los 12 y 45 días de



exposición. También se fijaron muestras para análisis de biomarcadores bioquímicos al finalizar el ensayo.

En paralelo a la finalización del ensayo crónico se realizó un ensayo agudo de 48 horas de exposición a los mismos tratamientos del ensayo crónico, con individuos en EG 31-34, a fines de obtener muestras de contenido intestinal para el análisis bacteriológico.



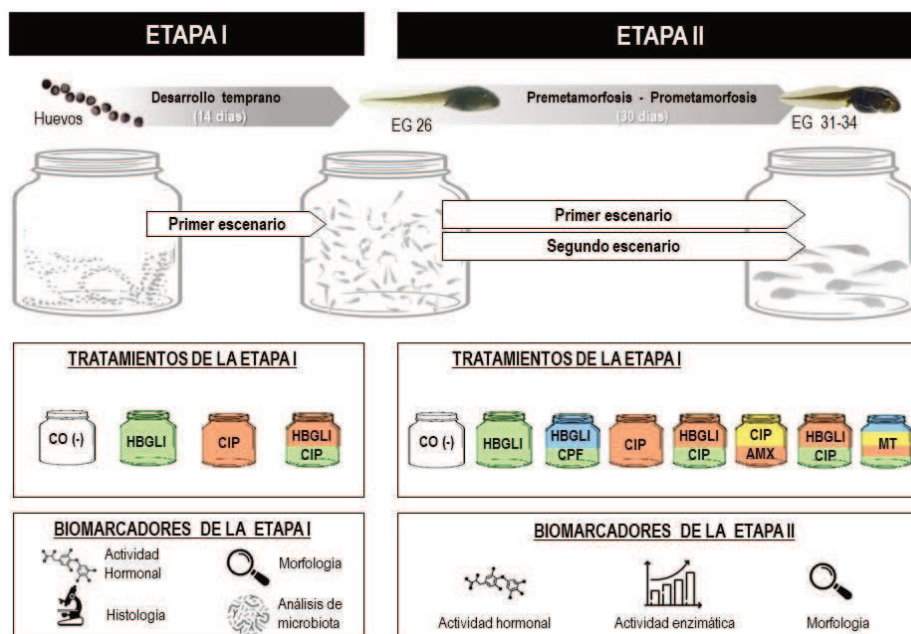
**Figura 8.** Preparación de soluciones para el bioensayo I con herbicida a base de glifosato (HBGLI) y herbicida a base de glufosinato de amonio (HBGA).

### 2.3.2. Bioensayo con herbicida, insecticida y antibióticos.

Este bioensayo (Bioensayo II) consistió en dos etapas definidas como dos escenarios de contaminación diferentes a los que pueden estar expuestos los organismos durante el desarrollo larval, dada la asincronía en la que pueden aplicarse los distintos productos como también a la que pueden llegar a los cuerpos de agua. Se trabajó con el HBGLI Roundup Ultramax®, el insecticida CP Manchester®, y los antibióticos CIP Ciriax® y AMX Amoxidal® previamente detallados en la tabla formulados comerciales.

### 2.3.1.1. Primerar etapa de exposición: herbicida y antibiótico










La primera instancia del Bioensayo II (definida como Etapa I) representa un primer escenario de contaminación con HBGLI y a CIP. Huevos de *R. arenarum* (EG 1-5) fueron expuestos durante su desarrollo temprano a HBGLI [2,5 mg L<sup>-1</sup>] y CIP [100 µg L<sup>-1</sup>], tanto individualmente como en mezcla 50:50% como se detalla en la **Figura 9** y **Tabla 3**.



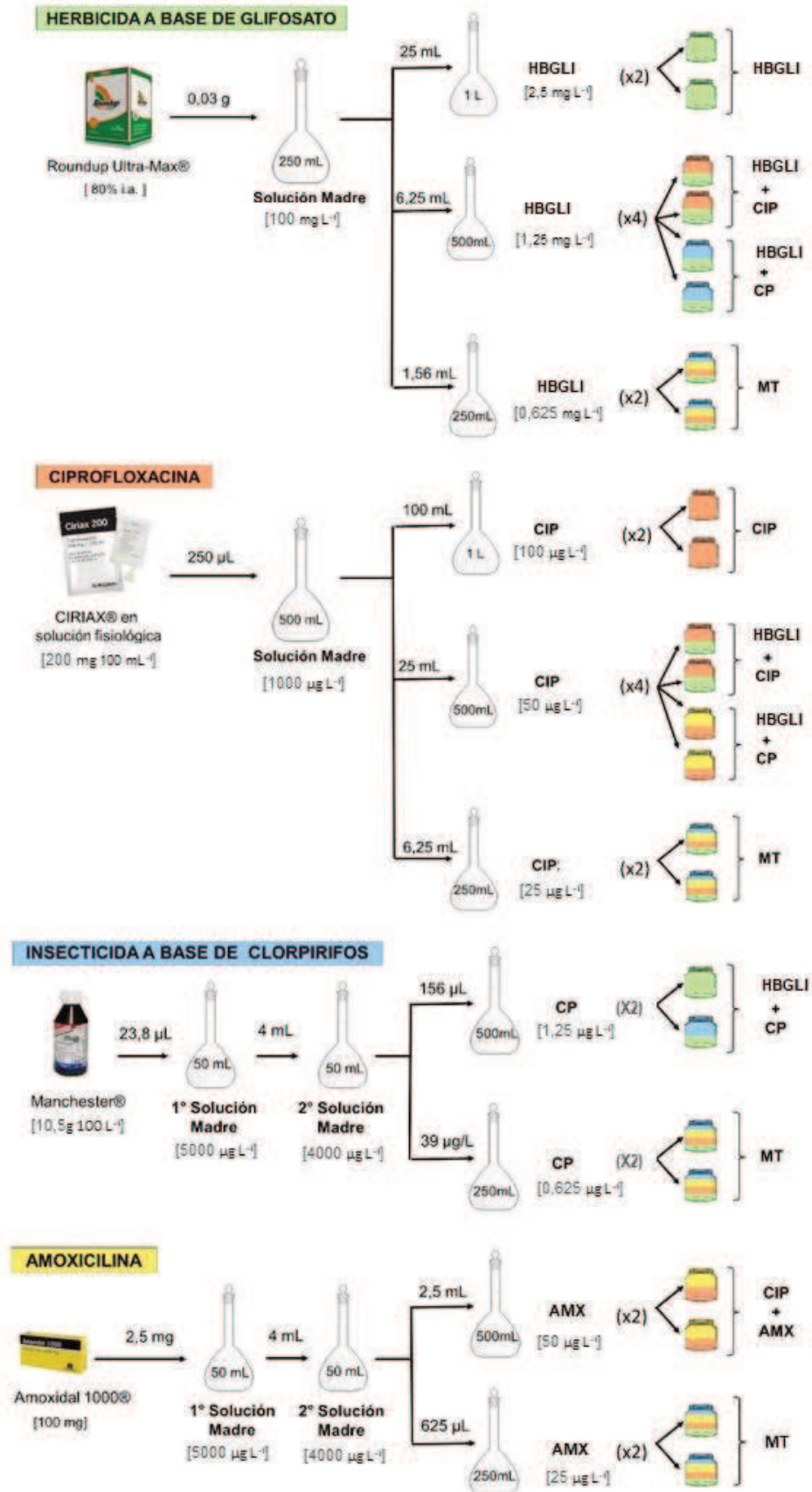
**Figura 9.** Diseño experimental del bioensayo II con herbicida a base de glifosato (HBGLI), ciprofloxacina (CIP), clorpirifós (CP) y amoxicilina (AMX).

Se expusieron fragmentos de ristras de huevos de *R. arenarum* (aproximadamente 100 huevos) en recipientes de vidrio de 1 L (12,5 cm de diámetro, 13,5 cm de altura) con las soluciones correspondientes a cada tratamiento. Las soluciones fueron preparadas con AD como se muestra en la **Figura 10**. El experimento se mantuvo en condiciones de laboratorio: 12/12 h (ciclos luz N100 Lx/fotoperiodo oscuridad) a 24±2 C° y pH 7.4±0.2. Los matraces se revisaron cada 48 h para eliminar los huevos y embriones muertos. Estos se consideraron muertos cuando no hubo eclosión, los huevos grisáceos que diferían de los vivos se consideraron no viables y los embriones inmóviles se consideraron muertos después de un estímulo con una varilla de vidrio. Este primer escenario se mantuvo durante dos semanas, al final de las cuales aproximadamente el 90% de las larvas control alcanzaron GS 26 (el comienzo de la premetamorfosis). Al final de este primer escenario, se recolectaron aleatoriamente individuos de cada tratamiento y control (CO) para el análisis de biomarcadores morfológicos, histológicos y hormonales, así como de la microbiota bacteriana intestinal. Los restantes individuos, excepto aquellos con anomalías externas visibles, continuaron al segundo escenario.

**Tabla 3.** Tratamientos de la primera y segunda etapa del bioensayo II, detallando los compuestos utilizados, concentraciones nominales y mezclas. HBGLI: herbicida a base de glifosato, CIP: ciprofloxacina; CP: clorpirifós, AMX: amoxicilina; MT: mezcla cuaternaria de todos los compuestos.

PRIMERA ETAPA	SEGUNDA ETAPA
<b>HBGLI</b> [2.5 mg L <sup>-1</sup> ] 	<b>HBGLI</b> [2.5 mg L <sup>-1</sup> ] 
	<b>HBGLI+ CP</b> [2.5 mg L <sup>-1</sup> ] + [2.5 µg L <sup>-1</sup> ] en 50:50% v/v 
<b>CIP</b> [100 µg L <sup>-1</sup> ] 	<b>CIP</b> [100 µg L <sup>-1</sup> ] 
	<b>CIP+ AMX</b> [100 µg L <sup>-1</sup> ] + [100 µg L <sup>-1</sup> ] en 50:50% v/v 
<b>HBGLI+CIP</b> [2.5 mg L <sup>-1</sup> ] + [100µg L <sup>-1</sup> ] en 50:50% v/v 	<b>HBGLI+ CIP</b> [2.5 mg L <sup>-1</sup> ] + [100 µg L <sup>-1</sup> ] en 50:50% v/v 
	<b>HBGLI+ CP + CIP + AMX</b> [2.5 mg L <sup>-1</sup> ] + [2.5 µg L <sup>-1</sup> ] + [100 µg L <sup>-1</sup> ] + [100 µg L <sup>-1</sup> ] en 25:25:25:25% v/v 

Cada fila que indica un tratamiento del primer escenario tiene su correspondencia con dos tratamientos del segundo escenario. Cada grupo de organismos para un tratamiento dado del primer escenario de contaminación continuó su exposición en el segundo escenario de contaminación en dos partes: un subgrupo estuvo expuesto al mismo tratamiento en el primer escenario y el otro subgrupo estuvo expuesto a la mezcla de los anteriores con los nuevos compuestos adicionados en la segunda etapa.



**Figura 10.** Preparación del bioensayo II con herbicida a base de glifosato (HBGLI), ciprofloxacina (CIP), Clorpirifós (CP) y amoxicilina (AMX).

### 2.3.2.2. Segunda etapa de exposición: herbicida, insecticida y antibióticos

Las larvas previamente expuestas a los tratamientos del primer escenario se sometieron a una segunda etapa del Bioensayo II, que se llevó a cabo siguiendo la misma metodología y condiciones de laboratorio. En este ensayo se agregaron dos nuevos químicos a los ya evaluados. Así, las larvas del primer escenario se dividieron en dos grupos, como se muestra en **Tabla 2**: uno de ellos continuó con los tratamientos del primer escenario (Etapa I), mientras que el otro grupo fue expuesto a nuevos tratamientos químicos (Etapa II): mezclas binarias de un HBGLI y el insecticida CP, y dos antibióticos (CIP y AMX), y sus mezclas cuaternarias (HBGLI+CP+CIP+AMX). Cada tratamiento se ensayó en las concentraciones nominales que se muestran en la tabla.

Este segundo ensayo de toxicidad se realizó por triplicado, utilizando los matraces y el volumen de solución posterior a la eclosión del primer escenario (1000 mL), y 20 larvas (GS 26±1) por matraz. Todas las soluciones de prueba se prepararon antes de su uso y se reemplazaron cada 48 h. El ensayo del segundo escenario de contaminación finalizó cuando más del 90% (4 semanas) de las larvas en los grupos CO alcanzaron la prometamorfosis (GS 31-34). Los individuos fueron fijados para el análisis morfológico y bioquímico (enzimas y hormonas tiroideas).

## 2.4. Selección de biomarcadores

### 2.4.1. Biomarcadores bioquímicos

Se evaluaron los niveles de hormona tiroidea (tiroxina, T4) a los finales de la primer y segunda etapa del primer bioensayo (mezcla de herbicida, insecticida y medicamentos), y al final del segundo bioensayo (mezcla de herbicidas). Además, al concluir ambos bioensayos, también se evaluaron los niveles enzimáticos de la Glutathion-S-transferasa (GST) y Acetilcolinesterasa (AChE). Dado el pequeño tamaño de las larvas y las dificultades para recolectar suficiente volumen de sangre para todas las determinaciones, los biomarcadores bioquímicos se midieron en el sobrenadante de homogenatos de todo el cuerpo (método ampliamente empleado por otros autores y en análisis previos en nuestro laboratorio (por ejemplo, Gancedo *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2016; Lajmanovich *et al.*, 2019; Cuzziol Boccioni *et al.*, 2021). Para las determinaciones se homogeneizaron de 5 a 10 ejemplares de cada tratamiento, a una temperatura entre 0 y 4°C, con un homogeneizador teflón-vidrio y en una solución tampón Tris-HCl de pH 6,8. Luego de la centrifugación de la muestra, el sobrenadante se empleó para las determinaciones.

Los niveles totales de T4 se midieron utilizando kits de inmunoensayo electroquimioluminiscente ligado a enzimas (ECLIA) (COBAS®, Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite de detección fue de  $2,1 \text{ ng g}^{-1}$ .

La actividad de GST se determinó espectrofotométricamente mediante el método descrito por Habig *et al.* (1974) adaptado por Habdous *et al.* (2002) para la actividad de GST en suero de mamíferos. El ensayo enzimático se realizó a 340 nm en 100 mM de tampón fosfato de sodio (pH = 6,5), 20  $\mu\text{M}$  de 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB), y 50  $\mu\text{M}$  de glutatión reducido (GSH). Los ensayos de cinética enzimática se realizaron a 25 °C y la actividad GST completa se expresó como  $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína utilizando un coeficiente de extinción molar de  $9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

La actividad de AChE se determinó colorimétricamente siguiendo el procedimiento de Ellman *et al.* (1961). La mezcla de reacción (volumen final = 930  $\mu\text{L}$ ) consistió en Tris-HCl 25 mM que contenía  $\text{CaCl}_2$  1 mM (pH = 7,6), 10  $\mu\text{l}$  de yoduro de acetiltiocolina 20 mM (AcSCh) y 50  $\mu\text{l}$  de DTNB (concentración final  $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ). La variación en la densidad óptica se registró a 410 nm durante 1 minuto a 25 °C utilizando un espectrofotómetro UV-VIS JENWAY 6405. Las actividades de AChE se expresaron como  $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína utilizando un coeficiente de extinción molar de  $13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 2.4.2. Biomarcadores histológicos

Se destinaron cinco individuos de cada tratamiento al análisis histológico. Los mismos fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol (50, 70, 80, 96 y 100 % y butílico), aclarados en butilo-parafina e incluidos en parafina para la confección de tacos (Humason, 1962). El cuerpo completo de los individuos se cortó seriadamente en secciones transversales de 5-7  $\mu\text{m}$  de espesor con un micrótopo rotatorio manual Erma T20. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Los cortes se observaron y fotografiaron bajo un microscopio Arcano L1200B HTG equipado con una cámara digital Sony DSC-W55. La técnica histológica se resume en la **Figura 11**.

Se analizaron los cortes seriados e identificaron los principales tejidos y órganos en base a Casco & Lajmanovich (1999); Gürkan & Hayretdağ (2012); Cakici (2015), y Sayed & Younes (2017) como se muestra en la **Figura 12**. La configuración estructural y disposición de los órganos observada en los individuos control fue comparada con la de los individuos tratados en busca de alteraciones estructurales.



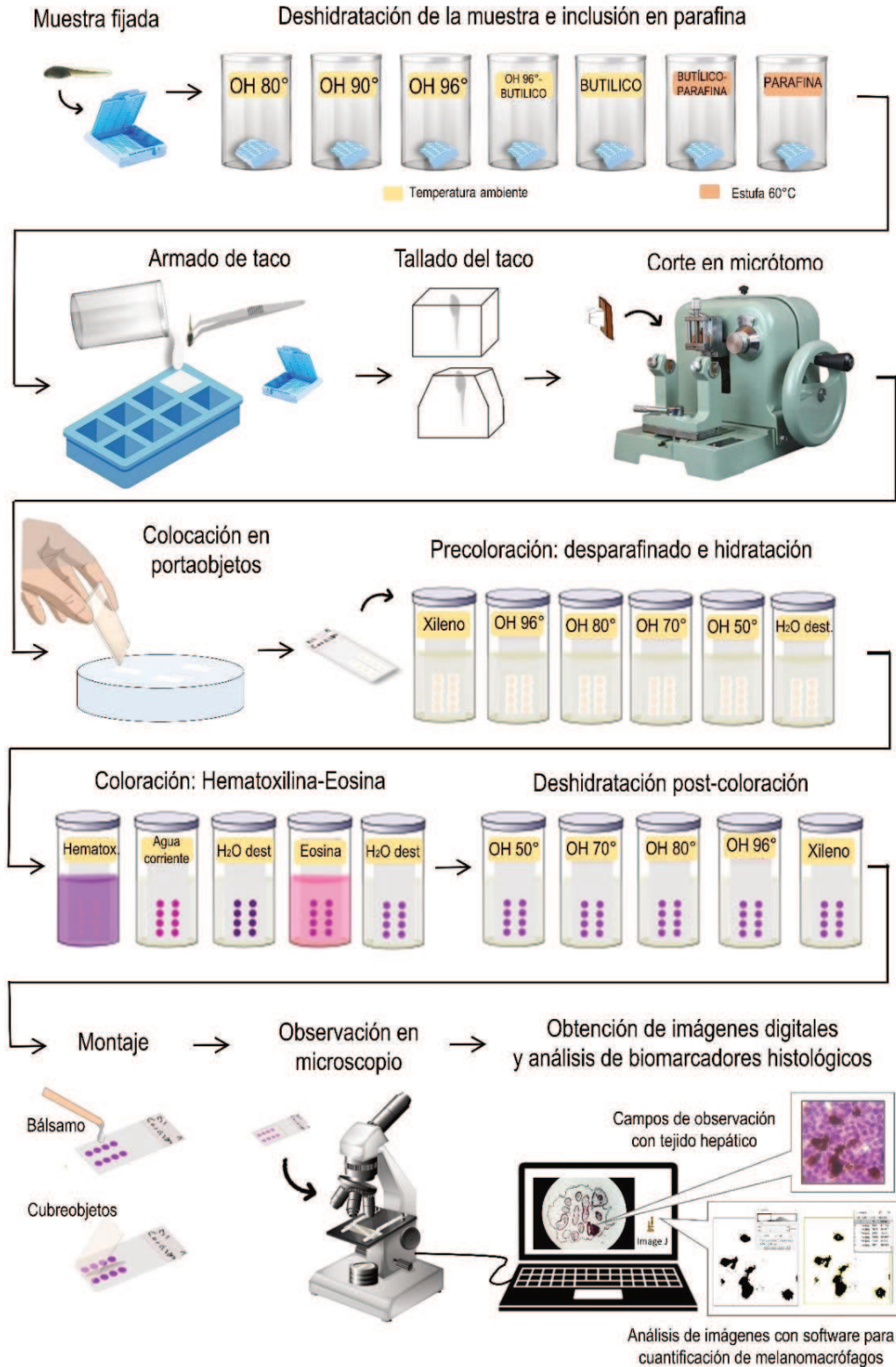
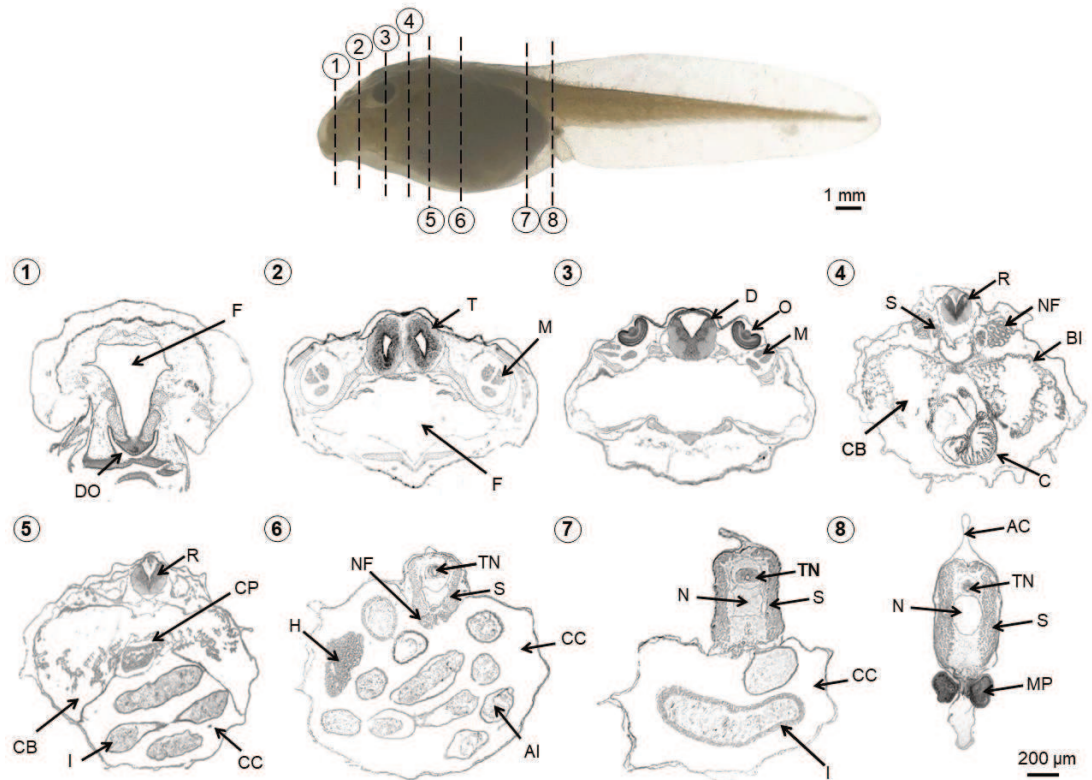


Figura 11. Resumen del procedimiento para la obtención y análisis de muestras histológicas.



**Figura 12.** Esquemas de la configuración general interna de la larva de *R. arenarum* en sección transversal. Referencias: DO: disco oral con dientes córneos; F: faringe; T: telencéfalo; M: Músculos; D: diencéfalo; R: rombencéfalo; O: ojo; M: paquetes de fibras musculares; S: somito; TN: tubo neural; NF: tubulos nefríticos; BI: branquias internas; CB: cámara branquial; C: corazón; CP: cavidad pericárdica; CC: Cavidad celómica; AI: asas intestinales; H: hígado; I: intestino; N: notocorda; AC: aleta caudal; MP: paquete muscular de las extremidades posteriores.

Además, con el fin de cuantificar el efecto de los compuestos a nivel tisular, se estudiaron los melanomacrófagos hepáticos (MM) ante la exposición a los distintos tratamientos, a través del cálculo del porcentaje del área hepática ocupada por MM (%AH) y el tamaño promedio de los MM (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2020). La cantidad de MM no fue evaluada ya que dicho parámetro depende de la magnificación que se considere para el campo de observación. Para cada individuo, se analizaron 5 secciones no consecutivas del hígado según el protocolo de Chai *et al.* (2017) para mediciones histomorfométricas. Los cortes fueron observados en microscopio óptico convencional a 400X de magnificación. Los campos de observación fueron fotografiados digitalmente y procesados con el programa ImageJ. Se hicieron los correspondientes ajustes de Threshold tanto para la cuantificación de MM como para la determinación del área hepática total por campo y el %AH ocupada por MM. El %AH se calculó para cada campo como: (suma del área de los MM contabilizados en un campo) x100



/ área hepática total (adaptado de Basilone *et al.*, 2018). El tamaño promedio de los MM se calculó como: (suma total de las áreas de cada MM de un campo) / cantidad de MM contabilizados en un campo.

#### 2.4.3. Biomarcadores morfológicos

En las distintas instancias mencionadas de ambos bioensayos, se colectaron al azar 10 individuos de cada tratamiento para el análisis morfológico. Los organismos fueron fijados en Formaldehído 10% y preservados en alcohol 70%. Los individuos fueron pesados en balanza digital (peso seco en g) y evaluados bajo lupa estereoscópica para determinar la longitud corporal (en mm), el EG y la presencia de posibles anomalías macroscópicas. Las anormalidades registradas incluyeron visibles externamente alteraciones en todo el cuerpo, así como en órganos específicos, según las clasificaciones de Svartz *et al.* (2016) y Peltzer *et al.* (2013; 2019). La aparición de anomalías morfológicas se reporta como el porcentaje de individuos de cada tratamiento que presentan cada tipo de anormalidad.

Al considerando que el desarrollo temprano es un período crítico durante el cual tienen lugar la organogénesis y morfogénesis (Peltzer *et al.*, 2017; 2019, Sandoval *et al.*, 2022), se evaluó la frecuencia de anomalías morfológicas. Para obtener la tasa de anomalías morfológicas, fueron tomadas tres fotografías de cada tanque de cada tratamiento en vista superior con cámara digital. Las fotografías fueron evaluadas a través del software de imágenes Image J para el conteo de individuos, identificando aquellos de aspecto normal y con alguna alteración visible para el cálculo de la tasa de alteraciones morfológicas en cada tratamiento.

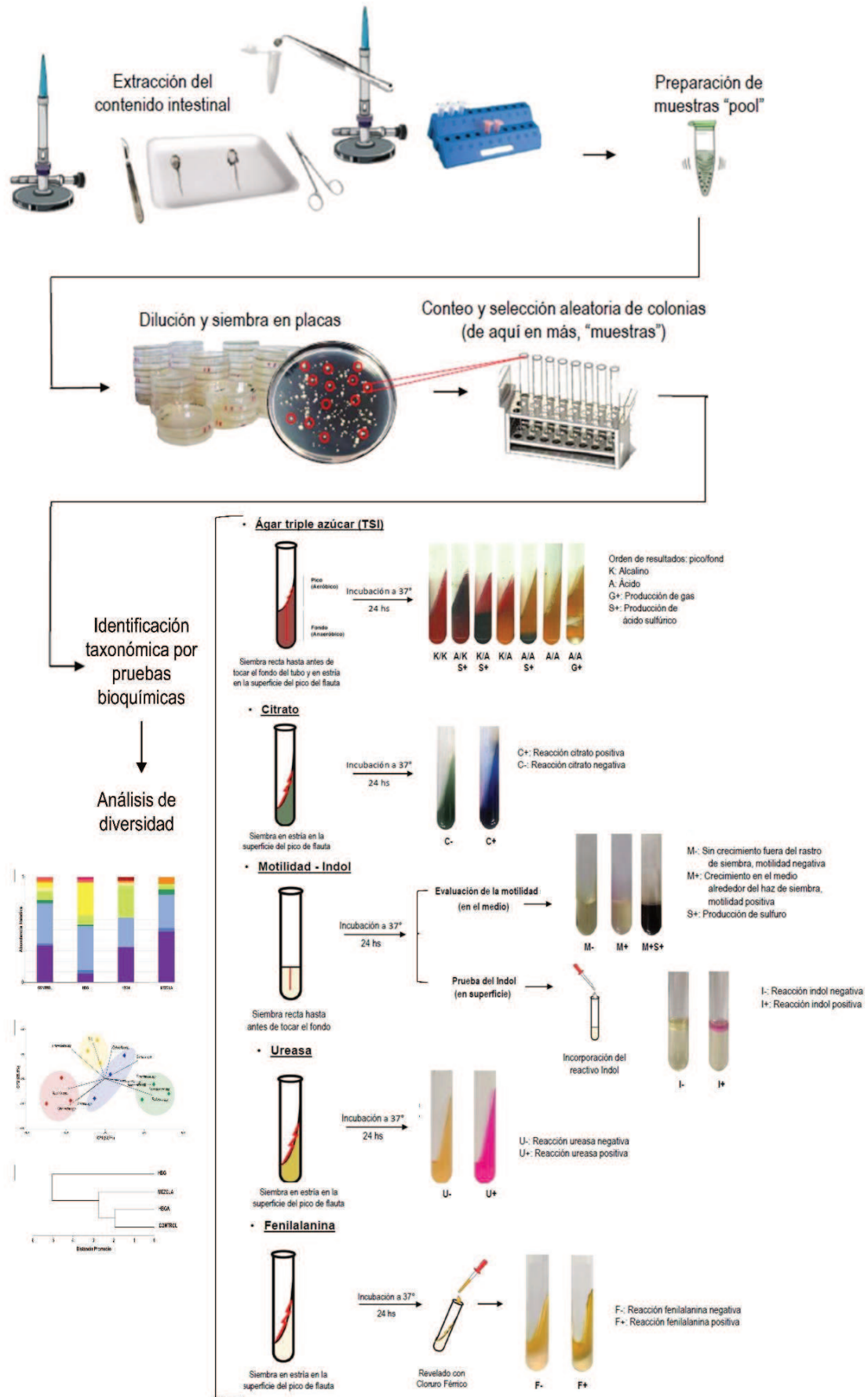
#### 2.4.4. Biomarcadores bacteriológicos

##### 2.4.4.1. Análisis de diversidad bacteriana intestinal

El procedimiento llevado a cabo para el análisis de la microbiota bacteriana se resume en la **Figura 13**. Para la evaluación de la microbiota intestinal de las larvas en cada tratamiento, de cada réplica se extrajeron y pesaron los tractos intestinales de 5 individuos (EG 26-27), y se agruparon en una única muestra “pool” debido al poco volumen de tejido (siendo en total, 3 muestras “pool” para cada tratamiento). Las muestras “pool” se homogeneizaron en 500 µl de agua de peptona estéril usando perlas de vidrio estériles (425-600 µm de diámetro) para la rotura de las paredes intestinales. Se colocaron diluciones en serie (hasta 1/10000) de intestinos homogeneizados en placas de agar nutritivo (pluripeptona al 0,5%; extracto de carne al 0,3%; NaCl al 0,8%, agar bacteriológico al 2%) y se incubaron a 37 ° C durante 24 h. Teniendo en

cuenta esta metodología, cabe aclarar que, aunque la microbiota intestinal comprende una gran diversidad de microorganismos, en el desarrollo de esta tesis el uso del término se limitará a la microbiota bacteriana cultivable utilizando agar nutritivo y atmósfera aerobia.

Para estudiar la diversidad de especies bacterianas, se seleccionaron 20 unidades formadoras de colonia (UFC) de las placas de cada muestra “pool” (N total por tratamiento= 60 UFC). Para la selección, se consideraron en primera instancia aquellas UFC de apariencia diferente entre sí de manera tal de abarcar la mayor diversidad posible, y posteriormente, de manera aleatoria para garantizar la representatividad de las muestras. Cada colonia aislada se resuspendió en 1 ml de medio de caldo nutritivo (pluripeptona al 0,5%; extracto de carne al 0,3%; NaCl al 0,8%) y se incubó a 35-37 °C durante toda la noche. Se prepararon alícuotas con glicerol al 20% para conservar las muestras a -80°C hasta ser sometidas a diferentes pruebas de tipificación de cepas. Para la identificación, cada UFC se caracterizó a través de tinción de Gram y siete pruebas bioquímicas: agar hierro triple azúcar (TSI), citrato, indol, motilidad, ureasa, fenilalanina y lisina-hierro agar. Para las cepas que fue posible, la identificación se realizó mediante perfiles fenotípicos según Mac Faddin, JF (1984) (resumido en la tabla perfiles fenotípicos) y características bioquímicas diferenciales de los distintos géneros (**Tabla 4**, Lopardo *et al.*, 2016, y Ochoa & Ochoa, 2017). Algunas cepas inusuales requirieron identificación mediante desorción/ionización-tiempo-de-vuelo con láser asistido por matriz (MALDI-TOF) utilizando el equipo VITEK MS (bioMérieux) y la base de datos SARAMIS (BioMérieux). La determinación fue realizada por servicio tercerizado de Laboratorio Cibic, Rosario-Argentina. La identificación basada en MALDI-TOF también se utilizó para confirmar la identificación del 10% de las cepas identificadas mediante pruebas bioquímicas clásicas.



**Figura 13.** Procedimiento para el análisis bacteriológico de microbiota intestinal de larvas: aislamiento de cepas e identificación a través de pruebas bioquímicas.

Tabla 4. Perfiles fenotípicos para la identificación bacteriológica (adaptado de Koneman *et al.*, 2004).

TSI Ácido/Ácido (con o sin gas)

ESPECIE	PRUEBA	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	Enterobacter					Serratia				<i>Yersinia enterocolitica</i>
				<i>cloacae</i>	<i>erogens</i>	<i>hafniae 37*</i>	<i>hafniae 22*</i>	<i>agglomerans</i>	<i>marcescens</i>	<i>liquefaciens 37*</i>	<i>liquefaciens 22*</i>	<i>rubra</i>	
Citrato		+	+	+	+	V+	V	V	+	+	+	+	-
Ureasa		+	+	V (puede ser retardada)	-	-	V	V	V	-	V	+	+
SIM		V+	-	+	+	+	V+	+	+	+	+	V+	37-
Indol		+	V-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	V-
Fenilalanina		+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-

\*Especies de *Klebsiella*

	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. rhinosclerotomatis</i>
Citrato	+	V	-
Ureasa	+	V-	-

TSI Ácido/Ácido CON gas y Sulfídrico

ESPECIE	PRUEBA	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Arizona hinshawii</i>	Proteus	
				<i>mirabilis</i>	<i>vulgaris</i>
Citrato		+	+	V (puede ser retardada)	V-
Ureasa		V	-	V+	+
SIM		+	+	+	+
Indol		V-	-	-	+
Fenilalanina		-	-	+	+

TSI Alcalino/Ácido (con o sin gas)

ESPECIE	PRUEBA	<i>Salmonella paratyphi</i>	Shigella				Proteus		Providencia		Anerogeno <i>E. coli</i> (A-D)	<i>marcescens</i>	Serratia		Enterobacter		<i>Citrobacter diversus</i>	Pestis	<i>pseudotuberculosis</i>	<i>enterocolitica</i>	
			<i>dysenteriae</i>	<i>flexneri</i>	<i>boydii</i>	<i>sonnei</i>	<i>morganii</i>	<i>retigeri</i>	<i>alcalifaciens</i>	<i>situarii</i>			Liquefaciens		Hafniae						<i>agglomerans</i>
			A	B	C	D							37°C	22°C	37°C	22°C					
Citrato		-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V-	V	V	+	-	-	-	
Ureasa		-	-	-	-	+	+	-	-	-	V	V	-	-	-	V	V	-	+	+	
SIM		+	-	-	-	V+	+	+	V+	-	+	+	+	+	+	V+	V	-	22+	37-	
Indol		-	V	V	V	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	V	+	-	-	V-	
Fenilalanina		-	-	-	-	+	V+	+	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	

TSI Alcalino/Ácido CON sulfídrico, con/sin GAS

ESPECIE	PRUEBA	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Salmonella typhi</i>	Otras spp. De <i>Salmonella</i>	<i>Arizona hinshawii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Vulgaris</i>
Citrato		-	-	V+ S. enteritidis; + S. choleraesuis; -	+	+	V	V-
Ureasa		-	-	-	-	V	V+	+
SIM		+	+	V+	+	+	+	+
Indol		+	-	-	-	V-	-	+
Fenilalanina		-	-	-	+	V+	-	-

TSI Alcalino/Alcalino o Alcalino/Sin cambio: Bacterias intestinales NO entéricas

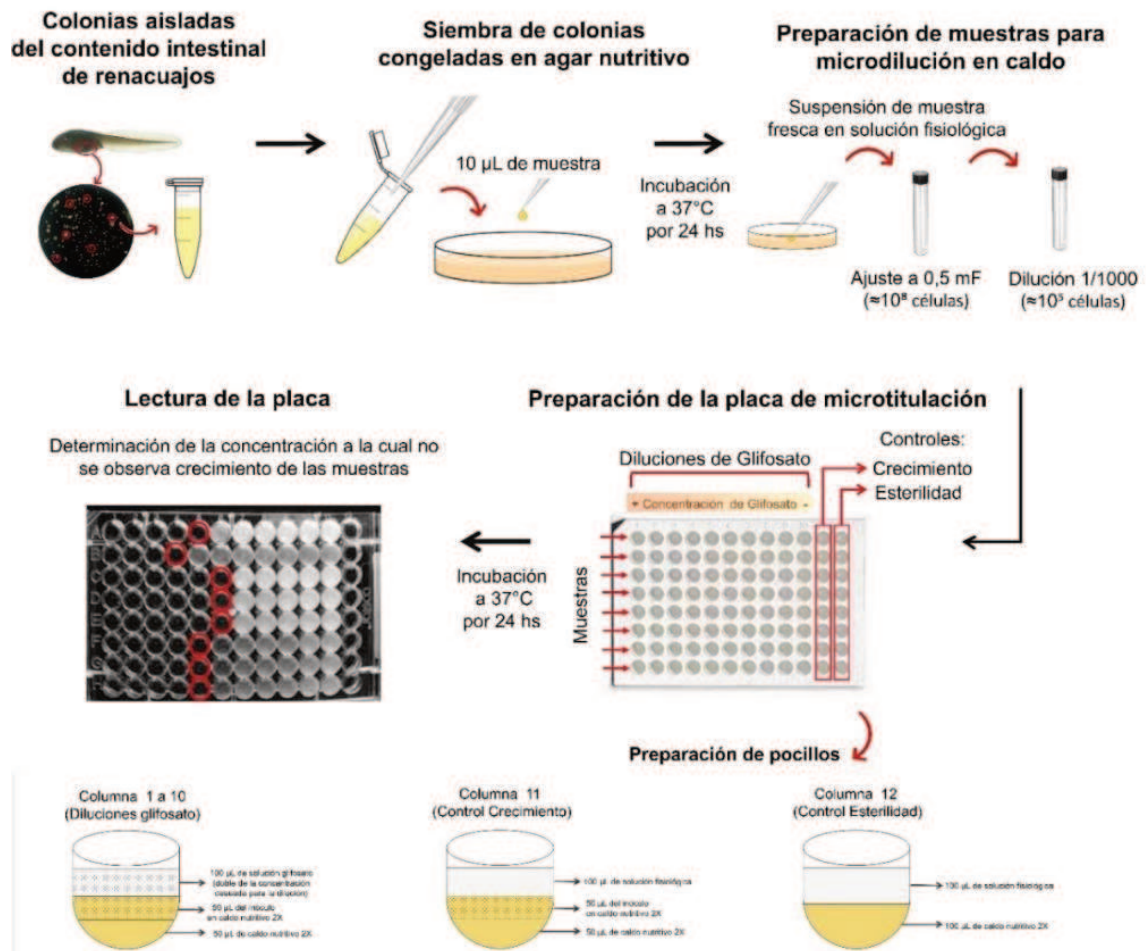
ESPECIE	PRUEBA	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Citrato		V	V	+
Ureasa		V	V	V
SIM		-	+	+
Indol		-	-	-
Fenilalanina		+	+	-

#### 2.4.4.2. Análisis de sensibilidad bacteriana intestinal

La evaluación de la sensibilidad de las cepas a GLI y CIP se llevó a cabo para los individuos expuestos a GLI y CIP, mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en caldo y mediante difusión en agar, respectivamente. El estudio de la sensibilidad a cada contaminante, GLI y CIP, se realizó en las cepas aisladas del grupo control y del tratamiento correspondiente, a fin de detectar si había variación en la sensibilidad en las cepas antes (grupo control) y después de la exposición prolongada al contaminante (grupo tratamiento). Como se utilizaron muestras congeladas, previo a los procedimientos para el análisis de sensibilidad se repicaron las cepas de interés en placas de agar nutritivo y se las incubaron a 35°C durante 24 horas.

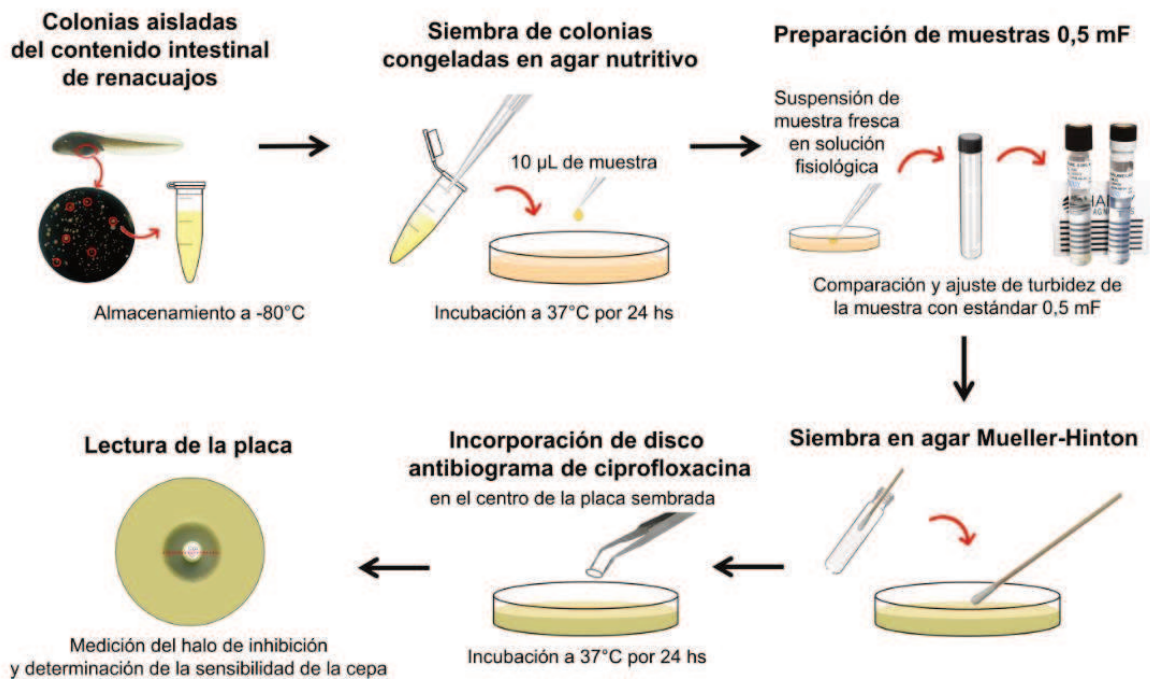
La CIM de GLI se determinó a través del método de microdilución en placa de 96 pocillos siguiendo los protocolos del CLSI como se resume en la **Figura 14**. Para la evaluación de la sensibilidad al GLI, se empleó el formulado comercial Mifos® con 48% del ingrediente activo y un estándar analítico de GLI de Sigma®, para contemplar el posible efecto los coadyudantes del formulado. Al desconocer los puntos de corte para cada compuesto en las diferentes cepas, se probó inicialmente un amplio rango de diluciones (1000 a 100 µg L<sup>-1</sup>). Para los compuestos que fue necesario, se realizó una prueba posterior con diluciones de 100 a 10 µg L<sup>-1</sup> de GLI. Para ambos casos, las diluciones se realizaron por fuera de la placa en solución fisiológica, al doble de la concentración deseada para cada pocillo. Las cepas (repiques de 24 horas) fueron suspendidas en caldo nutritivo 2X y llevadas a 0.5 McFarland, para luego ser diluidas 1/1000 y lograr el inóculo apropiado. La preparación de las placas con los detalles de los volúmenes incorporados a cada pocillo se detalla en la **Figura 14**. Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 horas. Se determinó la CIM como la dilución más baja de GLI a la cual no se observó desarrollo bacteriano (100% de inhibición).

**Figura 14.** Procedimiento empleado para la determinación de la concentración inhibitoria mínima del glifosato con el método de microdilución en placa.



Para la determinación de la sensibilidad a CIP se empleó el método de difusión en disco resumido en la **Figura 15**. Se realizaron inóculos de una densidad igual al 0.5 de la escala de turbiedad Mc Farland. Con 100 µL de este inóculo, ellos se sembraron placas de Mueller-Hinton agar y se colocaron discos de papel comerciales (Britania, Argentina) impregnados con cirpfloxacina. Después de la incubación (24 h), se midió el diámetro de la zona de inhibición alrededor de cada disco. Se clasificaron las cepas como sensibles (S), con sensibilidad intermedia (I) o resistentes (R) comparando el diámetro obtenido para cada cepa con el respectivo punto de corte de la CIP (García *et al.* 2000). En este punto se tuvo en cuenta que los puntos de corte son especie dependiente y por lo tanto, cada especie fue evaluada por separado.





**Figura 15.** Procedimiento empleado para la determinación de la concentración inhibitoria mínima de ciprofloxacina con el método de difusión en disco.

## 2. 5. Estadística y análisis numéricos

### 2.5.1. Análisis estadísticos de los biomarcadores.

Los datos cuantitativos de cada biomarcador medido para cada tratamiento, se informan como el valor de media y su correspondiente desvío estándar. La normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas se comprobaron mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Levene para, respectivamente (Zar 1999). Para determinar si existieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para cada biomarcador, se utilizó un ANOVA (F) seguido de un post-test de Dunnet para contrastar los tratamientos con contaminantes respecto a los Controles negativos de cada caso. Cuando las condiciones para realizar un ANOVA no se cumplieron, se realizó un test de Kruskal-Wallis seguido de un post test de Dunn.

En el análisis de la microbiota intestinal, los parámetros de diversidad alfa (estimador de riqueza Chao1, índice de dominancia, índice de diversidad de Shannon y Simpson) se calcularon utilizando el software PAST 3.22 y se expresan como la media  $\pm$  DE (de las réplicas). La riqueza de taxones se expresa por géneros totales por tratamiento, y para cada índice obtenido se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba post

hoc de Dunnett. Se realizó un análisis de diversidad beta para investigar la variación estructural de las comunidades de bacterias a través de los tratamientos y se visualizó a través del análisis de componentes principales (PCA) y el método de grupos de pares no ponderados con agrupación jerárquica de medias aritméticas (UPGMA).

Para todos los casos, se utilizó un nivel de significancia de  $P < 0.05$ . Los análisis estadísticos se realizaron con el software Infostat /P version 1.1 (Grupo InfoStat Profesional, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) y Graphpad InStat versión 3.01.

### 2.5.2. Análisis integral de los biomarcadores.

Con los datos de cada ensayo, se calculó el Índice de respuesta biológica integrada (IBR) para obtener un panorama general de la respuesta de los biomarcadores en cada tratamiento. El cálculo del IBR se realizó según Beliaeff & Burgeot (2002), con las modificaciones pertinentes. Se analizaron un total de 9 biomarcadores para cada tratamiento, incluyendo parámetros de distintos niveles de organización:

- Bioquímico: Hormona T4, enzimas GST y AChE.
- Histológico: %AH MM y Tamaño promedio de MM.
- Organismo: EG y %malformaciones
- Comunidades: Diversidad y Dominancia Bacteriana

Se siguieron cinco pasos básicos para la obtención del índice:

1. Para cada biomarcador, se estandarizó el valor medio de cada tratamiento ( $X_i$ ), utilizando el valor medio para todos los tratamientos ( $m$ ) y la desviación estándar para todos los sitios ( $s$ ) para obtener un valor denominado  $Y_i$ .  

$$Y = (X - m)/s$$
2. Para cada biomarcador en cada tratamiento, se calculó el valor  $Z = |Y|$  o  $Z = -|Y|$  según el efecto biológico corresponda a una activación o inhibición, respectivamente.
3. El valor  $S$  se calculó con  $S = Z + |\text{Min}|$ , donde  $\text{Min}$  es el valor mínimo observado para todos los tratamientos para cada biomarcador.
4. Todos los valores de  $S_i$  para cada tratamiento se representaron en un diagrama radial. Dado que en este análisis se busca caracterizar a cada tratamiento por el conjunto de biomarcadores medidos, una coordenada del radio trazado en el diagrama representa la puntuación (valor de  $S$ ) de un biomarcador dado en un tratamiento determinado. Considerando a  $S_i$  y  $S_{i+1}$  como dos puntuaciones consecutivas en el diagrama, y sea  $n$



el número de radios correspondientes a la cantidad de biomarcadores analizados, el área  $A_i$  obtenida conectando las coordenadas del radio  $i$ -ésimo y  $i+1$  ésimo se calcula como:

$$A_i = \frac{S_i}{2} \operatorname{sen} \beta (S_i \cos \beta + S_{i+1} \operatorname{sen} \beta)$$

$$\text{Donde } \beta = \operatorname{Atan} \left( \frac{S_{i+1} \operatorname{sen} \alpha}{S_i - S_{i+1} \cos \alpha} \right) \text{ y } \alpha = \frac{2\pi}{n}$$

5. El IBR final para cada tratamiento se calculó como el área total mostrada por el diagrama radial (sumatoria de las  $A_i$  calculadas en el paso anterior).  $IBR_{\text{tratamiento}} = \sum_{i=1}^n A_i$

Además, para determinar el tipo de interacción de los contaminantes en las mezclas, se calculó el Índice de Interacción (II) para cada biomarcador y mezcla según Mansour *et al.* (2008):  $II = (M+C) / (A1+A2)$

Donde todos los componentes representan los valores medios obtenidos para el biomarcador: M para el tratamiento mezcla, A1 y A2 para los tratamientos individuales y C para el tratamiento control. Los valores obtenidos para el II definen el tipo de interacción. En caso de efectos positivos (es decir, aumento del biomarcador en los tratamientos con respecto al control), si  $II > 1$  interacción se define como una potenciación y  $II < 1$  antagonismo. Por el contrario, en caso de efectos negativos (disminución del biomarcador en los tratamientos respecto al control), si  $II > 1$  interacción se define como antagonismo, y  $II < 1$  potenciación. En cualquier caso, si  $II=1$  la interacción se define como aditividad. Se consideraron límites de una adición valores entre 0,95 y 1,05, según Mansour *et al.* (2008). Para el análisis de las interacciones solo se tuvieron en cuenta los tratamientos de mezcla que provocaron diferencias significativas en los biomarcadores o cuando al menos una de las concentraciones individuales provocó diferencias significativas respecto al grupo control (Lajmanovich *et al.*, 2013; Bonifacio & Hued, 2019).

# 3 . RESULTADOS

## 3. 1. Bioensayo con herbicidas

- 3.1.1. Análisis bioquímico
- 3.1.2. Análisis histológico
- 3.1.3. Análisis morfológico
- 3.1.4. Análisis bacteriológico
- 3.1.5. Análisis integral de biomarcadores

## 3. 2. Bioensayo con herbicida, insecticida y antibióticos

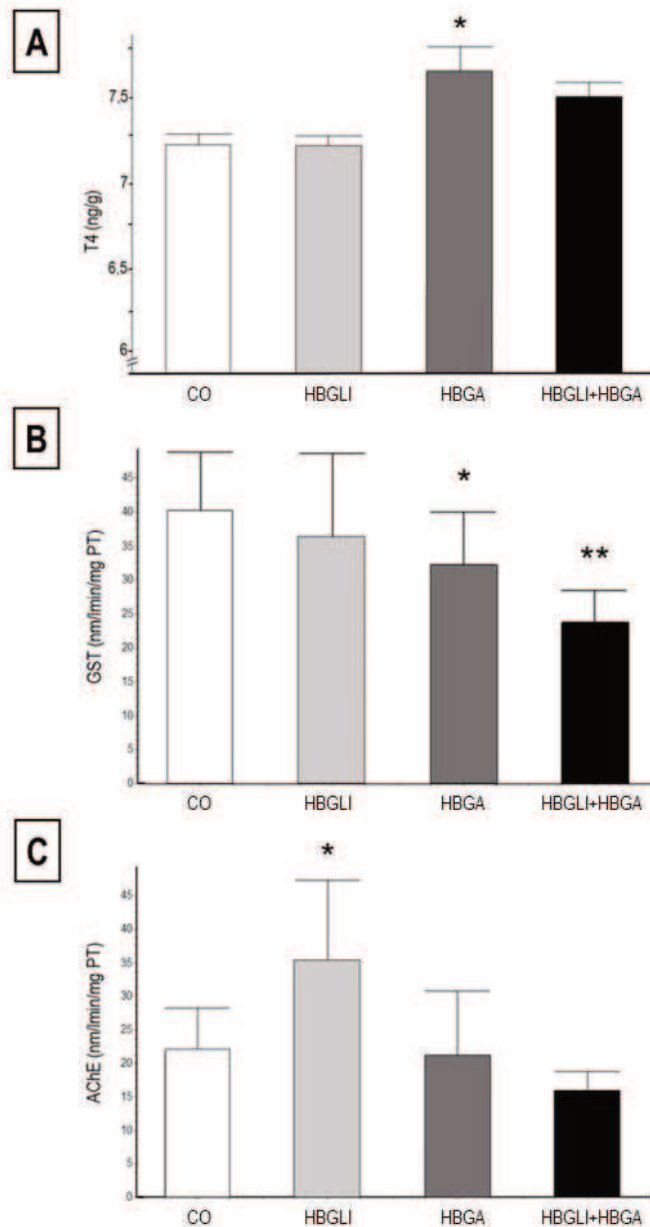
- 3.2.1. Análisis bioquímico
- 3.2.2. Análisis histológico
- 3.2.3. Análisis morfológico
- 3.2.4. Análisis bacteriológico
- 3.2.5. Análisis integral de los biomarcadores



### 3. 1. Bioensayo con herbicidas

#### 3.1.1. Análisis bioquímico

El nivel de T4 en CO fue  $7,23 \pm 0,35 \text{ ng g}^{-1}$ , mientras que los niveles de T4 en los tratamientos con herbicidas fueron de  $7,238 \pm 0,38 \text{ ng g}^{-1}$  en HBGLI,  $7,67 \pm 0,71 \text{ ng g}^{-1}$  en HBGA y  $7,52 \pm 0,45 \text{ ng g}^{-1}$  en HBGLI+HBGA (**Figura 16 A**). Se observó un aumento significativo del 6,1% en el tratamiento HBGA respecto al CO ( $F = 3,99$ ;  $p = 0,01$ ).



**Figura 16.** Biomarcadores bioquímicos analizados en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de herbicida a base de glifosato Mifos® (HBGLI),  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de herbicida a base de glufosinato de amonio Timón® (HBGA) y su mezcla 50:50% (HBGLI+HBGA). **A.** Tiroxina (T4); **B.** Glutatión S-transferasa (GST); **C.** Acetilcolinesterasa (AChE); Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

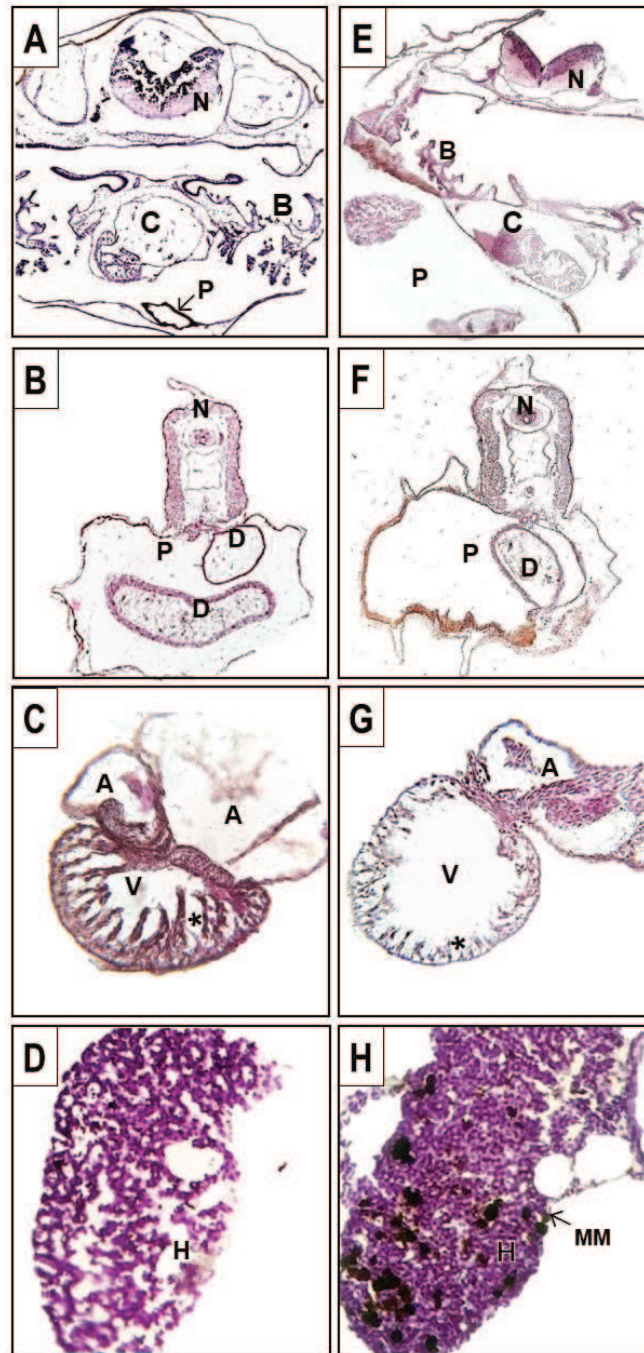
La actividad de la GST en el CO fue de  $74,93 \pm 16,05 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína, mientras que en los tratamientos herbicidas fue de  $71,03 \pm 029,24 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína en HBGLI,  $58,65 \pm 15,52 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína en HBGA y  $45,8 \pm 10,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína en HBGLI+HBGA (**Figura 16 B**). Se registró una disminución significativa de 21,73 % en el tratamiento HBGA y del 39% en el tratamiento HBGLI+HBGA con respecto al CO ( $F = 3,78$ ;  $p < 0,05$ ).

Por su parte, la actividad de AChE en el CO fue de  $1,76 \pm 0,57 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína, mientras que en los tratamientos con herbicidas fue de  $2,87 \pm 1,03 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína en HBGLI,  $1,72 \pm 0,82 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína en HBGA y  $1,3 \pm 0,23 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína en HBGLI+HBGA (**Figura 16 C**). Se registró un aumento significativo del 63% en el tratamiento con HBGLI respecto al CO ( $F = 6,71$ ;  $p < 0,01$ ).

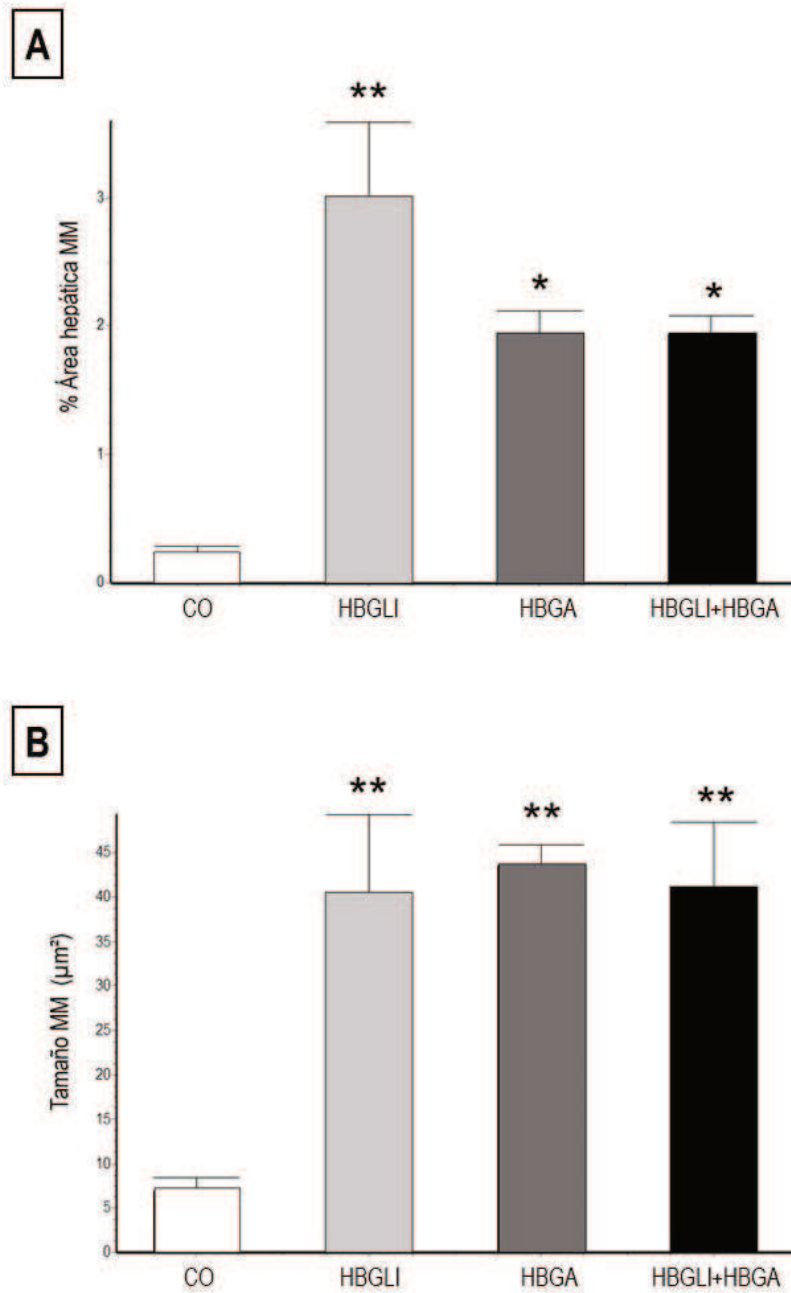
### 3.1.2. Análisis histológico

Las larvas de *R. arenarum* del CO mostraron una configuración interna normal simétrica, donde la cavidad pericárdica se encontró a nivel de las canastillas branquiales, y el inicio de la cavidad peritoneal se localizó pasando la cavidad pericárdica en sentido antero-posterior (**Figura 17 A**). En cambio, en el tratamiento HBGA se observó una alteración de dicha configuración, en la cual el inicio de la cavidad peritoneal se posicionó más anteriormente (**Figura 17 D**). Esta alteración estuvo acompañada de una disposición asimétrica bilateralmente de las cavidades y los órganos contenidos en ellas, así como también de las canastillas branquias. Para este tratamiento también se observó asimetría bilateral y edema abdominal en la parte posterior de la cavidad peritoneal (**Figura 17 E**) además de un menor grado de desarrollo de las trabéculas ventriculares del corazón (**Figura 17 F**), a comparación del desarrollo normal que tienen dichas estructuras (**Figura 17 C**).

El análisis cuantitativo de los MM hepáticos mostró que el porcentaje de área hepática (%AH) ocupado por MM aumentó significativamente ambos tratamientos individuales y en la mezcla con respecto al CO ( $F = 9,5$   $p < 0,01$ , **Figura 18 A**). En los campos evaluados, el %AH ocupado por MM fue del  $0,21 \pm 0,17$  % en el CO, mientras que en el tratamiento con HBGLI aumentó a  $2,97 \pm 1,5$  %, en el tratamiento HBGA a  $1,92 \pm 1,5$  % y en el tratamiento HBGLI+HBGA a  $1,92 \pm 0,47$  %. El tamaño promedio de los MM también fue significativamente mayor en todos los tratamientos a comparación del CO ( $F = 8,93$ ,  $p < 0,1$ , **Figura 18 B**). Se observó mayor incremento en el tamaño promedio en los tratamientos individuales de HBGLI y HBGA ( $39,95 \pm 18,5 \mu\text{m}^2$  y  $43,45 \pm 4,88 \mu\text{m}^2$ , respectivamente) con respecto al CO ( $7,01 \pm 2,93 \mu\text{m}^2$ ). El tamaño promedio de los MM también fue mayor en HBGLI+HBGA ( $41,04 \pm 12,65 \mu\text{m}^2$ ) respecto al CO.



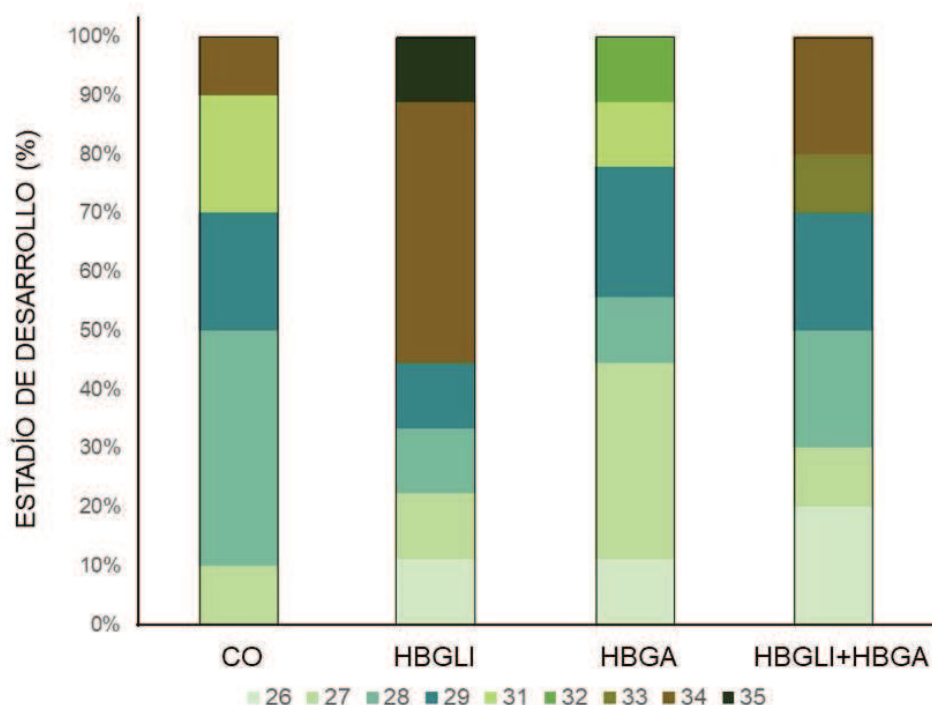
**Figura 17.** Secciones transversales de larvas de *R. arenarum* control (A-D) y tratadas con: (H) 2,5 mg L<sup>-1</sup> de herbicida a base de glifosato Mifos® (HBGLI); (E; G) 2,5 mg L<sup>-1</sup> de herbicida a base de glufosinato de amonio Timón® (HBGA); (F) su mezcla 50:50% (HBGLI+HBGA), que muestran la disposición y configuración normal de la cavidad pericárdica e inicio de la cavidad peritoneal (A), región posterior de la cavidad peritoneal (B), del corazón (C) y del hígado (D), en comparación con la alteración de las mismas: asimetría (E y F), trabéculas cardíacas anómalas (F) y abundancia de melanomacrófagos (G). Referencias: C: cavidad pericárdica; P: cavidad peritoneal; N: tubo neural; D: tubo digestivo; A: aurícula; V: ventrículo; \*: trabéculas ventriculares; H: hígado; MM: melanomacrófagos. Magnificación: A, B, D, y E: 100X, C y F: 1000X.



**Figura 18.** **A.** Porcentaje del área hepática ocupada por melanomacrófagos (MM); **B.** tamaño promedio de los MM del hígado de larvas de *R. arenarum* control (CO), expuestas  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de herbicida a base de glifosato Mifos® (HBGLI),  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de herbicida a base de glufosinato de amonio Timón® (HBGA) y su mezcla 50:50% (HBGLI+HBGA). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

### 3.1.3. Análisis morfológico

El crecimiento de las larvas en términos de longitud y peso corporal no difirió en los tratamientos con herbicidas respecto al CO ( $F = 1,5$ ;  $p = 0,2$  y  $F = 1,78$ ;  $p = 0,18$ ). En cambio, los EG de las larvas tratadas con HBGLI al finalizar el ensayo difirieron respecto a los EG de las larvas CO ( $F = 4,66$ ,  $p < 0,05$ ). Mientras que la mayoría de las larvas CO finalizaron el ensayo entre los EG 28-31 (80 %), las del tratamiento HBGLI lo hicieron mayoritariamente en los EG 34-35 (55 %; **Figura 19**). En el tratamiento HBGA, se registró una mayor proporción de EG más bajos (45 % de EG 26-27), mientras que el tratamiento HBGLI+HBGA, se observó una mayor proporción de EG más altos (30 % de EG 33-34).

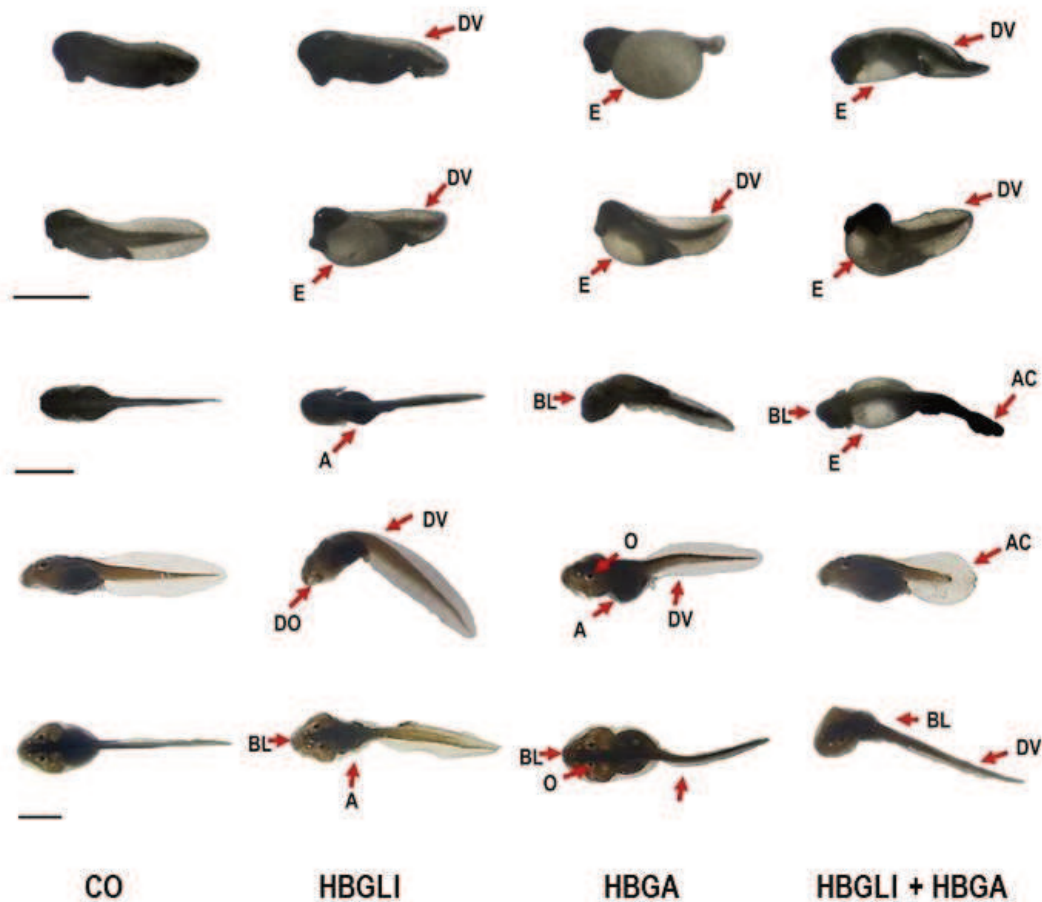


**Figura 19.** Proporción de individuos (% del total) de *R. arenarum* que finalizaron en cada estadio de desarrollo (Estadio de Gosner) para cada tratamiento: control negativo (CO), 2,5 mg L<sup>-1</sup> de herbicida a base de glifosato Mifos® (HBGLI), 2,5 mg L<sup>-1</sup> de herbicida a base de glufosinato de amonio Timón® (HBGA) y su mezcla 50:50% (HBGLI+HBGA).

La tasa de malformaciones obtenida a las 48 horas de exposición para el tratamiento HBGLI fue del 9,04 ( $\pm 3,06$ ) %, para el tratamiento HBGA del 14,08 ( $\pm 4,12$ ) %, y para el tratamiento HBGLI+HBGA del 9,95 ( $\pm 2,87$ ) %, siendo en todos los casos significativamente mayor que la tasa de 5,41 ( $\pm 1,95$ ) % obtenida para el control ( $Z = -4,09$ ,  $P = 0,96$ ,  $p < 0,001$ ).



para HBGA;  $Z = -2,16$ ;  $P = 0,66$  y  $p = 0,01$  para HBGLI; y  $Z = -2,25$ ,  $P = 0,66$  y  $p = 0,01$  para HBGLI+HBGA). Los edemas abdominales, curvatura del eje dorsoventral, asimetría bilateral se registraron como los tipos más recurrentes de malformaciones en todos los tratamientos. Se observaron otro tipo de anomalías abdominales, como también micro-oftalmía, alteraciones de la aleta caudal y en el disco oral (**Figura 20**).



**Figura 20.** Principales anomalías morfológicas observadas en larvas de *R. arenarum* a los 2 y 10 días de exposición a  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  del herbicida a base de glifosato Mifos® (HBGLI),  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  del herbicida a base de glufosinato de amonio Timón® (HBGA) y la mezcla de ambos 50:50 v/v (HBGLI+HBGA). La primera columna muestra la morfología externa normal de embriones y larvas premetamórficas, y las siguientes columnas, algunas de las anomalías observadas en los distintos tratamientos. Referencias: E: Edema abdominal; A: otras anomalías abdominales; BL: Asimetría Bilateral; DV: curvatura del eje dorsoventral; AC: alteración de la aleta caudal; O: microoftalmía (I), DO: alteración del disco oral. Escalas: 2 mm



### 3.1.4. Análisis bacteriológico

La diversidad de la microbiota bacteriana intestinal en larvas expuestas a los tratamientos HBGLI, HBGA y MEZCLA varió con respecto al CO (**Tabla 5, Figura 21**). En el tratamiento HBGLI, se identificó una mayor cantidad de géneros de bacterias que en el CO. Los estimadores de riqueza y diversidad resultaron ligeramente mayores al CO, y la dominancia levemente menor. En cuanto a la comparación de abundancia relativa de los géneros identificados con respecto al CO, en HBGLI se observó disminución de *Edwardsiella* spp., aumento de *Proteus* spp., presencia de *Salmonella* spp., y ausencia de *Arizona* spp. En el tratamiento HBGA, hubo una leve disminución de riqueza y diversidad, y aumento de dominancia; a nivel de géneros, se observó disminución de *Enterobacter* spp., aumento de *Citrobacter* spp., aparición de *Yersinia* spp. y ausencia de *Serratia* spp. En el tratamiento HBGLI+HBGA, la riqueza fue menor que en el CO: el estimador de riqueza de Chao disminuyó significativamente en este tratamiento ( $F = 7,08$ ,  $p = 0,003$ ). Se observó un aumento de *Edwardsiella* spp., disminución de *Enterobacter* spp. y *Citrobacter* spp., y aumento de *Klebsiella* spp.

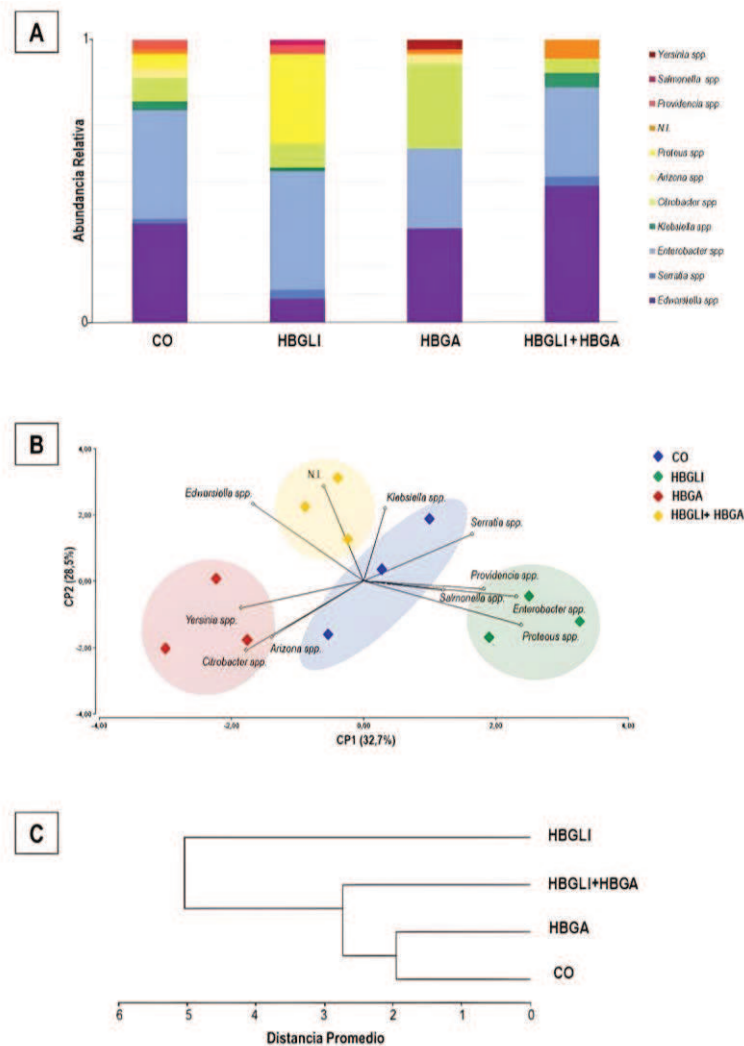
**Tabla 5.** Índices de diversidad de la microbiota bacteriana intestinal de larvas de *R. arenarum* control (CO), expuestas al herbicida a base de glifosato (HBGLI), al herbicida a base de glufosinato de amonio (HBGA), y a la mezcla de ambos (HBGLI+HBGA).

	CO	HBGLI	HBGA	HBGLI+ HBGA	Análisis estadístico
<b>Riqueza total (géneros)</b>	9	11	7	6	
<b>Chao 1</b>	10,25 ± 7,75	13 ± 1,79	8 ± 0,81	<b>5 ± 0,66</b>	F = 7,08 *
<b>Dominancia</b>	0,37 ± 0,08	0,33 ± 0,05	0,39 ± 0,04	0,38 ± 0,08	F = 0,12
<b>Simpson</b>	0,63 ± 0,06	0,66 ± 0,05	0,6 ± 0,04	0,62 ± 0,06	F = 0,17
<b>Shannon</b>	1,34 ± 0,33	1,36 ± 0,24	1,09 ± 0,25	1,24 ± 0,28	F = 0,73

\*  $p \leq 0,01$ ; los números en negrita indican significativamente diferente del CO ( $p < 0,05$  en test post hoc de Dunnett).

El análisis de componentes principales para la diversidad Beta resultó en cuatro grupos correspondientes a los tratamientos (como se observa en la **Figura 21 A**, las réplicas de cada tratamiento son similares en cuanto a los vectores más cercanos). Los tratamientos mostraron estar dispersos a través del eje de componentes, lo que indica que las comunidades microbianas de muestras intestinales de CO, HBGLI, HBGA y HBGLI+HBGA variaron entre taxones.

**Figura 21.** Diversidad de las comunidades microbianas intestinales de larvas de *R. arenarum* expuestos



a tratamientos: Control; 2,5 mg L<sup>-1</sup> de herbicida a base de glifosato Mifos® (HBGLI), 2,5 mg L<sup>-1</sup> de herbicida a base de glufosinato de amonio Timón® (HBGA); mezcla 50:50% de ambos herbicidas (HBGLI+HBGA). **A.** Variación de la abundancia relativa de cada taxón en cada tratamiento (correspondiente a las frecuencias acumuladas de cada género del total de UFC de cada tratamiento, n = 60). **B.** Biplot del Análisis de Componentes Principales que muestra los patrones de separación de cada réplica de los tratamientos basados en diferentes taxones identificados (géneros); **C.** Agrupación jerárquica (método de grupos de pares no ponderados con medias aritméticas, UPGMA) de tratamientos basados en la composición de taxones (nivel de género).

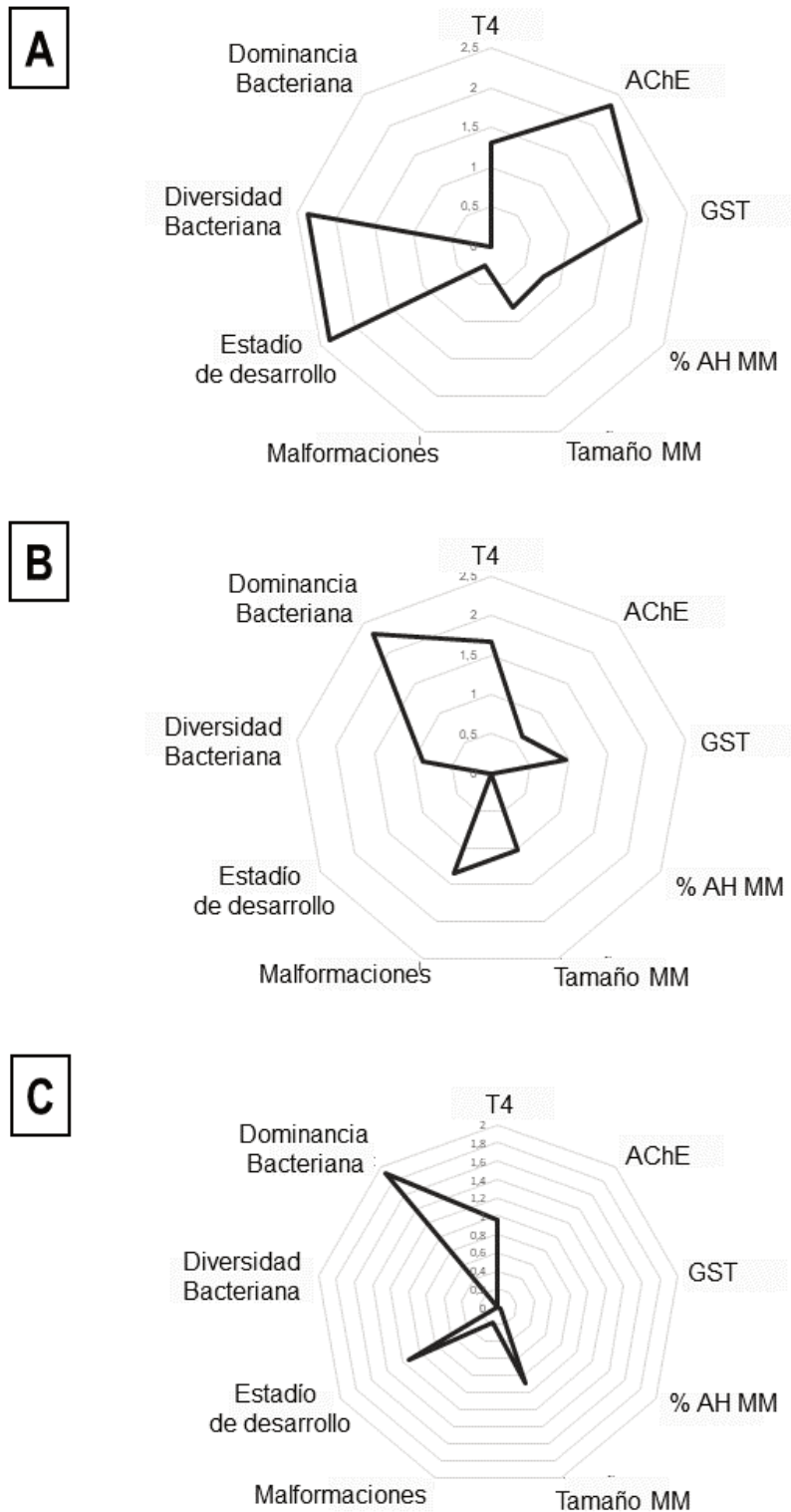
En el eje X (donde se representó el componente de mayor variación,  $\lambda_{PC1} = 32,7 \%$ , en contraste con el eje Y donde  $PC2 = 28,5 \%$ ), las comunidades CO se ubican próximas a las de los tratamientos HBGA y HBGLI+HBGA, mientras que las comunidades del tratamiento HBGLI fueron las más disímiles según los taxones presentes. De manera similar, el análisis UPGMA presentó al tratamiento HBGA como el más estrechamente relacionado al grupo CO, y seguidamente, HBGLI+HBGA (**Figura 21 B**). Por su parte, el tratamiento con HBGLI, resultó el más distante según la abundancia relativa de taxones en cada tratamiento (**Figura 21 C**).

### 3.1.5. Análisis integral de biomarcadores

#### *Índice integral de respuesta biológica*

Los gráficos radiales (**Figura 22**) evidenciaron diferencias importantes en cuanto a la magnitud y tipo de respuesta de las larvas de *R. arenarum* a cada tratamiento. Si bien los distintos tipos de biomarcadores mostraron sensibilidad diferencial a los contaminantes en estudio, el IBR representado por el área total del polígono obtenido para cada tratamiento, fue mayor para el tratamiento HBGLI (IBR = 7,31) respecto a HBGA y HBGLI+HBGA (IBR = 4,56 y 1,38, respectivamente).

El tratamiento HBGLI mostró efectos significativos respecto al biomarcador bioquímico AChE, como así también a nivel organismo (estadios de desarrollo) y de comunidad (diversidad de géneros bacterianos). Por su parte, el tratamiento HBGA también mostró importantes efectos sobre biomarcadores a de los mismos niveles organismos y comunidad, aunque diferentes a HBGLI (malformaciones y dominancia bacteriana, respectivamente). El tratamiento HBGLI+HBGA también afectó a biomarcadores de los niveles antes mencionados (específicamente al estadio de desarrollo y dominancia bacteriana), pero se diferenció del resto de los tratamientos por una marcada respuesta a nivel histológico sobre el tamaño de los MM.



**Figura 22.** IBR de larvas de *R. arenarum* expuestas a: (A) 2,5 mg L<sup>-1</sup> de herbicida a base de glifosato Mifos® (HBGLI); (B) 2,5 mg L<sup>-1</sup> de herbicida a base de glufosinato de amonio Timón® (HBGA), (C). mezcla 50:50% de ambos herbicidas (HBGLI+HBGA), en respuesta a biomarcadores de nivel

bioquímico (T4, GST y AChE), histológico (%AH MM y tamaño promedio de MM), organismo (EG y %malformaciones) y comunidades (diversidad y dominancia bacteriana).

### Índice de Interacción

Los II obtenidos para cada biomarcador del ensayo con HBGLI y HBGA mostraron variados tipos de interacción entre ambos compuestos para cada biomarcador (**Tabla 6**). La interacción fue aditiva para T4, %AH MM y tasa de malformaciones. En cuanto a la respuesta observada de la GST y Diversidad Bacteriana (Chao), la mezcla resultó en la potenciación de los efectos individuales. En contraste, la interacción de la mezcla sobre la respuesta de la AChE, Tamaño MM y EG fue antagónica, ya que los resultados del tratamiento HBGLI+HBGA fueron menores que los observados en los tratamientos individuales.

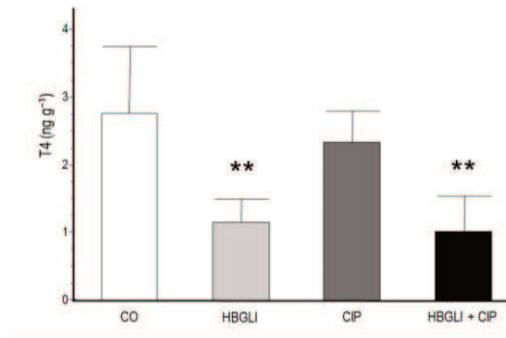
**Tabla 6.** Índices de interacción (II) entre los herbicidas a base de glifosato (HBGLI) y glufosinato de amonio (HBGA). Los valores de cada biomarcador corresponden a la media obtenida para cada tratamiento. Se consideran las diferencias significativas en los tratamientos con respecto al control para definir el efecto positivo (↑) o negativo (↓) y así establecer el tipo de interacción.

Biomarcador	CO	HBGLI	HBGA	HBGLI+HBGA	II	Efectos	
						significativos de los trat. individuales	Tipo de interacción
T4	7,24	7,241	7,67	7,52	0,98	-	Aditividad
AChE	1,76	2,87	1,72	1,3	0,44	↑	Antagonismo
GST	74,94	71,04	58,65	45,8	0,59	↓	Potenciación
%AH MM	0,21	2,97	1,92	1,95	0,99	↑	Aditividad
Tamaño MM	7,82	39,95	43,45	41,04	0,67	↑	Antagonismo
EG	29,3	31,6	28,4	29,4	0,73	↑	Antagonismo
Tasa malformación	5,43	9,04	14,08	9,95	1,04	↑	Aditividad
Diversidad Bacteriana (Chao)	10,25	13	8	5	0,67	↓	Potenciación

## 3.2. Bioensayo con herbicida, insecticida y medicamentos.

### 3.2.1. Análisis bioquímico.

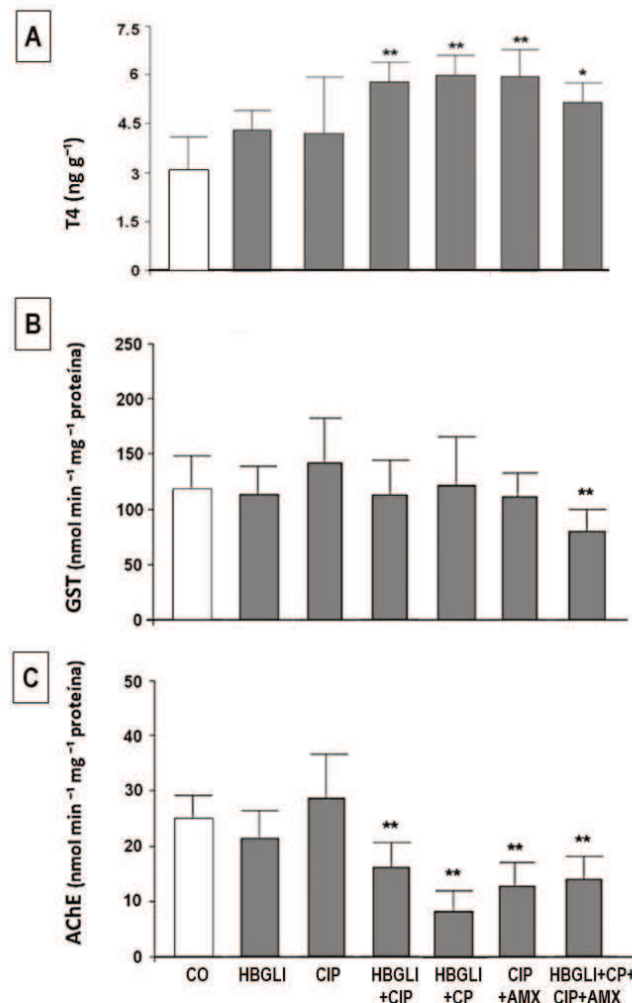
En el primer escenario de contaminación, el nivel de T4 disminuyó significativamente en larvas tratadas con HBGLI y HBGLI+CIP ( $F = 3,871$ ;  $p < 0,01$ ) respecto al nivel de las larvas CO (**Figura 23**). En el segundo escenario de contaminación, los niveles de T4 mostraron un



aumento en las larvas expuestas a todos los tratamientos de mezcla ( $F = 2,408$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 24 A).

**Figura 23.** Niveles de hormona tiroidea (T4) en larvas de *R. arenarum* expuestas al primer escenario de contaminación del segundo bioensayo. Tratamientos: 2,5 mg L<sup>-1</sup> herbicida a base de glifosato Roundup® (HBGLI), 100 µg L<sup>-1</sup> de ciprofloxiacina Cirax® (CIP), mezcla 50:50% de ambos (HBGLI+CIP); Los datos se expresan como medias ± SD (desvío estándar). Significativamente diferente del control (CO): \*\*  $p < 0,01$ ; prueba de Dunnett.

**Figura 24.** Efectos del segundo escenario del bioensayo mezcla de herbicida, insecticida y medicamentos sobre biomarcadores bioquímicos de larvas de *R. arenarum*. Tratamientos: 2,5 mg L<sup>-1</sup>



herbicida a base de glifosato Roundup® (HBGLI), 100 µg L<sup>-1</sup> de ciprofloxiacina Cirax®, mezcla 50:50% de ambos (HBGLI+CIP); mezcla 50:50% HBGLI y 2,5 µg L<sup>-1</sup> de clorpirifós Manchester® (CP), mezcla 50:50% CIP y 100 µg L<sup>-1</sup> de amoxicilina Amoxidal® (AMX), mezcla 25:25:25:25% de todos los compuestos (HBGLI+CP+CIP+AMX). **A.** Hormona tiroidea (T4). **B.** Actividad de glutatión S-transferasa (GST). **C.** Actividad de acetilcolinesterasa (AChE). Los datos se expresan como medias ± SD (desvío estándar). Significativamente diferente del control (CO): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; prueba de Dunnett.

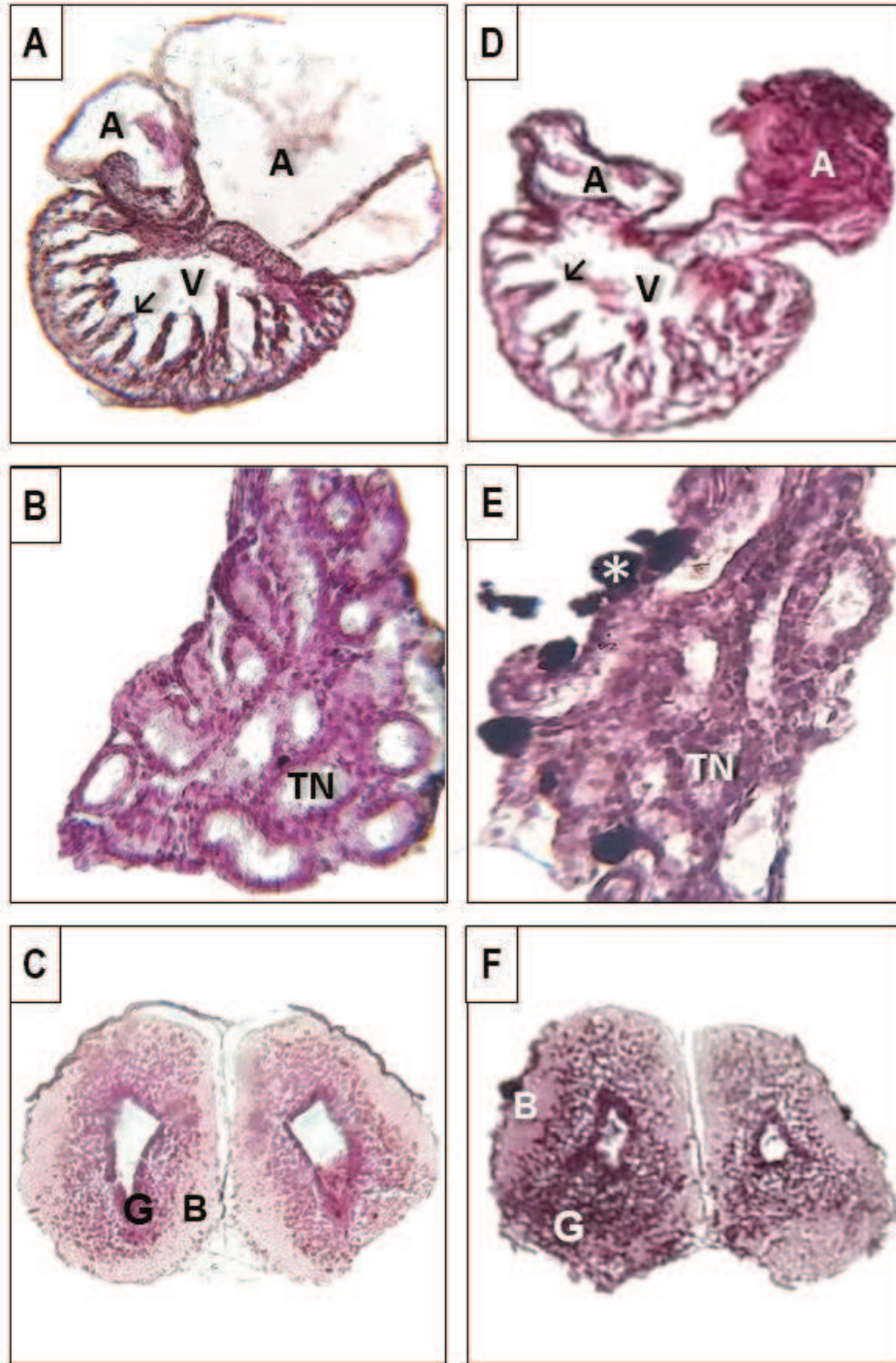
La disminución de GST fue significativa (en un 37,1 %) en la mezcla cuaternaria (F = 8,075; p < 0,01) (**Figura 24 B**). AChE fue leve en los tratamientos con un solo contaminante, y de mayor significancia en tratamientos de mezclas binarias y cuaternarias (F = 19,698; p < 0,01) (**Figura 24 C**).

### 3.2.2. Análisis histológico.

Los cortes transversales de larvas de *R. arenarum* del CO mostraron una configuración y estructura normal de los órganos y tejidos internos (**Figura 25 A-C**). En cambio, en el tratamiento con HBGLI se observaron alteraciones a nivel cardíaco, tanto en la estructura de las trabéculas como de las capas musculares que limitan las aurículas con el ventrículo, siendo mucho más delgadas que en el control (**Figura 25 D**). Por su parte, en el tratamiento HBGLI+CIP se observaron alteraciones de los túbulos nefríticos, incluyendo engrosamiento de las paredes de los túbulos y presencia de MM (**Figura 25 E**). En este tratamiento también se registró una disposición anormal de la sustancia gris y blanca (núcleos y fibras neuronales, respectivamente) en el telencéfalo (**Figura 25 F**).

El análisis cuantitativo de los MM hepáticos mostró que el %AH ocupado por MM aumentó significativamente todos los tratamientos individuales y mezcla de HBGLI y CIP con respecto al CO (F = 8,65; p < 0,1, **Figura 26 A**). En los campos evaluados, el %AH ocupado por MM fue del 0,58 ± 0,42 % en el CONTROL, mientras que en el tratamiento con HBGLI aumentó a 2,73 ± 0,12 %, en el tratamiento CIP a 4,25 ± 0,61 % y en el tratamiento HBGLI+CIP a 3,02±1,6 %.

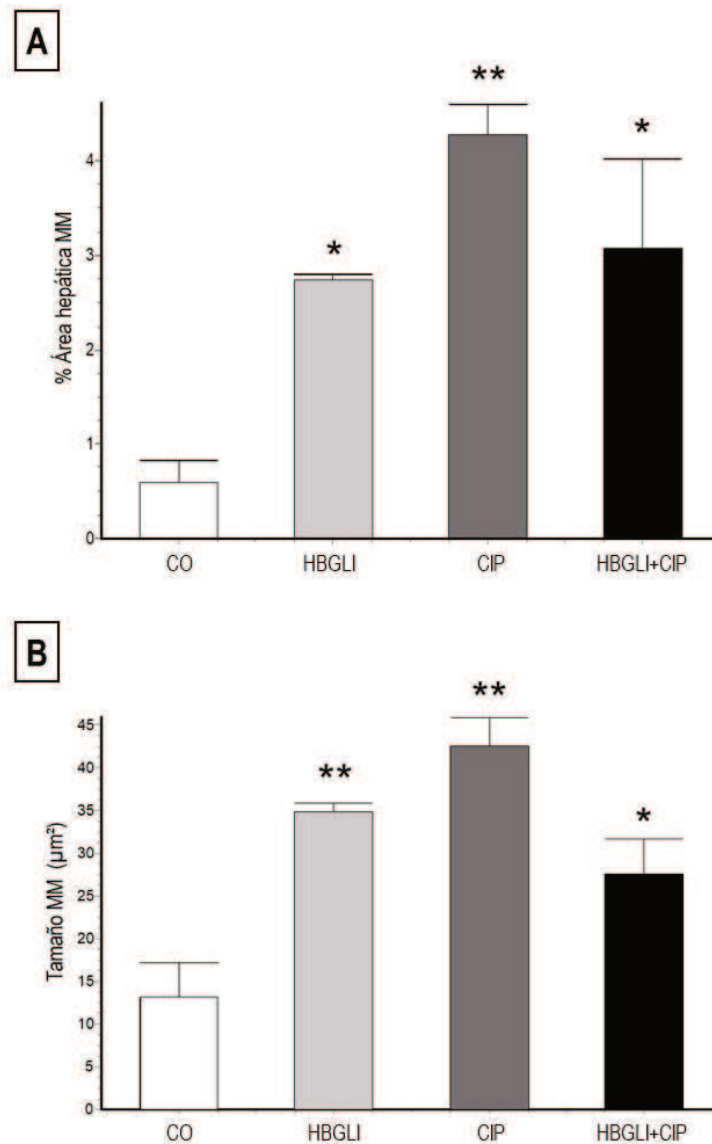
El tamaño promedio de los MM también fue significativamente mayor en todos los tratamientos a comparación del CONTROL (F = 13,12; p < 0,1, **Figura 26 B**). Se observó mayor incremento en el tamaño promedio en los tratamientos individuales de HBGLI y CIP (34,53 ± 2,28 µm<sup>2</sup> y 42,3 ± 6,06 µm<sup>2</sup>, respectivamente) con respecto al CONTROL (13,06 ± 7,08 µm<sup>2</sup>). El tamaño promedio de los MM también fue mayor en el tratamiento HBGLI+CIP (27,06 ± 6,99 µm<sup>2</sup>) con respecto al CO.



**Figura 25.** Secciones transversales de larvas de *R. arenarum* control (A-C) y tratadas con  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  herbicida a base de glifosato Roundup® -HBGLI- (D) y su mezcla con  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de ciprofloxiacina Cirax®, HBGLI+CIP (E, F) que muestran la configuración normal del corazón (A), túbulos nefríticos (B) y telencéfalo (C), en comparación con la alteración de las mismas: atrofia miocárdica (D) y engrosamiento de túbulos y presencia de melanomacrófagos (E) y desorganización de la sustancia gris y blanca (F). Referencias: A: aurícula; V: ventrículo;  $\sphericalangle$  trabéculas ventriculares; TN: túbulos nefríticos; \*



melanomacrófagos; G: sustancia gris; B: sustancia blanca. Magnificación: A, B, D y E: 1000X; C y F: 400X.



**Figura 26.** Análisis de melanomacrófagos hepáticos (MM) de larvas de *R. arenarum* control (CO), expuestas a tratamientos con:  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  herbicida a base de glifosato Roundup® (HBGLI),  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de ciprofloxiacina Cirax®, mezcla 50:50% de ambos (HBGLI+CIP). **A.** Porcentaje del área hepática ocupada por MM. **B.** Tamaño promedio de los MM. \* y \*\* representan diferencias significativas ( $p \leq 0,05$  y  $p \leq 0,01$ , respectivamente) en los tratamientos respecto al CONTROL en la prueba de Dunnet.

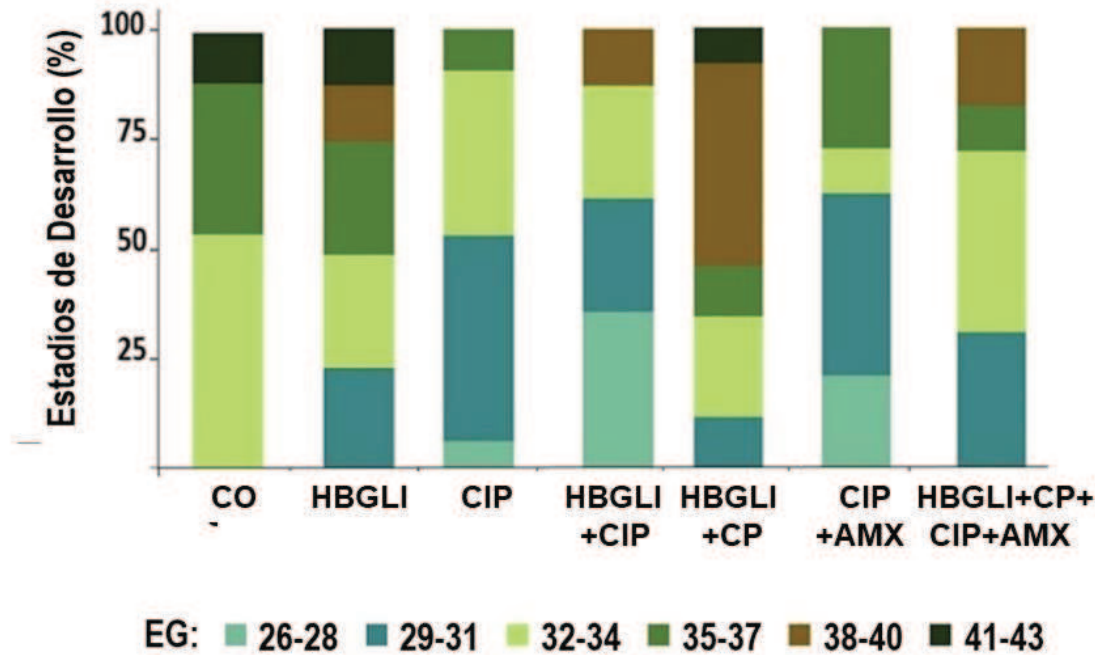
### 3.2.3. Análisis morfológico

El crecimiento durante la primera etapa del Bioensayo II en términos de longitud total de larvas tratadas con HBGLI, CIP, HBGLI+CIP, y CO fue similar ( $F = 1,105$  y  $F = 2,956$ ,  $p >$

0,05, respectivamente). En el grupo de CO, la mayoría de las larvas finalizaron el ensayo entre los EG 32-34, mientras que en los tratamientos, existió mayor diversidad de estadios.

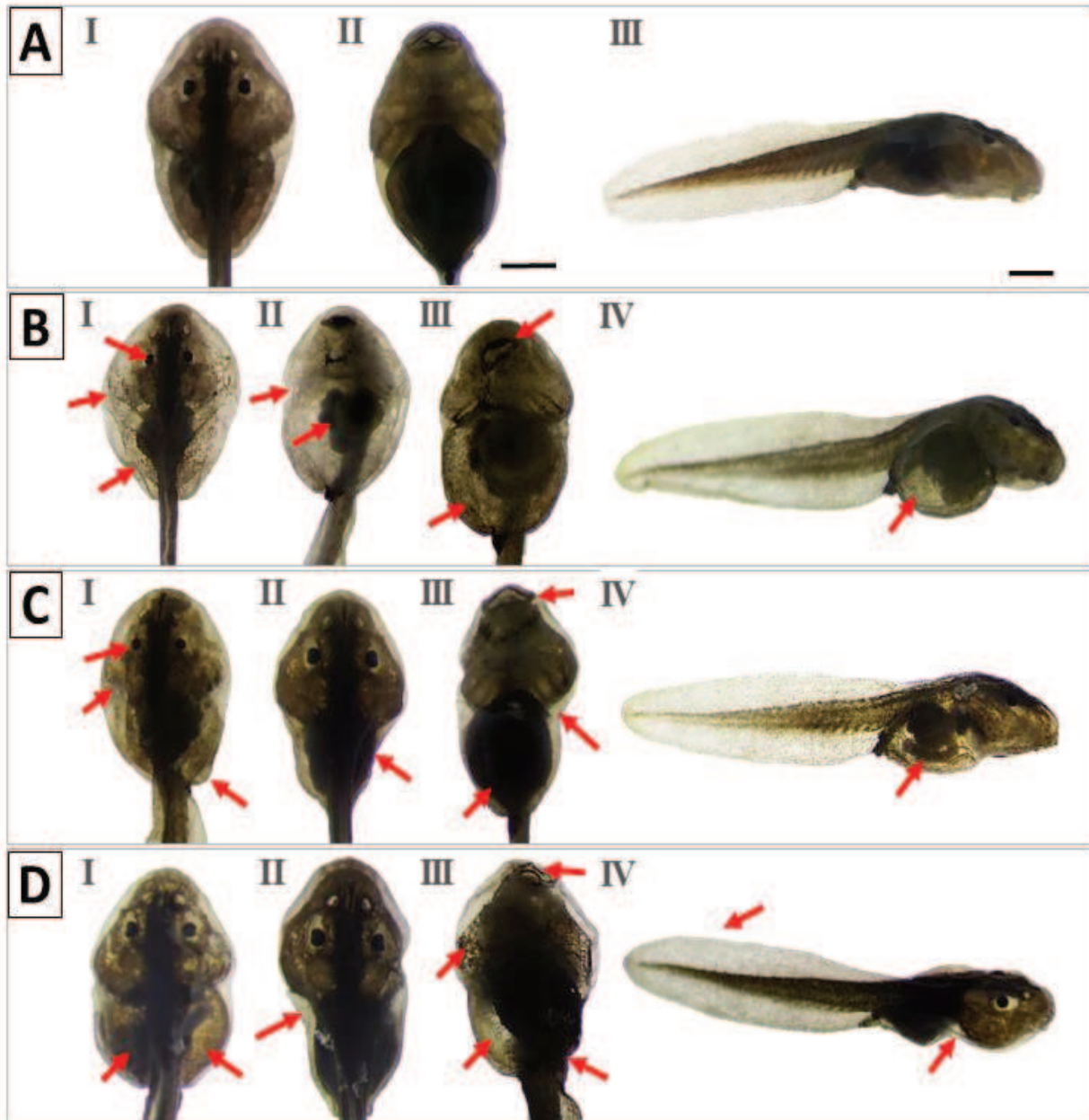
Durante la segunda etapa de exposición, las proporciones de cada rango de EG también fueron diferentes en los tratamientos con respecto al CO. En general, el tratamiento CIP+AMX mostró un mayor porcentaje de EG menores respecto al CO, y el tratamiento HBGLI+CP, una mayor proporción de EG más avanzados (**Figura 27**).

**Figura 27.** Proporción de individuos (% del total) de *R. arenarum* que finalizaron en cada rango de



estadios de desarrollo (Estadio de Gosner) para cada tratamiento individual y sus combinaciones: control negativo (CO), 2,5 mg L<sup>-1</sup> herbicida a base de glifosato Roundup® (HBGLI), 100 µg L<sup>-1</sup> de ciprofloxacina Cirax®, mezcla 50:50% de ambos (HBGLI+CIP); mezcla 50:50% HBGLI y 2,5 µg L<sup>-1</sup> de clorpirifós Manchester® (CP), mezcla 50:50% CIP y 100 µg L<sup>-1</sup> de amoxicilina Amoxidal® (AMX), mezcla 25:25:25:25% de todos los compuestos (HBGLI+CP+CIP+AMX).

Además, se registraron diversos tipos de anomalías en larvas de todos los tratamientos, mientras que las de CO no presentaron malformaciones. Entre el 30-50 % de las larvas analizadas en cada tratamiento mostró al menos alguna irregularidad en la morfología del cuerpo. Las anomalías más frecuentemente observadas se muestran en la **Figura 28**.



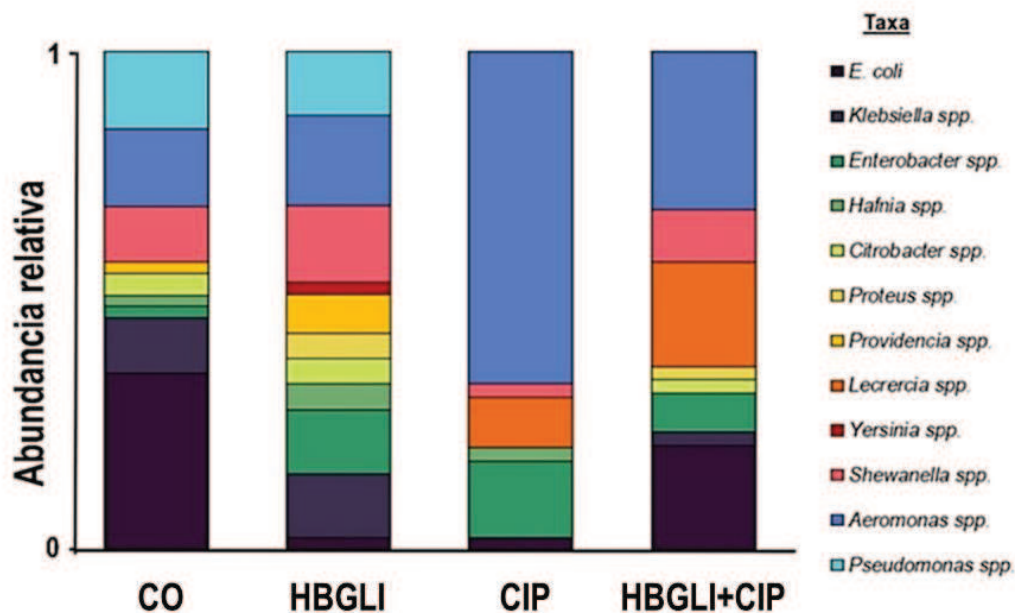
**Figura 28.** Anormalidades observadas en larvas de *R. arenarum* al final de la primera etapa del ensayo crónico con tratamientos: 2,5 mg L<sup>-1</sup> herbicida a base de glifosato Roundup® (HBGLI), 100 µg L<sup>-1</sup> de ciprofloxiacina Cirax®, mezcla 50:50% de ambos (HBGLI+CIP) **A.** Morfología externa normal de un renacuajo premetamórfico de *R. arenarum* (CO) en vista dorsal (I), ventral (II) y lateral (III). **B** Tratamiento con HBGLI: microftalmia (I) atrofia del esqueleto hiobranquial (I y II), atrofia visceral (I-II) y patrón asimétrico intestinal (III y IV), asimetría bilateral (II), edema (III y IV), alteración de la boca (III). **C** Larvas expuestas a CIP, que muestran microftalmia, atrofia visceral (I), esqueleto hiobranquial anormal (I), emaciación (II), asimetría bilateral (II), enrollamiento anormal intestinal (III y IV). **D** Las larvas tratados con HBGLI+CIP 50:50 % v/v exhibieron edema y configuración anormal intestinal (I, II y III), alteración del disco oral y de las cámaras branquiales (III), asimetría bilateral (II y II) y cola anormal (IV). Escala: 1 mm.

### 3.2.4. Análisis bacteriológico

#### 3.1.4.1. Diversidad bacteriana intestinal

La diversidad de la microbiota bacteriana intestinal en larvas expuestas a los tratamientos HBGLI, CIP y HBGLI+CIP varió significativamente con respecto al CO (MANOVA Lambda de Wilks  $\lambda = 0,0041$ ;  $F = 4,84$ ;  $p < 0,01$ ). El estimador de riqueza de Chao ( $F = 11,8$ ;  $p < 0,01$ ) y el índice de diversidad de Shannon y Simpson ( $F = 29$ ;  $p < 0,01$ ) aumentaron en las comunidades microbióticas de HBGLI, mientras que en las comunidades del tratamiento con CIP, la diversidad disminuyó notablemente y la dominancia fue significativamente mayor ( $F = 27$ ,  $p < 0,01$ ) que en el CO (**Tabla 7**). En el tratamiento HBGLI+CIP, el índice de diversidad y riqueza fueron similares al CO, pero la abundancia relativa de algunos géneros fue diferente (**Figura 29**). *Escherichia coli*, así como *Klebsiella* spp., *Shewanella* spp., *Aeromonas* spp. y *Pseudomonas* spp. fueron identificados como los taxones predominantes en el grupo CO. La frecuencia relativa de *Aeromonas* spp. aumentó en los tratamientos CIP y HBGLI+CIP, siendo el género dominante. Por el contrario, la dominancia de *Aeromona* spp. fue menor en el grupo de tratamiento HBGLI (**Tabla 7**). Respecto a este tratamiento, se aislaron dos géneros no registrados en los demás tratamientos ni en el control: *Yersinia* spp. y *Proteus* spp.

**Figura 29.** Comparación de la microbiota bacteriana intestinal de larvas de *R. arenarum* expuestos a 2,5



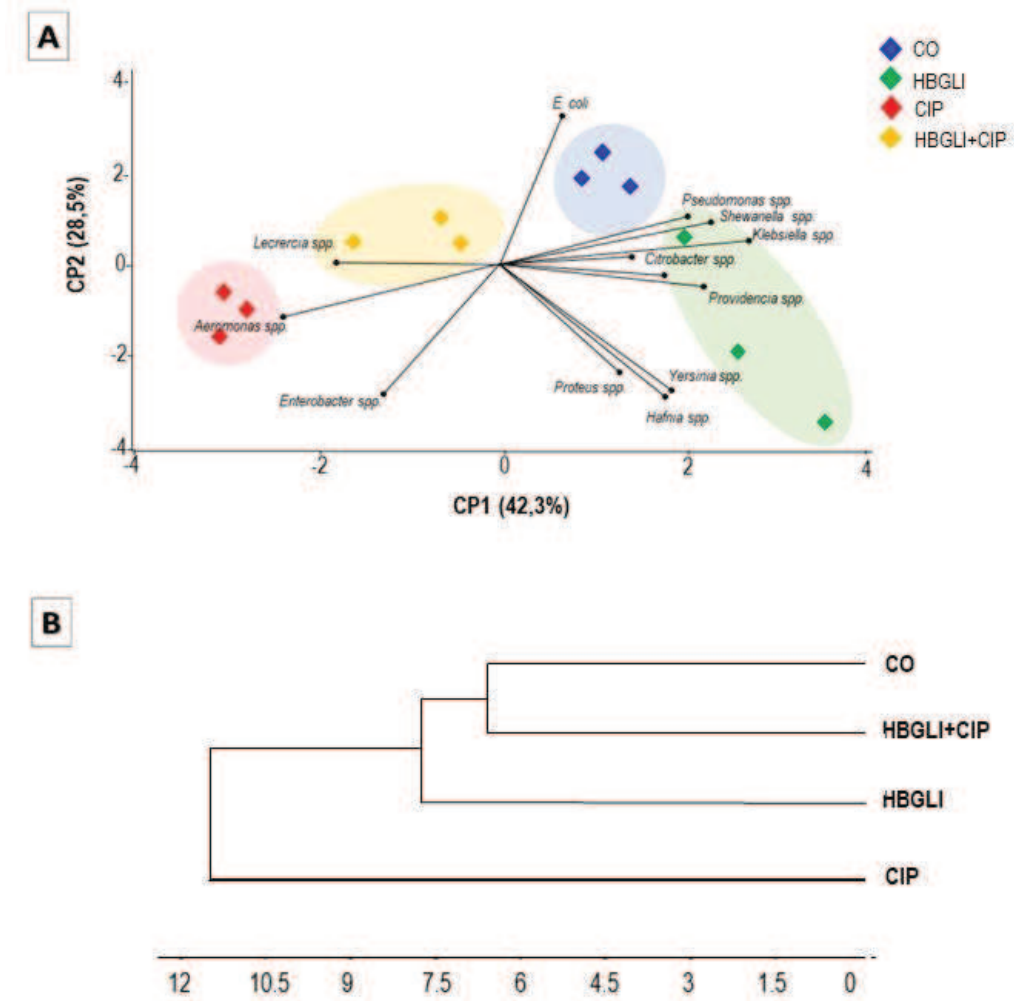
mg L<sup>-1</sup> herbicida a base de glifosato Roundup® (HBGLI), 100 µg L<sup>-1</sup> de ciprofloxiacina Cirax®, mezcla 50:50% de ambos (HBGLI+CIP), respecto al grupo control (CO): Variación de la abundancia relativa de cada taxón en cada tratamiento (correspondiente a las frecuencias acumuladas de cada género del total de UFC de cada tratamiento, n=60).

**Tabla 7.** Índices de diversidad de la microbiota bacteriana intestinal de larvas de *R. arenarum* control (CO), expuestas a 2,5 mg L<sup>-1</sup> herbicida a base de glifosato Roundup ® (HBGLI), 100 µg L<sup>-1</sup> de ciprofloxiacina Cirax®, mezcla 50:50% de ambos (HBGLI+CIP).

	CO	HBGLI	CIP	HBGLI+CIP	Análisis estadístico
Riqueza total (Géneros)	9	11	7	8	-
Chao 1	6,66 ± 0,76	<b>10,25 ± 1,8</b>	4,33 ± 0,57	8 ± 1,32	F = 11,8 *
Dominancia	0,25 ± 0,04	0,13 ± 0,02	<b>0,51 ± 0,07</b>	0,22 ± 0,06	F = 27,4*
Simpson	0,74 ± 0,04	<b>0,86 ± 0,02</b>	<b>0,48 ± 0,06</b>	0,77 ± 0,07	F = 29,7*
Shannon	1,59 ± 0,14	<b>2,11 ± 0,15</b>	<b>0,91 ± 0,1</b>	1,70 ± 0,21	F = 29,48*

\*  $p \leq 0,05$ ; los números en negrita indican significativamente diferente del CO ( $p < 0,05$  en test post hoc de Dunnet o Dunn según corresponde).

El análisis de componentes principales para la diversidad Beta mostró cuatro grupos correspondientes a los tratamientos (como se observa en la **Figura 30 A**), las réplicas de cada tratamiento se asemejan y agrupan). En el eje X (donde se representó la mayor parte de la variación,  $\lambda PC1 = 59,2 \%$ ), las comunidades CO se ubican próximas a las de los tratamientos HBGLI y HBGLI+CIP, mientras que las comunidades del tratamiento CIP fueron las más dispares según los taxones presentes (**Figura 30 A**). De manera similar, el análisis UPGMA presentó al tratamiento HBGLI+CIP como el más estrechamente relacionado al grupo CO, y seguidamente, HBGLI. Por su parte, el tratamiento con CIP, según la abundancia relativa de taxones en cada tratamiento, resultó el más distante (**Figura 30 B**).

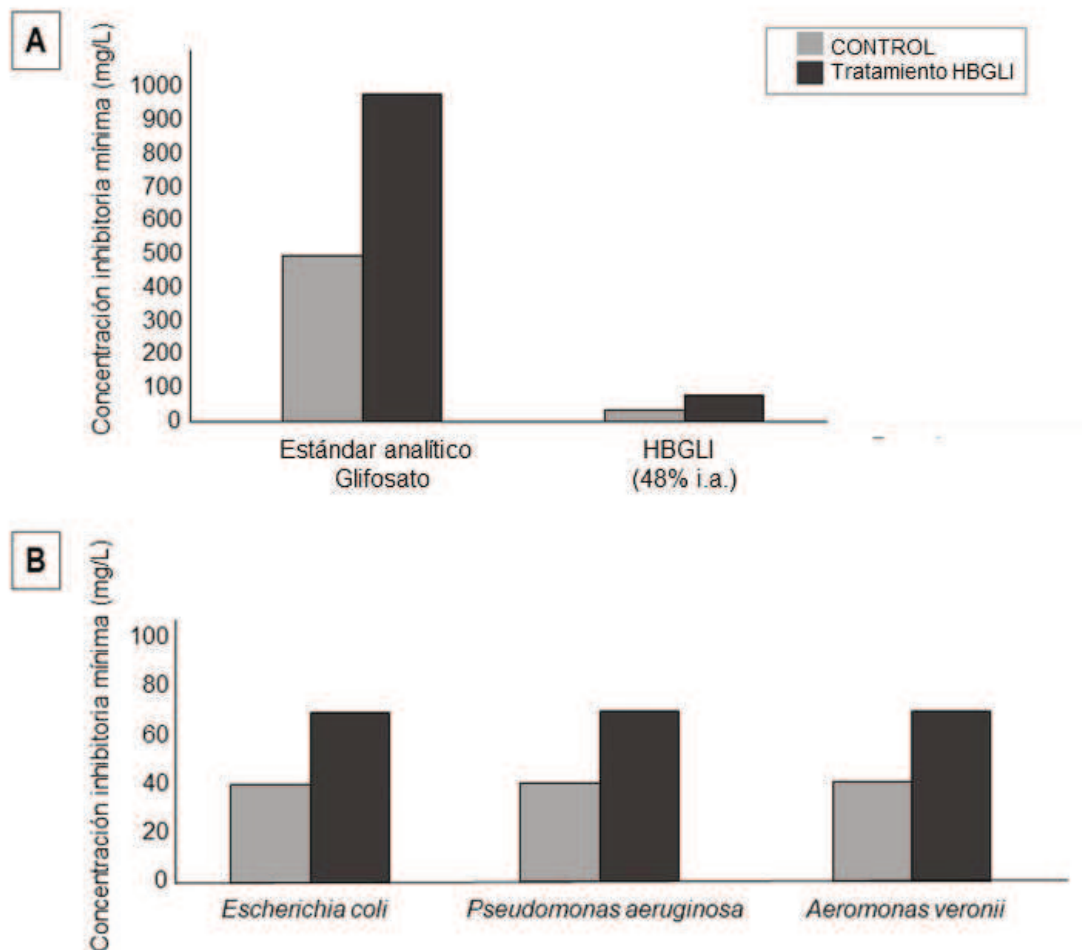


**Figura 30.** Diversidad beta (variación en la composición de taxones) de bacterias entéricas entre muestras de los diferentes tratamientos: control (CO), 2,5 mg L<sup>-1</sup> herbicida a base de glifosato Roundup® (HBGLI), 100 µg L<sup>-1</sup> de ciprofloxacina Cirax®, mezcla 50:50% de ambos (HBGLI+CIP); mezcla 50:50% HBGLI y 2,5 µg L<sup>-1</sup> de clorpirifós Manchester®, mezcla 50:50% CIP y 100 µg L<sup>-1</sup> de amoxicilina Amoxidal® (AMX), mezcla 25:25:25:25% de todos los compuestos (HBGLI+CP+CIP+AMX). **A.** El biplot del análisis de componentes principales muestra los patrones de separación de los tratamientos basados en diferentes taxones (géneros) predominantes. **B.** Agrupamiento jerárquico (método de grupos de pares no ponderados con medias aritméticas) de réplicas de tratamientos basados en la composición de taxones (a nivel de género).

## 3.2.4.2. Análisis de sensibilidad bacteriana

*Concentración inhibitoria mínima de glifosato*

El rango de valores de la concentración inhibitoria mínima varió según el compuesto utilizado para la microdilución, observándose en general para todas las especies una mayor inhibición con el estándar de GLI que para el formulado comercial (se ejemplifica en *E. coli* en la **Figura 31 A**). Dado que el formulado comercial es más representativo de los escenarios reales, se profundizó en el estudio de la concentración inhibitoria mínima de este compuesto por sobre el estándar analítico. Los valores obtenidos para la concentración mínima inhibitoria de HBGLI difirieron según la especie (**Figura 31 B**), aunque se mantuvieron en el rango de los 20 a 100 mg L<sup>-1</sup> en la mayoría de los casos.

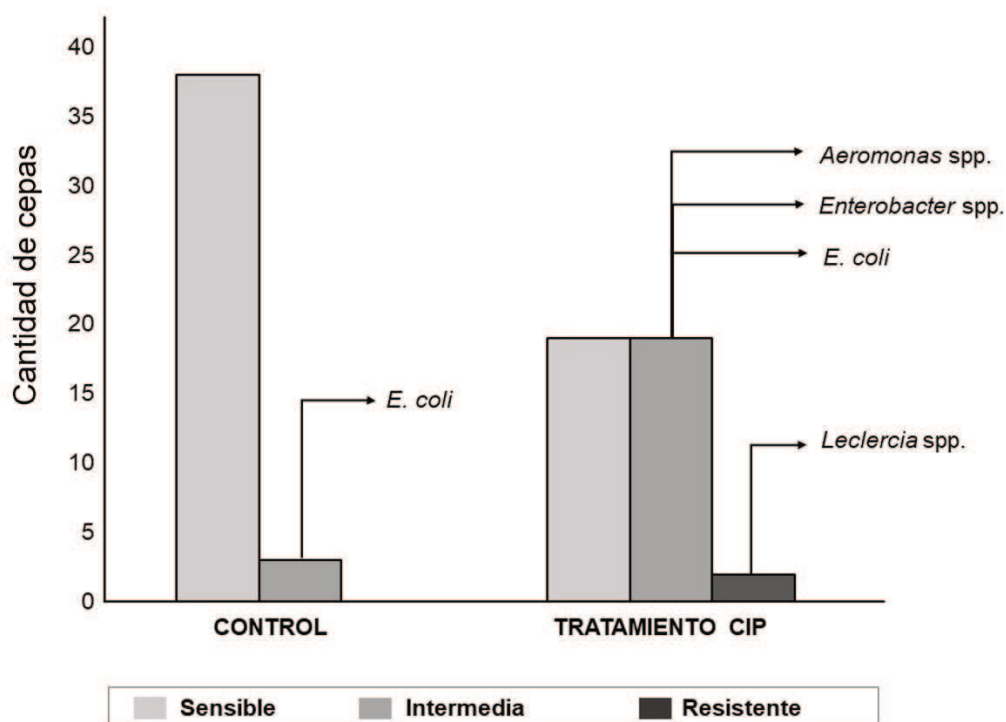


**Figura 31.** Evaluación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de Glifosato en bacterias intestinales de larvas de *R. arenarum* control y expuestas a un herbicida a base de glifosato (HBGLI). **A.** Comparación de valores de CIM de glifosato obtenidos para *E. coli* según el compuesto usado: estándar analítico de glifosato y herbicida a base de glifosato (HBGLI, Mifos® con 48% del ingrediente activo). **B.** Comparación de CIM del HBGLI Mifos® de tres especies bacterianas diferentes.

### Concentración inhibitoria mínima de ciprofloxacina

El análisis de la CIM de CIP mostró un aumento de cepas intermedias y resistentes al antibiótico en el tratamiento con CIP respecto al control (**Figura 32**). De las cepas control, se registró únicamente un 7,31 % de cepas intermedias (todas *E. coli*), siendo el resto sensible al antibiótico. De las cepas del tratamiento con CIP se registraron 47,5 % cepas intermedias, 47,5 % sensibles, y un 5 % resistentes. Las cepas intermedias incluyeron a *E. coli*, *Aeromonas* spp. y *Enterobacter* spp., mientras que las dos cepas resistentes fueron identificadas como *Leclercia* spp.

Por su parte, el tratamiento con CIP se caracterizó por una disminución de la diversidad de especies respecto al control, disminución de algunas especies como *E. coli*, aumento de la dominancia de ciertos géneros como *Aeromonas* spp., y aparición de otros géneros como *Leclercia* spp.



**Figura 32.** Caracterización de bacterias intestinales de larvas de *R. arenarum* según halos de inhibición de ciprofloxacina (determinación de CIM según método de difusión en placa).



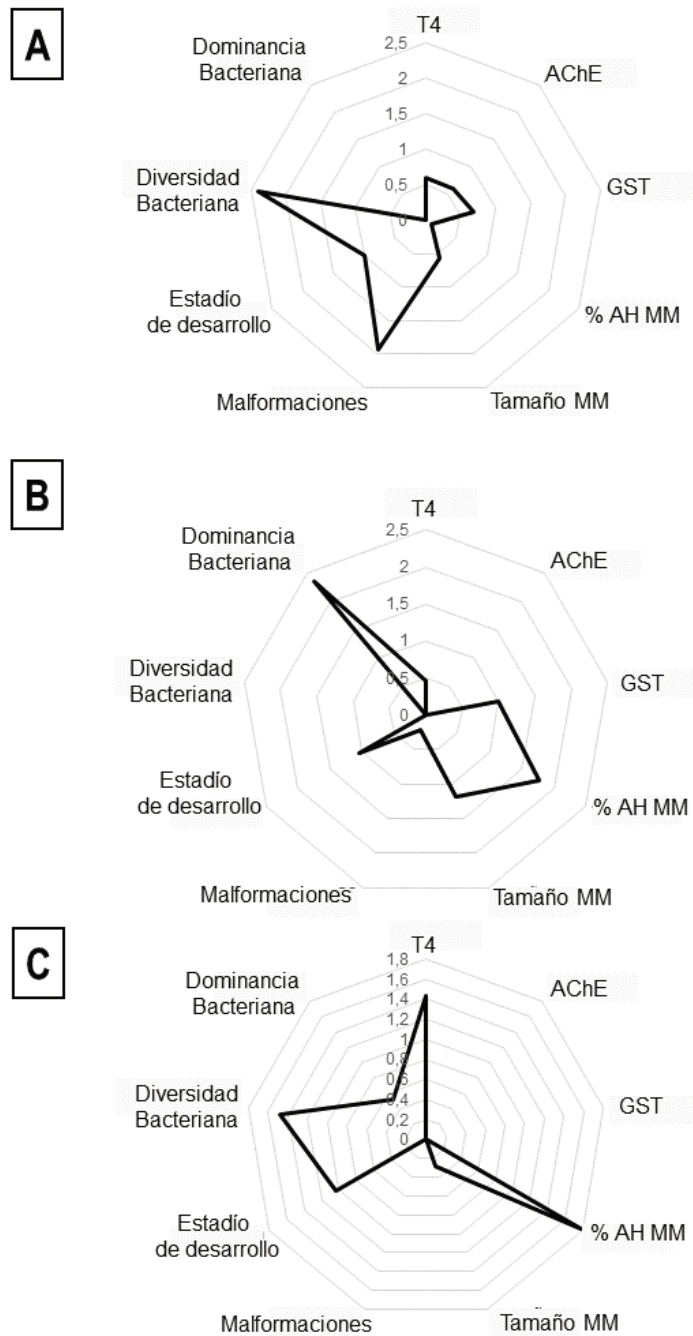
### 3.2.5. Análisis integral de biomarcadores

#### *Índice de respuesta biológica integrada*

El IBR representado por el área total del polígono obtenido en los gráficos radiales para cada tratamiento, fue mayor para el tratamiento CIP (IBR = 2,7) respecto a HBGLI y HBGLI+CIP (IBR= 1,33 y 1,4, respectivamente). También se evidenciaron diferencias en cuanto al tipo de respuesta de las larvas en cada tratamiento (**Figura 33**). El tratamiento HBGLI mostró una marcada respuesta de biomarcadores a nivel organismo (malformaciones) y de comunidad (diversidad de géneros bacterianos). Por su parte, el tratamiento CIP también mostró importantes efectos a nivel de comunidad, aunque sobre la dominancia bacteriana. También produjo efecto a nivel histológico sobre el % AH MM, y a nivel organismo, sobre el estadio de desarrollo. El tratamiento HBGLI+CIP afectó a biomarcadores con respuesta en los tratamientos individuales, aún más marcadamente al % AH MM, además del estadio de desarrollo y diversidad bacteriana. Este tratamiento se diferenció del resto de los tratamientos por una marcada respuesta a nivel bioquímico sobre los niveles de T4.

#### *Índice de Interacción*

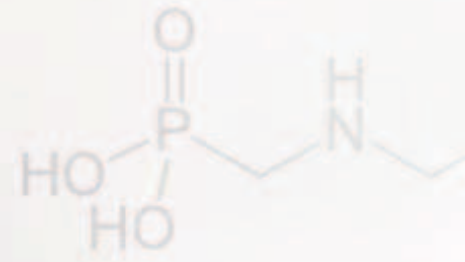
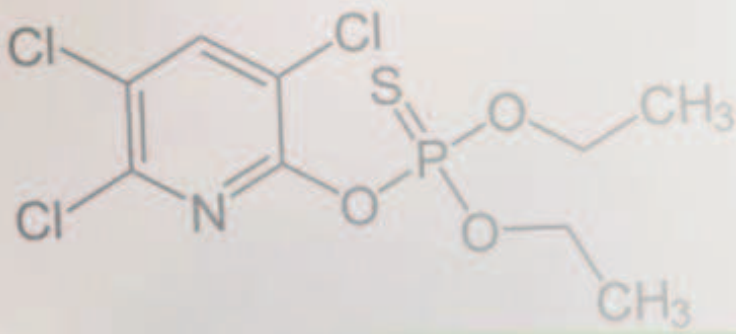
Los II obtenidos para cada biomarcador del ensayo con HBGLI y HBGA mostraron dos principales tendencias: para algunos parámetros, los componentes de la mezcla no interaccionaron y resultaron en aditividad, mientras que otros mostraron antagonismo (**Tabla 8**). La interacción fue aditiva para T4, GST, estadio de desarrollo y diversidad bacteriana. En cuanto a la respuesta observada del % AH MM, tamaño MM, la tasa de malformaciones y dominancia bacteriana, la mezcla resultó en potenciación de los efectos individuales. Sólo para la AChE, el tratamiento HBGLI+HBGA mostró potenciación de los efectos individuales.



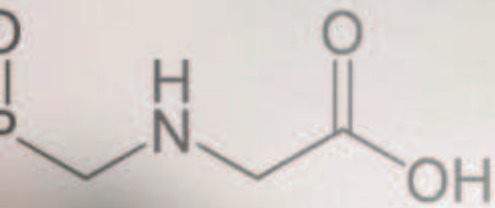
**Figura 33.** IBR para larvas de *R. arenarum* expuestas a  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  herbicida a base de glifosato Roundup®, HBGLI, (A);  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de ciprofloxacina Cirax®, CIP (B); mezcla 50:50% de ambos, HBGLI+CIP (C), en respuesta a biomarcadores de nivel bioquímico (T4, GST y AChE), histológico (% AH MM y tamaño promedio de MM), organismo (EG y %malformaciones) y comunidades (diversidad y dominancia bacteriana).

**Tabla 8.** Índices de interacción (II) entre los herbicidas a base de glifosato (HBGLI) y ciprofloxacina (CIP). Los valores de cada biomarcador corresponden a la media obtenida para cada tratamiento. Se consideran las diferencias significativas en los tratamientos con respecto al control para definir el efecto positivo (↑) o negativo (↓) y así establecer el tipo de interacción.

Biomarcador	CO	HBGLI	CIP	HBGLI+CIP	II	Efecto significativo de los tratamientos individuales	Tipo de interacción
T4	4,44	6,25	5,71	7,20	0,97	-	Aditividad
AChE	25,26	20,16	24,51	12,28	0,84	↓	Potenciación
GST	120,13	106,1	124	98	0,95	-	Aditividad
%AH MM	0,580	2,73	4,25	3,07	0,52	↑	Antagonismo
Tamaño MM	13,06	34,5	42,3	27,6	0,53	↑	Antagonismo
EG	34,77	35,22	31,36	30,87	0,99	-	Aditividad
Tasa malformación	0,2	5,4	5,5	5,51	0,52	↑	Antagonismo
Diversidad Bacteriana (Chao)	6,66	10,25	4,33	8	1,01	-	Aditividad
Domiancia Bactiana	0,248	0,133	0,51	0,216	0,72	↑	Antagonismo



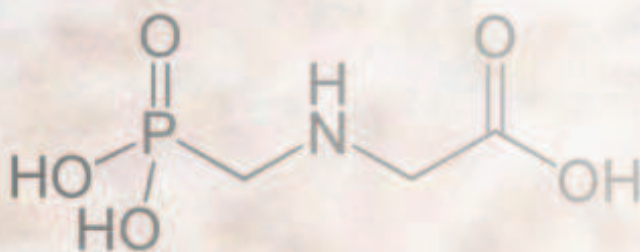
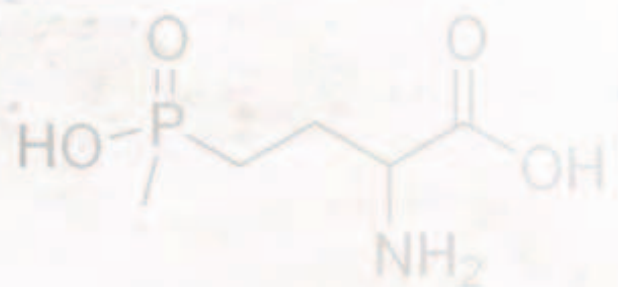
## 4 . DISCUSIÓN



**4.1. Bioensayo con herbicidas**

**4.2. Bioensayo con herbicida, insecticida y antibióticos**

**4.3. Integración y vinculación de los resultados**



Los herbicidas a base de glifosato y glufosinato de amonio, “HBGLI” y “HBGA”, son los herbicidas más empleados en muchos países del mundo (Geng *et al.*, 2021). En Argentina, se desarrollan cada vez más eventos transgénicos para la tolerancia a ambos herbicidas en los principales cultivos nacionales como el maíz, soja y algodón, lo que induce a la aplicación conjunta de estos compuestos (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2022). Adicionalmente, la aplicación de insecticidas como el clorpirifós “CP” a los cultivos complejiza aún más el escenario de contaminación de las matrices agroindustriales que concentran tanto herbicidas, como insecticidas. Junto con la exponencial expansión de cultivos hacia ecosistemas semiáridos, bosques y humedales, el aumento del uso de pesticidas y la consecuente contaminación representan una gran amenaza para los sistemas naturales y contribuyen al cambio climático a través de la emisión de gases de efecto invernadero (Grau *et al.*, 2005; Siyum, 2020). Por su parte, los antibióticos CIP y AMX de uso excesivo tanto humano como veterinario, también suman significantes concentraciones y biodisponibilidad en los diferentes ecosistemas acuáticos a través de la contaminación puntual o difusa de efluentes domiciliarios, industriales y hospitalarios sin previo tratamiento, por escorrentía de suelos agrícolas, por su uso excesivo en medicina veterinaria (principalmente en megaindustrias de la carne), entre otros (Zhang *et al.*, 2016).

La introducción continua de estos CPE en los ecosistemas acuáticos produce una exposición crónica de los organismos durante su ciclo de vida. Existen numerosas evidencias de que la presencia simultánea de los pesticidas, al igual que los antibióticos representa un riesgo para organismos en diferentes matrices ambientales (por ejemplo, Demonte *et al.*, 2018; Peltzer *et al.*, 2019; Geng *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2022; Lajmanovich *et al.*, 2022). Sin embargo, la posible interacción de estos CPE es poco estudiada y merece más atención. Este estudio ha abordado el efecto individual y conjunto de estos CPE sobre distintos biomarcadores en larvas de anuros. Dado que estos organismos son considerados bioindicadores de alerta temprana (Eterovick *et al.*, 2016), resultan de gran utilidad para la interpretación y caracterización de la salud ambiental. Además, los anfibios también son considerados como excelentes organismos modelo, dado que los mecanismos de desarrollo y organogénesis como también la enzimología y hormono-dependencia tiroidea son similares y ortólogos a diversas especies incluyendo la humana (Buchholz, 2015), los resultados obtenidos permiten abordar transversalmente los riesgos e implicancias de la contaminación del ambiente.

#### 4.1. Bioensayo con herbicidas

##### 4.1.1. Análisis bioquímico

El estudio de ciertos biomarcadores bioquímicos resulta de gran importancia para estimar las implicancias directas de ciertos xenobióticos sobre biomoléculas esenciales de los sistemas biológicos (por ejemplo, enzimas y hormonas), así como también los efectos indirectos sobre diversos procesos fisiológicos en los que éstas intervienen. Para los vertebrados, la alteración de la hormona tiroidea compromete la salud, el estado físico y, en última instancia, la supervivencia de los organismos, debido a los diversos procesos en los que intervienen incluidos el crecimiento, el desarrollo y la reproducción (Marlatt *et al.*, 2013; Grott *et al.*, 2022). En los anfibios, el eje tiroideo controla, además, las fases pre y prometamórficas hasta la metamorfosis final, por lo que la disrupción de la tiroidea tiene implicancias a nivel organismo (Tietge *et al.*, 2005; Denver, 2013; van Wyk, 2013). En este estudio, los niveles de T4 aumentaron en el tratamiento HBGA. Al respecto, Babalola *et al.* (2021) han reportado agrandamiento de la glándula tiroidea y del epitelio folicular, así como una alteración del eje tiroideo en larvas de *Xenopus laevis* expuestas a 0,15 y 0,25 mg L<sup>-1</sup> del HBGA Basta®. En este sentido, la exposición a HBGA podría regular positivamente la producción de T4 o directamente reduciendo o inhibiendo las hormonas tiroideas circulantes, lo que resulta en una sobreestimulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroidea (Degitz *et al.* 2005).

Como se mencionó anteriormente, la hormona tiroidea regula un complejo conjunto de procesos fisiológicos relacionados al crecimiento y desarrollo. A pesar del significativo aumento de los niveles de T4 en el tratamiento con HBGA, esto no implicó un incremento en el crecimiento de los individuos como se constató en el análisis morfológico (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2022). Similarmente, Degitz *et al.* (2005) y Coady *et al.* (2010) también reportaron alteración química del eje tiroideo sin un aumento de parámetros relacionados al crecimiento de las larvas, como la longitud y el peso corporal, y el estadio de desarrollo. Según Tata (1998), esto se debe a que el crecimiento no está directamente bajo el control únicamente de la hormona tiroidea, ya que hay otros factores que promueven el crecimiento. Aún más, varios estudios que han demostrado efectos histopatológicos sobre la glándula tiroidea -parámetro considerado el más sensible para medir la respuesta de la hormona-, han destacado que la disrupción endócrina no estuvo acompañada de efectos en el desarrollo (Brandt-Lavridsen *et al.* 2010; Babalola *et al.*, 2021).

Además del efecto endócrino del HBGA relacionado al aumento de los niveles tiroideos, el análisis bioquímico también sugiere un efecto colinestérico del HBGLI sobre la actividad de la AChE. Esta enzima se considera un componente esencial de las sinapsis colinérgicas en los

sistemas nerviosos (Franjesevic *et al.*, 2019). Su mayor actividad conduce a una mayor liberación de neurotransmisores en las hendiduras sinápticas colinérgicas y, en consecuencia, a la sobreestimulación de los receptores postsinápticos. Al respecto, Malafaia *et al.* (2021) sugiere que el aumento de la enzima estaría con los efectos del estrés oxidativo inducido por el HBGLI. Aunque los mecanismos específicos a través de los cuales se produce el aumento de la AChE por exposición crónica de HBGLI no son claros, la disrupción en el sistema nervioso por alteración de estas enzimas puede conducir a cambios de comportamiento que representan un riesgo para la supervivencia de los organismos (Sanchez-Hernandez, 2007). Además, el HBGLI puede causar efectos neurológicos debido a la capacidad de algunos componentes presentes en el HBGLI para cruzar la barrera hematoencefálica (Peillex & Pelletier, 2020).

En contraste, la AChE no se vio afectada por la exposición a HBGA. Por el contrario, ensayos agudos previos de nuestro laboratorio mostraron una inhibición significativa de la actividad de la enzima en larvas de *Scinax squalirostris* y *Boana pulchellus* expuestas a concentraciones más altas de HBGA (6,25 y 15 mg L<sup>-1</sup> de Liberty®, respectivamente; Peltzer *et al.*, 2013; Lajmanovich *et al.*, 2022). Estas diferencias entre los estudios previos y los resultados de este bioensayo sugerirían una respuesta diferencial según la acción específica de la especie, el tiempo de exposición o bien, que los efectos tendrían lugar ante la exposición a concentraciones más altas que las probadas en el presente estudio (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2022). Sin embargo, no se debe subestimar el efecto conocido de GA sobre el sistema nervioso. Varios estudios alertaron sobre las consecuencias de la exposición a GA sobre los sistemas nerviosos, incluyendo la alteración estructural del tejido (Calas *et al.*, 2008; Lee & Kang, 2021, Yeon *et al.*, 2022) y otros parámetros relacionados con el funcionamiento nervioso como el desempeño locomotor y la función muscular (Kutlesa & Caveney 2001; Peltzer *et al.*, 2013).

Otro proceso metabólico que puede verse afectado ante la exposición a contaminantes como los herbicidas HBGLI y HBGA es la detoxificación. La GST juega un papel clave en la fase II del proceso de biotransformación que protege a las células de los contaminantes (van der Oost *et al.*, 2003). Es de esperar que GST aumente ante la exposición a contaminantes para contribuir a los procesos de desintoxicación y protección de tejidos del estrés oxidativo (Livingstone, 2001). De hecho, existen varios estudios que describieron la inducción de GST ante la exposición aguda de anfibios a herbicidas individuales y mezclas de dos o más compuestos (Lajmanovich *et al.*, 2013; Güngördü *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2017). Sin embargo, en el presente estudio, la actividad de GST disminuyó en la exposición crónica a HBGA y HBGLI+HBGA. La activación de la actividad de GST en respuesta a la exposición aguda reportada en la bibliografía, en contraste con la ausencia de cambios en respuesta a la exposición crónica prolongada observada en este estudio para el tratamiento con HBGLI y la

disminución para los tratamientos con HBGA y HBGLI+HBGA sugieren una acción dependiente del tiempo y del compuesto (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2022). Este patrón podría deberse a distintas causas: la inactivación de la enzima por los contaminantes, agotamiento de la conjugación del glutatión y la consecuente pérdida de actividad de la GST, o bien, a una adaptación fisiológica de estos organismos a los contaminantes (Ensibi *et al.*, 2011). Particularmente, la disminución de GST en el tratamiento con HBGA y HBGLI+HBGA puede estar relacionada con la interferencia de GA en la biosíntesis de glutatión, debido a la similitud estructural con el glutamato y, en consecuencia, a la interferencia de su función (Suter & Sachsse, 1986, Ebert *et al.*, 1990). Además, se conoce que los herbicidas pueden provocar un desequilibrio en el estado redox celular, provocando estrés oxidativo del organismo mediante la formación excesiva de especies reactivas de oxígeno (Wilkens *et al.*, 2019). El estrés oxidativo puede causar inactividad enzimática, daño al ADN/ARN, oxidación de macromoléculas, apoptosis celular, mutagénesis, carcinogénesis, entre otras alteraciones (Lushchak & Bagnyukova 2006; Costantini, 2014; Jones & Go, 2010). Se han registrado casos de estrés oxidativo causado por la exposición a herbicidas en diferentes estadios larvarios de anfibios (Costa *et al.*, 2008; Lajmanovich *et al.*, 2011; Dornelles & Oliveira, 2014; Yin *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2017; Gripp *et al.*, 2017;).

#### 4.1.2. Análisis histológico

Las alteraciones en configuración corporal de las larvas de *R. arenarum* tratadas con HBGA son coincidentes con un estudio previo que describe malformación axial, edemas generalizados, abdominales y cardíacos en larvas de *X. laevis* expuestas a un HBGA (Babaloa *et al.*, 2021). Un análisis molecular a nivel transcriptómico reveló que ratones tratados con 0,2 y 1 mg/kg de GA PESTANAL® puede desregular varios procesos involucrados en el desarrollo de como la adhesión célula-célula (Celsr2, ANK3), la proliferación celular (MKi67), la diferenciación celular (GFAP, DCX, CD24, FoxJ1) (Herzine *et al.*, 2016). La alteración de estos procesos clave durante el desarrollo embrionario pueden tener importantes consecuencias en la configuración corporal, y podría relacionarse a los efectos registrados en el ensayo a nivel histológico (Feat-Vetel *et al.*, 2018).

Por su parte, en el tratamiento HBGLI+HBGA se ha observado una alteración cardíaca a nivel de las trabéculas ventriculares. Dado que el corazón es el primer órgano que se vuelve funcional en el embrión y las modificaciones trabeculares son consideradas como un parámetro para inferir alteraciones estructurales más generales a nivel cardíaco, esta histopatología registrada en el tratamiento HBGLI+HBGA podría tener gran significancia en la salud de las



larvas (Heymsfield *et al.*, 1978; Lima *et al.*, 2020). La misma podría deberse al conocido efecto cardiotoxico que se ha reportado para ambos herbicidas individualmente. Existen diversos estudios que advierten sobre alteraciones en la estructura y funcionamiento cardíaco en exposiciones a HBGLI y HBGA (Roy *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2021; Flach *et al.*, 2022). Específicamente, la comparación del efecto cardiotoxico de los principios activos de ambos herbicidas en grado técnico (GLI y GA 95%), y de las formulaciones comerciales (1 mM HBGLI 41% y HBGA 13.5%) en un estudio en ratas ha reportado que el GA por sí solo no produjo alteraciones cardiovasculares, mientras que el GLI, y ambas formulaciones modificaron la vasorelajación y tensión aórtica (Chan *et al.*, 2007). Al respecto, se ha sugerido que el efecto cardiotoxico del HBGA no se atribuye al componente principal, GA, sino principalmente por el surfactante aniónico, éter alquilarílico de polioxietileno, debido a sus efectos vasodilatadores y cardioestimuladores (Koyama *et al.*, 1997). El hecho de que ambos formulados tengan el potencial cardiotoxico y tal efecto solo haya sido observado en el tratamiento de mezcla de ambos herbicidas sugiere un efecto sinérgico sobre este parámetro (Lajmanovich *et al.*, 2019; Cuzziol Boccioni *et al.*, 2022). Resulta de interés profundizar en próximos estudios en la respuesta fisiológica de este órgano además de su respuesta estructural, ya que los biomarcadores fisiológicos han demostrado ser fundamentales en la comprensión de la respuesta integrada de los individuos a la exposición a contaminantes (Peltzer *et al.*, 2023).

La evaluación del hígado basada en el análisis cuantitativo del área hepática ocupada por MMs fue significativamente mayor en las larvas expuestas a los tratamientos con herbicidas. El incremento de los MMs hepáticos puede ser asociado con procesos de detoxificación (Harraez & Zapata 1986) y con su rol en la función inmune (Steinel & Bolnick, 2017). La función inmune y desintoxicante es atribuida principalmente a la melanina almacenada en el interior de estas células, que juega un papel protector al eliminar los radicales libres y neutralizar los cationes para proteger al tejido contra el daño citotóxico (Curi *et al.*, 2019). En concordancia con la respuesta de las larvas expuestas a los tratamientos con ambos herbicidas en este estudio, existen distintos precedentes que indican la sensibilidad selectiva del hígado al GLI y GA por sobre otros órganos, y la hepatotoxicidad que estos herbicidas pueden generar. Estudios en anfibios Leptodactílidos han alertado un aumento del número de MM hepáticos además de otras alteraciones histológicas (Pérez Iglesias *et al.*, 2016; Bach *et al.*, 2018). Además, se han descripto diversas alteraciones histológicas vacuolización, lipidosis y tamaño general del órgano en organismos como el cangrejo de río y lagartijas expuestas a un amplio rango de concentraciones (1-100 mg L<sup>-1</sup>) y dosis de 40 mg Kg<sup>-1</sup> de GA, respectivamente (Zhang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2023). Además, el análisis hepático y el estudio de los MM en este órgano como biomarcador histológico es considerado un parámetro útil y sensible para estudiar la respuesta del organismo a la exposición a un contaminante (López *et al.*, 2023). Si bien el

aumento de los MM es reconocido como una respuesta inicial a la exposición a pesticidas y parte del sistema de defensa temprano, su marcado incremento en tiempos prolongados de exposición como en este estudio, dan cuenta de que este biomarcador es persistente durante el proceso de exposición. Su función posterior a la defensa temprana podría estar relacionada al proceso inflamatorio, dadas sus propiedades fagocíticas (Pérez-Iglesias *et al.*, 2019).

#### 4.1.3. Análisis morfológico

La etapa temprana del desarrollo de los anfibios es un período crítico donde el embrión experimenta cambios morfológicos complejos que pueden verse afectados negativamente por la exposición a varios tipos de contaminantes (Vandenberg *et al.*, 2012). En este estudio, las tasas de anomalías morfológicas registradas para las larvas control ( $\approx 5\%$ ) estuvieron de acuerdo con las tasas esperadas para las poblaciones silvestres de anfibios, típicamente por debajo del 5% (Blaustein & Johnson, 2003). Por su parte, las tasas de anomalías morfológicas de los tratamientos de HBGLI y HBGA han duplicado y triplicado el porcentaje registrado en el control, respectivamente. El tratamiento HBGLI+HBGA tuvo un porcentaje similar al tratamiento HBGLI individual. Las tasas significativamente altas de malformaciones respecto al control para todos los tratamientos de este bioensayo sugieren que tanto el HBGLI como el HBGA son teratogénicos para las larvas de *R. arenarum* (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2022). Un estudio reciente sobre el efecto de un HBGLI junto con otros contaminantes también determinó altas tasas de anomalías para larvas de *R. arenarum* expuestas al herbicida, y entre las principales alteraciones, edemas, organización visceral anormal, asimetría bilateral y anomalías oculares (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2021). Estudios en larvas de otras especies de anfibios también respaldan los efectos teratogénicos de concentraciones subletales de HBGLI en larvas. Por ejemplo, Lajmanovich *et al.* (2003) han reportado malformaciones craneofaciales y bucales, colas con alteraciones respecto al eje dorsoventral o lateral, y anomalías oculares en *Scinax nasicus*, especie común que coexiste con *R. arenarum*. Estudios en *X. laevis* también han reportado malformaciones craneofaciales e intestinales, edemas, cola curvada y alteraciones óseas ante la exposición a HBGLI (Perkins *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2017; Bonfanti *et al.*, 2018). Si bien los diversos reportes sobre que las malformaciones en las larvas de anuro dependen especialmente de la formulación, el tiempo de exposición y la concentración, el efecto teratogénico de HBGLI resulta evidente. La teratogenicidad de HBGLI podría estar asociado al aumento de la actividad de los retinoides endógenos que produce la exposición de estos compuestos en anfibios, ya que estos compuestos inhiben la expresión de genes implicados en múltiples procesos de desarrollo como la asimetría izquierda-derecha, el desarrollo del mesodermo y la notocorda precordial y el patrón dorsal-ventral del tubo neural

(Paganelli *et al.*, 2010). Otros estudios en diferentes larvas de anuros sugirieron que los surfactantes parecen ser los principales responsables de la toxicidad de las formulaciones de HBGLI en término de malformaciones (Mann & Bidwell, 1999; Howe *et al.*, 2004).

Los efectos teratogénicos fueron aún más evidentes en el tratamiento HBGA a las 48 hs de exposición que en otros tratamientos con herbicidas, siendo la tasa de malformaciones casi el triple que la del control, y el doble que la de los demás tratamientos. Babalola *et al.* (2021) estudiaron la alteración morfológica de larvas de *Xenopus laevis* expuestas a 1,6–3,0 mg L<sup>-1</sup> de un HBGA. En coincidencia con las observaciones de este estudio, estos autores reportaron edema, anomalías intestinales, alteración axial, ocular y cefálica como los tipos de anomalías más frecuentes. También se informaron efectos teratogénicos de GA para larvas de pez cebra y embriones de ratón, incluyendo alteraciones de la curvatura de la cola y de la cabeza, respectivamente (Watanabe & Iwase, 1996; Wang *et al.*, 2016). Aunque existe cierto escepticismo y escasos datos técnicos para considerar el GA o los HBGA como productos teratogénicos, los limitados reportes sobre casos de malformaciones en organismos expuestos y la significativamente elevada tasa de malformaciones obtenida en este trabajo sugieren la necesidad de profundizar los estudios el potencial teratogénico de estos compuestos (Donthi & Kumar, 2022).

#### 4.1.4. Análisis bacteriológico

Aunque la composición de la microbiota bacteriana intestinal puede variar dependiendo de muchos factores (como temperatura, pH, conductividad y variación inter o intraespecífica), los taxones identificados dependerán del método de aislamiento e identificación (Jiménez & Sommer, 2016; Tong *et al.*, 2020). La mayoría de las bacterias entéricas que se han identificado pertenecen a bacterias Gram (-) de la familia Enterobacteriaceae. En las investigaciones más recientes sobre la variación de la microbiota intestinal de los anfibios en respuesta a contaminantes, la identificación se basó en el aislamiento y la secuenciación del ADN directamente del intestino, e incluyó un repertorio más amplio de taxones analizados a mayor escala (Evariste *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2020). En este sentido, Lozano *et al.* (2018) explicaron que, dado que las cepas cultivables de la microbiota bacteriana intestinal de rata son una parte menor de la microbiota intestinal total, sería menos probable que se detectaran los efectos del HBGLI en la comunidad microbiana que en toda la comunidad mediante el método de secuenciación. Por el contrario, otros autores han afirmado que la secuenciación 16S no debería usarse para estudiar la “dominancia” de ciertos taxones de orden superior sobre otros (por ejemplo, Bacteroidaceae vs. Enterobacteriaceae) o para determinar si los taxones están ausentes

en una muestra sin antes realizar una evaluación comparativa de un alta correlación entre estas observaciones y el estándar de oro de la cultura, ya que este método podría significar muy poco a nivel de población o especie individual (Martinson *et al.*, 2019). En este estudio, se analizaron las cepas del contenido intestinal aisladas a partir del cultivo en placa, por lo que el análisis estuvo limitado a aquellas especies que crecieron en la placa. Sin embargo, la variación de los taxones identificados por cultivo puede ser el punto de partida para futuros estudios que profundicen en los efectos de los contaminantes sobre la microbiota a mayor escala (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2023).

Si bien se registraron diferencias en la composición de la microbiota bacteriana intestinal de las larvas de todos los tratamientos, el análisis de diversidad mostró diferencias significativas respecto a la composición normal descrita para el control sólo en el tratamiento HBGA, en el cual se registró una menor diversidad de géneros bacterianos. El conocimiento sobre el impacto del GA sobre la microbiota intestinal de organismos no-blanco es muy escaso. Existe un único estudio previo sobre esta temática en ratones, en el cual se ha informado que la exposición a GA afectó la microbiota intestinal y ello indirectamente, indujo a alteraciones conductuales en la descendencia, por lo que las implicancias de la modificación de la microbiota podría tener severas implicancias a largo plazo (Dong *et al.*, 2020). Al respecto, se ha sugerido que la microbiota intestinal podría participar en la formación de ácido retinoico (el metabolito activo del retinol). La inhibición del metabolismo del retinol durante las primeras etapas del desarrollo podría conllevar a alteraciones neurogénicas (Biesalski, 2016). En este sentido, varios estudios han relacionado la alteración de las comunidades bacterianas durante las primeras etapas de la vida con diversas enfermedades en etapas posteriores (Tamburini *et al.*, 2016).

En cuanto al efecto del HBGA sobre los microorganismos en sí, la mayoría de la información existente ahonda en el impacto de este herbicida sobre la comunidad microbiana del suelo. Hay diversos estudios que describen que el GA o los HBGA no tienen efectos significativos en la estructura de la comunidad microbiana del suelo mientras que otros indican efectos positivos y negativos significativos sobre la abundancia relativa de diferentes bacterias del suelo, lo que destaca la necesidad de realizar investigaciones específicas para cada contexto (Dennis *et al.*, 2018; Hudek *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2019). En su estudio, Pattinson *et al.* (2024) han resaltado que los efectos de un HBGA sobre las comunidades microbianas del suelo son principalmente indirectos, a través de la reducción de la cubierta vegetal del suelo disponible para los microorganismos. En este sentido, si bien esto último no es comparable directamente con la microbiota bacteriana intestinal dentro del huésped, resulta interesante tener en cuenta la posibilidad de que el efecto del HBGA sobre los microorganismos también pueda deberse

también a los factores y condiciones externos a los microorganismos que el herbicida pueda propiciar en el intestino de las larvas.

Entre las modificaciones más evidentes en la comunidad bacteriana aislada del intestino de las larvas tratadas con HBGA, se destacó la disminución significativa de la diversidad con ausencia de géneros como *Serratia* spp., *Klebsiella* spp. y *Proteus* spp., aunque también se registró la presencia del género *Yersinia* spp., y una mayor abundancia del género *Citrobacter* spp. respecto al control. Esta variación en la composición normal de la comunidad bacteriana intestinal podría deberse a la relativa sensibilidad de cada género al herbicida al que han sido expuestos. Se ha descrito a modo general, que el herbicida puede resultar tóxico para algunos grupos bacterianos, mientras que otros son capaces de utilizar el herbicida como fuente de energía y nutrientes (Allen-King *et al.*, 1995). Se sabe que algunos microorganismos pueden utilizar el GA como fuente de nitrógeno, en presencia de suficiente carbono (Pampulha *et al.*, 2007). En este sentido, los géneros que estuvieron disminuidos o ausentes podrían corresponderse con aquellas bacterias sensibles al herbicida como tóxico, mientras que los géneros novedosos e incrementados respecto al control, podrían corresponder a aquellos capaces de utilizar el GA como fuente de nitrógeno. Además, no debe descartarse el potencial efecto que podrían tener los demás ingredientes no declarados del formulado comercial sobre los microorganismos como ya ha sido alertado por Duke (2018).

#### 4.2. Bioensayo con herbicida, insecticida y antibióticos

##### 4.2.1. Análisis bioquímico

###### *Hormona tiroidea*

Al final del primer escenario, la concentración más alta de HBGLI ( $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y su mezcla con CIP ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) provocó la disminución de los niveles de T4. En un trabajo anterior, se que  $0,6-2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de HBGLI tenían una capacidad mucho mayor para alterar las hormonas tiroideas (Lajmanovich *et al.*, 2019). De Souza *et al.* (2017) definieron el eje hipotálamo-hipófisis tiroideo (HPT) como la vía que coordina la producción de hormonas tiroideas, que se autorregula mediante un mecanismo de retroalimentación negativa. Estos autores verificaron que el HBGLI altera el eje tirotrófico y provoca la interrupción de la homeostasis de la hormona tiroidea. De manera similar, Vanithakumari & Priyadharshin (2013) demostraron que la CIP también puede inducir cambios en las hormonas tiroideas. Varios agentes exógenos que modifican la síntesis, la secreción, el transporte y el metabolismo de la

hormona tiroidea se estudian comúnmente a través de mecanismos que regulan directa o indirectamente el equilibrio y la alteración de la tiroides (Calsolaro *et al.*, 2017).

En contraste, los niveles de T4 al final del segundo escenario de contaminación desarrollado en etapas posteriores del desarrollo de las larvas de *R. arenarum* mostraron un aumento significativo en los tratamientos con mezclas binarias y cuaternarias. A pesar de que se ha informado que una mayor concentración de T4 acelera la metamorfosis (Carlsson, 2019), el aumento de T4 observado en esta etapa del Bioensayo II estudio estuvo acompañado de un retraso en el desarrollo (en términos de menor EG). Cabe señalar que todos los tratamientos en los que se observó retraso contenían CIP (ya sea individualmente, en mezclas binarias o cuaternarias). Los tratamientos tanto individuales como mezclas conteniendo también mostraron aumento de los niveles de T4. La inducción de cambios hormonales en la tiroides glándula debido a la exposición a largo plazo CIP se ha informado previamente en tratamientos *in vitro* en ratas (Vanithakumari & Priyadharshin, 2013). Este patrón de desarrollo tiroideo contradictorio observado en varios de los tratamientos del segundo escenario en contraste con el primero, podrían estar asociados con un bloqueo de los receptores de la hormona tiroidea y la consiguiente inhibición de la transcripción de genes dependientes de la tiroides involucrada en los cambios durante la metamorfosis (Croft & Herxheimer, 2002). Este complejo mecanismo ha sido descrito para la cloroquina y fármacos químicamente relacionados (Barlow *et al.*, 1997), que son análogos del CIP y pueden explicar el retraso en el crecimiento a pesar del aumento de T4 reportado para tratamientos que contienen este antibiótico.

Otra posibilidad es que la presencia de uno de los compuestos, o la mezcla de ellos, afecta la acción de las desyodasas (Huang *et al.*, 2001), que son enzimas con un papel fundamental en la transformación de T4 a T3 (la forma biológicamente activa de la hormona tiroidea). Zhao *et al.* (2013) reportaron que su alteración puede a su vez alterar el proceso de metamorfosis, y afirmaron que niveles altos de T4 en el clímax de la metamorfosis sin transformarse en T3 no puede inducir cambios morfológicos finales. Se ha demostrado que varios disruptores endócrinos alteran las expresiones de las desyodasas, como el observado con respecto al efecto del acetacloro en las larvas del pez *Gobiocypris rarus* (Li *et al.*, 2009). En base a esto, la alteración endócrina podría estar asociada a la disminución de la producción de T4 como se describe para otros contaminantes, o bien a un mecanismo desconocido. Se necesitan más estudios para dilucidar los mecanismos específicos de disrupción endócrina de las sustancias químicas analizadas.

Los altos niveles de T4 en el segundo escenario del Bioensayo II con respecto a la significativa disminución del primer escenario, sugieren que los mecanismos de alteración endócrina pueden depender de la etapa de desarrollo y pueden variar a lo largo del desarrollo

de los anfibios (Searcy *et al.*, 2012). Los sitios donde actúan los contaminantes (moléculas específicas, células o tejidos) pueden estar activos en diferentes momentos del desarrollo larvario, particularmente aquellos involucrados en la vía tiroidea que regula la metamorfosis y fluctúa entre diferentes etapas de desarrollo (Thambirajah *et al.*, 2019). El efecto sugerido de disrupción endocrina de HBGLI en la disminución en los niveles de T4 en el primer escenario pueden no ocurrir más durante las etapas pre y pro-metamórficas probablemente porque durante estas etapas los sitios objetivo en los que actuó (por ejemplo, genes específicos involucrados en la síntesis de T4) ya no están activos. En cambio, los contaminantes del segundo escenario pueden estar alterando otra parte de la ruta metabólica que impide la bioactivación de la T4, y por lo tanto se acumularía en esa forma (Huang *et al.*, 2001).

### *Enzimas*

Los resultados del análisis de GST del segundo escenario no mostraron variación en los tratamientos de mezclas binarias o químicos individuales con respecto al CO. Por el contrario, se observó una inhibición significativa de la actividad de GST después de la exposición a las mezclas cuaternarias complejas. Estos hallazgos fueron inesperados porque GST juega un papel clave en la desintoxicación de xenobióticos y puede contribuir a proteger problemas del estrés oxidativo al aumentar su actividad (Livingstone, 2001). La actividad de GST se usa comúnmente como un indicador de alteración de la fase II de la biotransformación por parte del sistema de defensa antioxidante (Peltzer *et al.*, 2019). La biotransformación de xenobióticos puede contribuir a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno o cationes radicales de alta toxicidad (Gómez-Oliván *et al.*, 2014).

Varios estudios en larvas de anfibios han informado cambios significativos de GST en la exposición a mezclas de compuestos tóxicos (por ejemplo, Lajmanovich *et al.*, 2013; Güngördü *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2017), contrastando con los resultados de los tratamientos de mezclas binarias de este estudio. Según los estudios previos, la respuesta de la GST puede variar según el tiempo de exposición a los contaminantes. Por ejemplo, un estudio previo en larvas de *R. arenarum* expuestas a 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Roundup Ultra-Max® durante 48 h mostró inducción de GST, mientras que el tratamiento con 1,25 mg L<sup>-1</sup> de HBGLI durante 22 días no alteró la actividad enzimática (Lajmanovich *et al.*, 2019). Además, Rutkoski *et al.* (2020) observaron un aumento de la actividad de la GST en larvas de *P. gracilis* expuestas de forma aguda a CP (30-500 mg L<sup>-1</sup>) durante 168 h. Además, Plhalova *et al.* (2014) informaron un aumento significativo en las actividades de GST en el pez cebra (*Danio rerio*) expuesto subcrónicamente a 0,7 mg L<sup>-1</sup> y 100 mg L<sup>-1</sup> de CIP. Esta activación de la actividad de GST en respuesta a la exposición aguda, en contraste con la ausencia de cambios en respuesta a la exposición crónica prolongada, puede estar relacionada con la inactivación de la enzima por sustancias tóxicas, o con el agotamiento

de la conjugación de glutatión, lo que lleva a que GST pierda su actividad (Ensibi *et al.*, 2011), o bien a una adaptación fisiológica de estos organismos a los contaminantes de los escenarios (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2020). Se necesitan más investigaciones sobre los efectos de esta enzima para determinar las diferencias entre la respuesta a la exposición aguda y crónica. En cuanto a los efectos inhibidores de la actividad de GST por el complejo mezclas cuaternarias, existen trabajos previos que reportaron efectos individuales de los cuatro contaminantes sobre los niveles de GST en tiempos cortos de exposición. Por ejemplo, las larvas de *R. arenarum* tratadas con varias formulaciones comerciales de HBGLI (1,85 y 3,75 mg L<sup>-1</sup>) durante 48 h mostraron una fuerte inhibición de la actividad de GST (Lajmanovich *et al.*, 2011).

En un estudio de campo, Huespe *et al.* (2017) informaron una inhibición significativa de la actividad de GST en la rana *Leptodactylus macrosternum*, después de siete días de exposición a CP aplicado en concentraciones de rutina para insectos control en los cultivos. Por otro lado, varios estudios han reportado Inducción de GST por tratamientos antibióticos. Por ejemplo, tenemos previamente encontró una mayor actividad de GST en larvas de *R. arenarum* expuestas a CIP (1 mg L<sup>-1</sup>) durante 96 h (Peltzer *et al.*, 2017). Del mismo modo, en el pez *D. rerio*, Oliveira *et al.* (2013) encontraron inducción de actividad GST después de la exposición a 1 mg L<sup>-1</sup> AMX durante 96 h. En el presente estudio, encontramos inhibición de la actividad de GST solo para la mezcla cuaternaria, lo que sugiere que la acción individual de cada compuesto no fue suficiente para alterar la actividad de GST. Al respecto, Picó *et al.* (2020) señaló que diferentes tipos de compuestos con mecanismos de acción similares (como algunos pesticidas y ciertos fármacos como los azoles) pueden provocar un efecto sinérgico. Estos resultados resaltan la necesidad de estudiar no solo mezclas binarias simples, como ocurre habitualmente (por ejemplo, Brodeur *et al.*, 2014; Güngördü *et al.*, 2017; Lajmanovich *et al.*, 2013, 2019), sino también combinaciones más complejas. para una estimación completa de los efectos de los contaminantes concurrentes.

Por su parte, la AChE, que es una enzima fundamental para el sistema nervioso función de vertebrados e invertebrados (Tripathi & Srivastava, 2008), es otro biomarcador útil utilizado en estudios ecotoxicológicos en larvas de anfibios (Peltzer *et al.*, 2024). Varios estudios han indicado que la AChE es sensible a complejos mezclas de contaminantes incluyendo antibióticos y pesticidas (Guilhermino *et al.*, 2000; Tu *et al.*, 2009). En el segundo escenario, ni el tratamiento individual de HBGLI ni el de CIP afectaron los niveles de actividad normal de la AChE; en contraste, el tratamiento mezcla de ambos (HBGLI+CIP) redujeron significativamente la actividad de la enzima. Sin embargo, en estudios previos de nuestro laboratorio, se registró que la exposición de larvas de *R. arenarum* a HBGLI (Roundup Ultra-Max®) (1.85 y 3.75 mg L<sup>-1</sup>) durante 48 hs inhibió la actividad de AChE (Lajmanovich *et al.*,



2011) y que la exposición crónica a HBGLI 1,25 mg L<sup>-1</sup> durante 22 días no alteró las actividades normales de AChE (Lajmanovich *et al.*, 2019). Dionisio *et al.* (2020) han encontrado que la exposición de CIP a largo plazo (21 días) a una concentración ecológicamente relevante (62.5 mg L<sup>-1</sup>) provocó un aumento de la actividad de AChE en la pulga de agua *Daphnia magna*. Es posible que la exposición crónica a las mezclas de HBGLI+ CIP induzca efectos aditivos o sinérgicos que inhiban la actividad de la AChE. Aunque en algunas exposiciones crónicas a plaguicidas de uso común en la agricultura los efectos sinérgicos desaparecen, son reemplazados por otros factores estresantes como más depredación, menos alimentación y más patógenos (Gottardi *et al.*, 2017). Por ejemplo, Tu *et al.* (2009) informaron la inhibición de la actividad de AChE en el camarón *Penaeus monodon* ante la exposición combinada a pesticidas y antibióticos, sugiriendo que tal efecto afectaría indirectamente a la salud de los individuos. Como resultado de la segunda etapa del Bioensayo II también se ha observado que la mezcla de HBGLI y CP ha inhibido drásticamente la actividad de la AChE. Al respecto, Mie *et al.* (2018) han anticipado que el CP tiene un fuerte efecto anticolinesterasa. En otras investigaciones ecotoxicológicas en larvas de *R. arenarum* también se reportó que la que la exposición a CP 125 mg L<sup>-1</sup> condujo a una inhibición del 42-78% de las actividades de AChE (Attademo *et al.*, 2017). Barreto *et al.* (2020) informaron hallazgos similares para larvas de *Boana pulchella* exposición aguda a concentraciones ambientalmente relevantes de CP, con disminución significativa de AChE en larvas expuestas a 0,1 mg/ LCP (21%) y 0,5 mg L<sup>-1</sup> CP (21%).

Curiosamente, en nuestro estudio, la combinación de CIP + AMX también provocó la inhibición de la actividad de la AChE. Hasta donde sabemos, no existen informes ecotoxicológicos de los efectos de neurotoxicidad de las mezclas de antibióticos en la fauna acuática. Sin embargo, los estudios clínicos en humanos han señalado efectos neurotóxicos asociado con varias combinaciones de antibióticos y sugirió que el mecanismo de bloqueo neuromuscular podría estar relacionado con inhibición de la acetilcolina en la unión presináptica neuromuscular (Grill & Maganti, 2011).

El análisis de ambos biomarcadores enzimáticos en los distintos tratamientos individuales y mezclas ha revelado la acción sinérgica de los contaminantes evaluados, ya que para ninguna de las dos enzimas se obtuvo efecto en los tratamientos individuales, pero una notoria respuesta significativa en las mezclas binarias y cuaternaria para la AChE, y solo cuaternaria para la GST.

#### 4.2.2. Análisis histológico

En el tratamiento con HBGLI se observaron alteraciones a nivel cardíaco, tanto en la estructura de las trabéculas como de las capas musculares que limitan las aurículas con el ventrículo, siendo mucho más delgadas que en el control. En concordancia, Flach *et al.* (2022) describieron anomalías cardíacas similares en el corazón de larvas de *X. laevis* expuestas a HBGLI, incluyendo disminución de la aurícula a nivel histológico, y reducción de la frecuencia cardíaca. Resultados similares también han sido mencionados para embriones de pez cebra tratados con HBGLI (Roy *et al.*, 2016). Se sugiere que la disminución de la frecuencia cardíaca se atribuye a la destrucción de la pared del corazón y la consiguiente disminución de la acción de bombeo (Yusoff *et al.*, 2014). Aún resulta incierto si las alteraciones estructurales a nivel cardíaco, incluyendo atrofia de las paredes auriculares y de las trabéculas ventriculares, podrían deberse a consecuencias de alteraciones durante el desarrollo del órgano por la disrupción endócrina que podría estar generando el HBGLI, capaz de interferir con los procesos normales de desarrollo incluidas malformaciones cardíacas y frecuencia cardíaca reducida (Cengiz *et al.*, 2017). En contraste, estas alteraciones también podrían estar asociadas al aumento inducido por HBGLI en la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa presente en el corazón (Jiraungkoorskul *et al.*, 2003). Otros estudios reportan que la exposición al HBGLI conlleva a la disminución de marcadores cardíacos como *isl1*, *nkx2.5*, *mhca*, y *actc1*, cuya expresión regula la producción de miocitos, y por ende, su reducción conduce al desarrollo de corazones menos desarrollados, más pequeños y con menor ritmo cardíaco (Brade *et al.*, 2007). Si bien el estudio a nivel histológico resulta de gran importancia para analizar detalladamente los efectos de los contaminantes en órganos específicos, sería bueno profundizar e integrar esta respuesta a nivel fisiológico a través del uso de otros tipos de biomarcadores que complementen la información y permitan dilucidar las consecuencias de estas alteraciones estructurales en el organismo.

Por su parte, en el tratamiento HBGLI+CIP se observaron alteraciones de los túbulos nefríticos, incluyendo engrosamiento de las paredes de los túbulos y presencia de MM. Es así que se ha demostrado que el GLI y su producto comercial pueden inducir daño hepático y renal a través de mecanismos de estrés oxidativo (Mesnage *et al.*, 2015). En este tratamiento también se registró una disposición anormal de la sustancia gris y blanca (núcleos y fibras neuronales, respectivamente) en el telencéfalo. En un estudio específico a nivel encefálico, se ha sugerido que las pequeñas modificaciones estructurales de las células neuronales podrían reflejar alteraciones moderadas de la fisiología de las células gliales que pueden provocar ligeros deterioros en el procesamiento de la información. (Calas *et al.*, 2008).

#### 4.2.3. Análisis morfológico

La ocurrencia de altos porcentajes de diferentes tipos de anomalías morfológicas en las larvas de todos los tratamientos (tanto de HBGLI y CIP individuales como en la mezcla HBGLI+CIP) sugieren un claro efecto teratogénico en el primer escenario de contaminación. Estudios previos han demostrado que las anormalidades en los anfibios de ecosistemas acuáticos contaminados con pesticidas, metales pesados, compuestos de fósforo y nitrógeno, y otros contaminantes de aguas residuales (Egea-Serrano *et al.*, 2012) excedieron la tasa esperada (0-2%) de anomalías en las poblaciones de ranas de sitios no contaminados (Johnson *et al.*, 2001). Previamente se han reportado los efectos teratogénicos de concentraciones subletales de HBGLI en larvas de anfibios (deformidades bucales y craneofaciales, colas con alteraciones respecto al eje dorsoventral o lateral, y anomalías oculares; Lajmanovich *et al.*, 2003) y sobre la morfometría geométrica cambios en larvas de *R. arenarum* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de CIP (Peltzer *et al.*, 2017). Las anomalías más observadas con frecuencia en larvas en desarrollo temprano expuestos a HBGLI, CIP y su mezcla incluyen organización visceral anormal, así como hipotrofia y patrones asimétricos del intestino, especialmente en aquellos expuestos a HBGLI+CIP. Según Vandenberg *et al.* (2012), estos tipos de anomalías podrían considerarse como una condición de heterotaxia, definida como la posición anormal de la vesícula biliar, corazón y/o tracto intestinal durante el desarrollo de los anfibios. Los embriones de anfibios en desarrollo se someten a cambios morfológicos complejos que pueden verse afectados negativamente por la exposición a varios tipos de contaminantes capaces de intervenir o alterar distintos mecanismos relacionados a procesos morfogénicos, como en las cascadas y señalización, regulación de la transcripción y transducción, entre otros (Venturino *et al.*, 2003). Como se ha mencionado en la sección correspondiente al ensayo con herbicidas, se conoce que la exposición de embriones de anfibios a un HBGLI aumenta la actividad de los retinoides endógenos e inhibe la expresión de genes implicados en múltiples procesos de desarrollo (por ejemplo, asimetría izquierda-derecha, notocorda, mesodermo precordial y patrón dorsal-ventral del tubo neural; Paganelli *et al.*, 2010). Del mismo modo, Bolis *et al.* (2020) han informado que los anfibios expuestos a 7,6 mg L<sup>-1</sup> HBGLI muestran alteraciones en la lateralización corporal durante las primeras etapas de desarrollo, mientras que Herek *et al.* (2020) encontraron que larvas de *Physalaemus cuvieri* y *P. gracilis* expuestos a 1000 mg L<sup>-1</sup> de HBGLI durante 14 días mostraron alteraciones en la configuración general corporal y boca, y edema intestinal.

Por otro lado, una investigación sobre la toxicología de diversos antibióticos en organismos acuáticos ha sugerido que las bajas concentraciones de fármacos como la CIP tienen efectos teratogénicos sistémicos (por ejemplo, edema pericárdico, longitud corporal reducida y

otras anomalías) en las larvas de *Xenopus tropicalis* (Liu *et al.*, 2018). Además, Siddiqui & Naqvi (2010) informaron que CIP tiene potencial embriotóxico y teratogénico para los vertebrados, y Pérez-Alvarez *et al.* (2018) demostraron que los compuestos farmacéuticos son teratogénicos y representan un riesgo tóxico para las larvas de anfibios. En este sentido, las anormalidades morfológicas y otros efectos causados por la exposición a HBGLI y CIP observada en este estudio es notablemente similar.

Después de dos semanas de exposición de *R. arenarum* a HBGLI y al antibiótico CIP (primer escenario) se observó una reducción significativa en la tasa de desarrollo, coincidente con la ya reportada disminución en los niveles de T4 durante el desarrollo temprano de las larvas. Varios autores han demostrado que los HBGLI afectan el desarrollo de los anfibios a través del retardo del crecimiento en los estadios larvales (e.g. Cauble & Wagner, 2005; Navarro-Martín *et al.*, 2014). Aunque numerosos estudios en larvas de *R. arenarum* han reportado un vínculo entre un retraso en el desarrollo y el tamaño más pequeño de los embriones cuando se exponen a diferentes contaminantes (Svartz *et al.*, 2012; Yslas *et al.*, 2012; Hutler Wolkowicz *et al.*, 2013), esta relación no se observó en el presente estudio. Esto puede deberse al hecho de que los principales procesos que ocurren en el desarrollo temprano incluyen principalmente cambios internos como la diferenciación de las capas embrionarias y la organogénesis. En este sentido, para definir los efectos de los contaminantes en las etapas más tempranas del desarrollo, podría ser mejor considerar puntos finales relacionados con la organización corporal que los puntos finales relacionados con el tamaño del cuerpo como longitud.

#### 4.2.4. Análisis bacteriológico

En este ensayo, se demostró que la exposición a HBGLI y CIP, tanto individualmente como en mezcla, alteraron parte de las comunidades de bacterias de la microbiota bacteriana intestinal de larvas de *Rhinella arenarum* (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2023). Al igual que para el bioensayo I de mezcla de herbicidas, la mayoría de las bacterias entéricas que se han identificado en este bioensayo, pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, aunque también han aparecido géneros como *Aeromonas spp.* y *Pseudomonas spp.* Las diferencias encontradas para la misma especie en la composición normal de la microbiota bacteriana en ambos bioensayos pueden deberse a diversos factores como la variación intraespecífica, la etapa del desarrollo en la que se han analizado, incluso el momento en el que los ensayos han sido llevados a cabo, entre otros (Brunetti *et al.*, 2023).

Los géneros bacterianos encontrados en las comunidades microbianas de las larvas control coincidieron con los descritos en trabajos pioneros en la misma especie y otros que

utilizaron la misma metodología de cultivo (Hird *et al.*, 1983; Lajmanovich *et al.*, 2001). Martinson *et al.* (2019) también informaron sobre *E. coli*, el taxón más frecuente identificado en el grupo de control en su evaluación basada en cultivos como las enterobacterias más dominantes en heces humanas sanas

Por su parte, las bacterias entéricas aisladas de las larvas tratadas con HBGLI fueron diferentes de las encontradas en las larvas control. En las larvas tratadas con HBGLI, los índices de riqueza de géneros aumentaron considerablemente y los taxones dominantes (por ejemplo, *E. coli*) disminuyeron. Se ha informado que los HBGLI alteran la microbiota intestinal de diversos organismos como las pulgas de agua, abejas, cangrejos, tortugas e incluso anfibios (Madison *et al.*, 2018; Blot *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019; Suppa *et al.*, 2020; Villatoro-Castañeda *et al.*, 2023). Los HBGLI también han demostrado alterar la diversidad de los microorganismos del suelo favoreciendo la presencia de ciertas especies que se desempeñan de manera menos eficiente en condiciones normales (Imparato *et al.*, 2016). En general, se coincide en que la diversidad está dada por la variación de las condiciones ambientales y la disponibilidad de nutrientes (Goldfarb *et al.*, 2011). Algunas bacterias Gram (+) y Gram (-) utilizan GLI como fuente de carbono, nitrógeno y fósforo (Van Eerd *et al.*, 2003). En este sentido, la disbiosis observada en las bacterias entéricas presentes en las muestras tratadas con HBGLI dada por un aumento en la diversidad y uniformidad de los taxones podría estar relacionada con el hecho de que GLI influye positivamente en el crecimiento bacteriano. Las alteraciones que puedan ocurrir en el lumen intestinal de los organismos huésped debidas a xenobióticos como GLI también podrían contribuir a un cambio en la composición de la microbiota.

Otra explicación para el cambio en la composición de las bacterias entéricas en las muestras tratadas con HBGLI puede estar relacionada con la capacidad de algunas bacterias para transformar GLI (Sviridov *et al.*, 2015). Algunas bacterias transforman GLI en ácido aminometilfosfónico (AMPA) mediante la enzima GLI oxidoreductasa y utilizan este metabolito o GLI para obtener fosfato para su metabolismo mediante la descomposición del enlace C-P (Imparato *et al.*, 2016). Por lo tanto, se ha sugerido que la aplicación de HBGLI puede inducir una selección artificial que estimula las bacterias capaces de degradar el herbicida (Villareal-Chiu *et al.*, 2017). De acuerdo con esto, algunos de los taxones que se observaron aquí aumentaron en el tratamiento con HBGLI, como *Enterobacter spp.* y *Providencia spp.*, utilizan GLI como sustrato o tienen rasgos asociados con la degradación de GLI (Nourouzi *et al.*, 2011). Desde un punto de vista ecológico, la disminución de algunas especies bacterianas podría dejar nichos ecológicos disponibles para otras (Blot *et al.*, 2019). Un estudio demostró una reducción de las bacterias beneficiosas en el microbioma del tracto gastrointestinal de aves

de corral ante la exposición a HBGLI, mientras que se encontró que las bacterias altamente patógenas eran resistentes (Shehata *et al.*, 2013). Por tanto, podrían inducir disbiosis patógena en el microbioma intestinal de las gallinas. Sin embargo, se necesitan más estudios para obtener más información sobre los efectos de diferentes taxones de bacterias entéricas.

Por otro lado, los estudios existentes sobre los efectos de los antibióticos sobre la microbiota intestinal se centran mayoritariamente en la salud humana y alertan sobre las consecuencias de los tratamientos prolongados y la pérdida permanente de determinados taxones fundamentales para el mantenimiento de un intestino sano (Pop *et al.*, 2016). Sin embargo, es fundamental ahondar también en los posibles efectos de los residuos de medicamentos en las comunidades bacterianas de organismos no objetivo frecuentemente expuestos a estos residuos en los cuerpos de agua (Peltzer *et al.*, 2017). En este estudio, el tratamiento CIP indujo disbiosis en bacterias entéricas mediante la reducción de la diversidad de taxones y el aumento de la dominancia de un solo género. *Aeromonas spp.* representó más del 50% de la abundancia relativa de taxones en bacterias entéricas de larvas tratadas con CIP, lo que sugiere su tolerancia al antibiótico. Este resultado es consistente con los de otros estudios que informaron resistencia a múltiples fármacos (incluido CIP) de *Aeromonas spp.* de animales salvajes (Dias *et al.*, 2018).

La presencia de disbiosis en muestras tratadas con CIP puede implicar graves consecuencias tanto para la vida silvestre como para los humanos, ya que algunas especies del género *Aeromonas spp.* (por ejemplo, *A. veronii* y *A. hydrophila*) identificados en este estudio se han asociado con varias enfermedades en humanos y peces (Janda & Abbott, 2010). Skwor *et al.* (2014) advirtieron sobre el riesgo de aparición de *Aeromonas spp.* resistentes en el ambiente y en los organismos, debido al uso excesivo de antibióticos. Además, *Leclercia spp.* fue otro taxón que sugirió la presencia de disbiosis en muestras tratadas con CIP, ya que no fue aislada en larvas control o tratadas con HBGLI. Yehia (2013) informó la resistencia de cepas de *Leclercia spp.* aisladas del tracto intestinal de aves de corral a múltiples antibióticos (incluido el CIP), y un consecuente aumento los riesgos para la salud del uso inadecuado de un amplio espectro de antibióticos con diferentes usos.

En el presente estudio, los índices de riqueza y diversidad obtenidos para las bacterias entéricas aisladas de las larvas tratadas con HBGLI+CIP fueron similares a los del control, pero la composición de los taxones fue diferente. Algunos géneros presentes en las muestras de control, como *Klebsiella spp.* y *Pseudomonas spp.*, disminuyeron o estuvieron ausentes en las muestras tratadas con HBGLI+CIP. Además, algunas de las tendencias observadas para tratamientos de contaminantes individuales también se observaron en las muestras tratadas con HBGLI+CIP: un aumento en *Enterobacter spp.* y la presencia de *Proteus spp.* (como en el

tratamiento HBGLI), y un aumento en *Aeromonas* spp. y la presencia de *Leclercia* spp. (como en el tratamiento CIP). Está más que claro que la interacción de ambos contaminantes influye en la estructura de la comunidad bacteriana entérica. Aunque los resultados del presente estudio son preliminares y se limitan a una pequeña porción de todo el microbioma entérico, confirman la susceptibilidad de al menos una parte de las bacterias entéricas de un organismo modelo autóctono a diferentes tipos de contaminantes, tanto individualmente como en mezcla. Esto último es particularmente importante porque es probable que los contaminantes estudiados se encuentren juntos en el medio ambiente. (Ramakrishnan *et al.*, 2011). Posterior a este primer informe preliminar sobre la disrupción de parte de las bacterias entéricas de un organismo modelo no convencional por una mezcla de un antibiótico y un herbicida, Villatoro-Castañeda *et al.* (2023) analizaron el efecto individual y combinado de HBGLI y un cóctel antibióticos en larvas de *Rana berlandieri*, y también han encontrado cambios significativos en comunidad microbiana intestinal en los tratamientos con el herbicida, los antibióticos y la mezcla de ambos tipos de contaminantes. Aún más, aseguraron que las larvas de los tratamientos del cóctel de antibióticos y mezcla con HBGLI mostraron menor actividad y grado de desarrollo, sugiriendo que la alteración de la microbiota bacteriana tendría impacto en el fenotipo y la aptitud del huésped a través de un comportamiento y crecimiento alterados.

Además de las alteraciones en la composición de las comunidades bacterianas de la microbiota intestinal observadas ante la exposición a HBGLI y CIP, también se registraron cambios en la sensibilidad de las bacterias a los contaminantes. De hecho, algunos autores han sugerido que los cambios en la diversidad bacteriana de la microbiota intestinal de organismos expuestos a HBGLI podrían estar asociados a la posible adquisición de resistencia genética al HBGLI (Shehata *et al.*, 2013; Fréville *et al.*, 2022). En este estudio, se los valores obtenidos para la CIM de HBGLI en general estuvieron por debajo de los 50 mg L<sup>-1</sup> en la mayoría de las cepas aisladas de larvas CO, mientras que las cepas de larvas del tratamiento con HBGLI oscilaron en el rango de los 20 a 100 mg L<sup>-1</sup>. Aunque los valores obtenidos variaron entre las especies analizadas, las diferencias entre las especies analizadas no fueron significativas. En contraste, van Bruggen *et al.* (2021) han sugerido que las bacterias patógenas, como *E. coli*, *Salmonella enterica* y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, mostraron un mayor nivel de resistencia en comparación con las bacterias comensales asociadas al huésped. Un estudio que examinó las concentraciones inhibitoras mínimas (MIC) de GLI (solución de sal de monoisopropilamina al 40 % de GLI y Roundup<sup>TM</sup> LB Plus) para bacterias patógenas y comensales, reportó que las cepas patógenas tenían una CIM significativamente mayor (20–80 mg mL<sup>-1</sup>) que las cepas comensales (5–10 mg mL<sup>-1</sup>; Bote *et al.*, 2019). Resultaría fundamental ahondar en esta. Esto favorecería potencialmente la selección de bacterias

patógenas el microbioma intestinal, como se ha mencionado anteriormente (Shehata *et al.*, 2013).

En cuanto a los mecanismos de resistencia bacteriana al GLI, resulta imprescindible comprender el mecanismo de acción del herbicida. El GLI inactiva la enzima central 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una enzima casi universal en plantas, hongos y procariotas, para la síntesis de tres aminoácidos aromáticos (Healy-Fried *et al.*, 2007). Algunas especies han desarrollado una variedad de mecanismos de resistencia por efecto directo del GLI sobre la enzima EPSPS, o bien indirectamente mediante bombas de eflujo y la sobreexpresión del gen que codifica la enzima (Gaines *et al.*, 2020; Leino *et al.*, 2020). Alternativamente, se ha reportado a través de un estudio informático, que una gran proporción de las bacterias intestinales tienen la vía shikímica transcripcionalmente inactiva y, por lo tanto, estas bacterias son auxótrofas de aminoácidos aromáticos (Mesnage & Antoniou, 2020). Probablemente esto se debe a la capacidad de las bacterias intestinales para adquirir estos aminoácidos aromáticos de la dieta, y por consiguiente, la acción del GLI sobre la enzima que los produce no condicionaría su viabilidad (Walsh *et al.*, 2023). Otras bacterias han demostrado la capacidad de producir enzimas que pueden descomponer el GLI y posteriormente utilizar los productos de degradación del GLI (como el fosfato) como nutriente, como ciertas cepas de *Pseudomonas* spp., género que mostró aumento de CIM en este estudio (Puigbò *et al.*, 2022). Los diversos mecanismos a través de los cuales las bacterias de la microbiota bacteriana intestinal son capaces de resistir a la presencia de GLI ameritan mayor profundización para una mejor comprensión de sus efectos no sólo en los microorganismos en sí, sino también en sus hospedadores y las consecuencias indirectas a las que podría conllevar.

En un estudio reciente, Zhang *et al.* (2024) estudiaron la relación del GLI con la resistencia a antibióticos, y encontraron que el GLI aumentó el riesgo para la salud de resistencia a los antibióticos en la microbiota intestinal al afectar la abundancia relativa de elementos genéticos móviles y de los taxones patógenos intestinales. Por lo tanto, la coexistencia del herbicida y antibióticos como CIP resultan un potencial riesgo sinérgico para la salud de los organismos y el ecosistema. Los entornos que albergan comunidades microbianas pueden servir como puntos críticos de enriquecimiento e intercambio de genes de resistencia (Pehrsson *et al.*, 2016). Entre dichos focos, se encuentran los feedlots y sitios de cría intensiva de ganado donde se administran antibióticos de forma rutinaria para promover el crecimiento y prevenir enfermedades, proporcionando una presión de selección ideal para el enriquecimiento de bacterias resistentes a los antibióticos y genes de resistencia a los antibióticos (Sun *et al.*, 2020). En este estudio se ha comprobado que la exposición de organismos como los anfibios, a antibióticos como CIP, ha resultado en la resistencia al



antibiótico por algunas cepas de la microbiota bacteriana intestinal. Específicamente, el análisis de la CIM de CIP mostró un aumento de cepas clasificadas como con sensibilidad intermedia y resistente en larvas del tratamiento CIP. Las cepas intermedias incluyeron a *E. coli*, *Aeromonas* spp. y *Enterobacter* spp., mientras que las dos cepas varias especies bacterianas, incluida *E. coli*. (Brisse *et al.*, 2000; Fu *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014;). resistentes fueron identificadas como *Leclercia* spp.

Existe un creciente aumento de casos en los que se ha informado resistencia al fármaco en Los mecanismos de adquisición de resistencia en estas bacterias estarían asociados a la alteración de L genes *qnr* codifican proteínas que protegen la ADN girasa y la topoisomerasa IV de la inhibición por las quinolonas (Weigel *et al.*, 1998; Tran *et al.*, 2005). Además, *E. coli* es reconocida como una especie colonizadoras que poseen una pronunciada capacidad de adquisición y diseminación de genes de resistencia (Levy *et al.*, 1988). En este sentido, el porcentaje de cepas intermedias correspondiente a esta especie podría representar un potencial riesgo para la adquisición de resistencia en larvas que estén constantemente expuestas a CPE como los antibióticos. Además, la resistencia a CIP observada en este estudio para el género *Leclercia* spp. es coincidente con estudios previos que describen la multiresistencia de especies de este género a fluoroquinolonas, y también específicamente a CIP (Akinbami *et al.*, 2018; Makanera *et al.*, 2018).

El hallazgo de especies resistentes o con potencial para su adquisición resulta importante no por la capacidad de adquisición en sí, sino también por las consecuencias que ello podría implicar en la salud. Además de componer las comunidades bacterianas, muchas de las bacterias con potencial de resistencia al antibiótico pueden ser patógenas para los organismos incluido el hombre, por fuera de su proporción y función normal de la microbiota bacteriana intestinal. El hecho de que los patógenos generen resistencia a los medicamentos que se aplican para combatirlos tiene implicancias tanto para la medicina como para el ambiente, ya que radica en una aplicación cada vez mayor de antibióticos para combatir las enfermedades. Esta retroalimentación positiva entre la adquisición de resistencia y la aplicación de antibióticos representa una clara amenaza para el ambiente por el incremento de los CPE de se introducen al ambiente.

#### 4.3. Integración y vinculación de los resultados

##### 4.3.1. Análisis integral de tratamientos y biomarcadores

Si bien los distintos tipos de biomarcadores mostraron sensibilidad diferencial a los contaminantes en estudio, el IBR representado por el área total del polígono obtenido para cada tratamiento, fue mayor para el tratamiento HBGLI (IBR=7,31) respecto a HBGA y HBGLI+HBGA (IBR= 4,56 y 1,38, respectivamente).

Algunos biomarcadores bioquímicos como la hormona tiroidea y la GST mostraron mayor sensibilidad al HBGA. En el caso de la T4, la mezcla HBGLI+HBGA disminuyó ligeramente el efecto observado en el tratamiento individual de HBGA, sugiriendo que la interacción de ambos compuestos altera los procesos en los que intervienen la hormona y afecta su adecuada respuesta (Lajmanovich *et al.*, 2022). Por su parte, los niveles de actividad de la GST mostraron una respuesta potenciadora en la mezcla, ya que la disminución fue aún más marcada que en los tratamientos individuales, sugiriendo que ambos herbicidas podrían tener algún tipo de interacción.

El tratamiento HBGLI mostró una marcada respuesta en los distintos niveles de organización analizados, biomarcadores bioquímicos (AChE y GST), como así también a nivel organismo (estadios de desarrollo) y de comunidad bacteriana intestinal (diversidad de géneros bacterianos). Por su parte, el tratamiento HBGA también mostró importantes efectos sobre biomarcadores a de los mismos niveles organismos y comunidad, aunque diferentes a HBGLI (malformaciones y dominancia bacteriana, respectivamente). El tratamiento HBGLI+HBGA también afectó a biomarcadores de los niveles antes mencionados (específicamente al estadio de desarrollo y dominancia bacteriana), pero se diferenció del resto de los tratamientos por una marcada respuesta a nivel histológico sobre el tamaño de los MM.

La mezcla HBGLI+HBGA tuvo una respuesta antagónica en la mayoría de los biomarcadores evaluados, mientras que solo la respuesta hormonal mostró aditividad y potenciación de GST. La diversidad de efectos combinados de los contaminantes sobre los anfibios ha sido bien explicada desde diferentes aspectos bioecológicos. Algunos autores concluyen que el efecto combinado depende de la concentración a la que se estudien los contaminantes, produciendo antagonismo a bajas concentraciones y sinergia a mayores concentraciones (Junz & Fent, 2009; Ma *et al.*, 2016). Otros autores consideran la proporción de cada compuesto en la mezcla ya que informaron el efecto sinérgico de la mezcla no equitóxica a diferencia de la mezcla equitóxica (Peluso *et al.*, 2022). Otros autores también evaluaron los cambios en la interacción de la mezcla a diferentes tiempos de exposición, y encontraron antagonismo en exposiciones agudas y sinergia en exposiciones crónicas a mezclas de xenobióticos (Svartz *et al.*, 2012). Además, los biomarcadores se encuentran distribuidos en diferentes lugares de los organismos, lo que aumenta la complejidad del sistema al evaluar mecanismos biológicos sobre sitios activos y comportamientos. Además, Ruiz de Arcaute *et al.*

(2020) también informaron sobre la toxicidad de mezclas de herbicidas en *R. arenarum* que varían de aditivo a antagonista al evaluar la interacción de GLI-dicamba y GLI-fluorocloridona. Estos autores también destacaron las consideraciones de excipientes desconocidos en formulaciones comerciales adicionales a los ingredientes activos en bioensayos de mezcla para tener una conclusión realista.

Coalova *et al.* (2014) propusieron que la toxicidad de los coadyuvantes se suma a la toxicidad del ingrediente activo y que por lo tanto, estas sustancias juegan un papel importante en el efecto que las formulaciones comerciales de plaguicidas puedan tener sobre los organismos. Es importante señalar que el hecho de que los biomarcadores aquí estudiados muestren un efecto no aditivo revela la alta dificultad para asignar una toxicidad esperada, que puede ser diferente en la diversidad de matrices ambientales que aumentan el riesgo de sus aplicaciones.

En general, el análisis de biomarcadores de diferentes niveles de organización proporciona información precisa sobre diferentes aspectos del desarrollo larval, lo que puede permitir una mejor comprensión de los efectos subletales de estos factores estresantes en la disminución de las poblaciones de anfibios (Venturino *et al.*, 2003; Pérez Iglesias, 2018) y la precisión de las evaluaciones de riesgos ambientales (ERA). Varios artículos de revisión que han analizado la ERA para HBGLI y HBGA en ambientes acuáticos en función de criterios de valoración de mortalidad (por ejemplo, Solomon & Thompson, 2003; Giddings *et al.*, 2014; Geng *et al.*, 2021; Babalola *et al.*, 2021) han minimizado el riesgo de estos pesticidas para los anfibios. Sin embargo, debido a su fisiología única y su dependencia del medio acuático durante el desarrollo temprano o durante más tiempo para algunas especies, y al hecho de que el momento de la reproducción ocurre simultáneamente con las aplicaciones de pesticidas y que su distribución coincide ampliamente con los cultivos transgénicos, los anfibios son altamente sensible a la exposición ambiental a ambos herbicidas como lo sugiere Lajmanovich *et al.* (2010). Los efectos subletales merecen una consideración fundamental en las evaluaciones de riesgo ambiental de pesticidas y otros contaminantes, pero también destacamos que es necesario tener en cuenta la evaluación del efecto conjunto de las mezclas de contaminantes. Como se muestra en este y en estudios anteriores (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2021; Lajmanovich *et al.*, 2022), los efectos de los contaminantes individuales pueden diferir en mezclas complejas, que es la forma más probable en la que se encuentran en entornos reales.

#### 4.3.2. Interacción en las mezclas

Las sustancias contaminantes pueden interactuar a nivel físicoquímico o fisiológico, lo que resulta en efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos (Sørensen *et al.*, 2007). La interacción (interacción de mezcla o interacción tóxica) se utiliza para denotar el fenómeno de cualquier desviación del supuesto de no interacción o aditividad para combinaciones de sustancias químicas. Si bien el término de interacción es de índole meramente descriptiva y no tiene implicancias sobre la naturaleza de los mecanismos subyacentes, su caracterización resulta útil para predecir el riesgo de las mezclas ante diferentes condiciones o variables (Hertzberg & MacDonell, 2002). Al respecto, resulta imprescindible resaltar que los efectos observados en cada caso y cada estudio dependen de múltiples factores, entre los que se encuentran también la concentración y el tipo de compuesto utilizado. En este sentido, es de esperar que haya cambios en los efectos tanto individuales como el de las mezclas al aumentar la concentración de los componentes (Pomati *et al.*, 2008). Es fundamental, además, considerar el efecto de los aditivos o coadyudantes además de los ingredientes activos de los formulados comerciales que aportan enorme variabilidad a las respuestas, dado que estos componentes son adicionados a mejorar la actividad, estabilidad u otras propiedades del principio activo y no sólo podrían interactuar con el sino también con otros compuestos en las mezclas de varios productos (Niedobová *et al.*, 2019).

Como se ha mencionado anteriormente, si bien las interacciones en mezclas están condicionada a varios factores, la caracterización del tipo de interacción en las mezclas de este estudio permite comparar la respuesta de un contaminante como el HBGLI en presencia de otros compuestos factibles con los que se encuentre en el ambiente, como CIP o HBGA, a concentraciones ambientalmente relevantes. Si bien en los bioensayos los efectos fueron evaluados ante la exposición a una única concentración de cada compuesto, y ante un formulado específico de cada tipo de pesticida, resultan escenarios factibles para los ambientes que habitan los anfibios (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2021; 2022). Se sabe que los pesticidas, al igual que los fármacos, pueden interactuar entre sí de distintas maneras según la composición química, las concentraciones y sitios de acción, y pueden conllevar a diversos efectos diferentes a los individuales (Hernández *et al.*, 2017). En menor medida, también se ha descrito la posibilidad de interacción entre pesticidas y fármacos por distintos mecanismos (Abass & Pelkonen, 2013). Por ejemplo, se ha informado que los pesticidas pueden funcionar como sustratos para los transportadores de fármacos, y así contribuir a su toxicocinética y consecuentemente, alterar su toxicidad (Chedik *et al.*, 2018). Los pesticidas también han sido reportados como inhibidores de enzimas que catalizan fármacos y pesticidas (Carrão *et al.*, 2019).

Las interpretaciones de las interacciones entre componentes de las mezclas pueden abordarse desde su comparación con los efectos individuales de cada compuesto. En este

sentido, se definen las interacciones toxicológicas sinérgicas/antagonistas como aquellas que denotan desviaciones de los efectos de la mezcla predichos bajo el supuesto de que los componentes de la mezcla producen toxicidad sin interactuar entre sí, el supuesto de no interacción o aditividad (Martin *et al.*, 2021). En esta situación, la sinergia o potenciación tiene el significado específico de "más que aditivo" y el antagonismo de "menos que aditivo". Cuando sólo un componente de una mezcla binaria es eficaz, la no interacción o aditividad hace referencia a que la toxicidad de la mezcla no es mayor que la del componente individual por sí solo (Rustom *et al.*, 2019). En esta situación, sinergia es sinónimo de potenciación y tiene el significado específico de un mayor efecto provocado por el segundo agente, mientras que la falta de influencia suele denominarse "inertismo". Una definición análoga se aplica al antagonismo.

Los términos potenciación, potenciación del efecto, potenciación tóxica o modulación del efecto positivo se utilizan para combinaciones en las que una o varias sustancias químicas exacerbaban los efectos tóxicos de otras sustancias, pero sin producir ese efecto por sí solas (Cedergreen, 2014). En el caso de combinaciones binarias, donde sólo un componente es activo y la mezcla es más tóxica que el producto químico activo, los términos potenciación, mejora del efecto, mejora tóxica y modulación del efecto positivo se utilizan como sinónimos de sinergismo.

### *Interacciones entre herbicidas*

Las interacciones entre herbicidas son ampliamente estudiadas para comprender el efecto fitotóxico que pueden generar la combinación de compuestos en los organismos blanco a los que están destinados. Así, los efectos aditivos en mezclas de dos o más herbicidas ocurren cuando la fitotoxicidad observada en el objetivo biológico después de la aplicación del herbicida no es diferente de la fitotoxicidad esperada de los herbicidas aplicados por sí solos (Sørensen *et al.*, 2007; Rustom *et al.*, 2019). Sin embargo, en algunas situaciones, la interacción entre herbicidas produce cambios significativos en las respuestas de control de malezas, disminuyendo o aumentando la efectividad. El antagonismo es una interacción indeseable en términos de control de malezas, ya que el control observado es menor en comparación con el control esperado de los herbicidas aplicados solos y, en la mayoría de los casos, se necesitan dosis más altas de herbicidas para niveles satisfactorios de control (Zhang *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 2021). En este sentido, las interacciones entre GLI y GA son de especial interés ya que son compuestos aplicados conjuntamente en cultivos con resistencia a ambos herbicidas (Kudsk & Mathiassen, 2004; Chuah *et al.* 2008). Entre los estudios que evalúan el efecto combinado en los organismos blanco, se ha reportado variación en las interacciones, pero principalmente antagonismo entre estos dos herbicidas en especies vegetales como el pasto *Eleusine indica*, y la cola de zorro gigante, *Setaria faberi* (Chuah *et al.* 2008; Wehtje *et al.* 2008). El antagonismo en estos casos se atribuye a la rápida acción del GA, que provoca que una rápida muerte celular por especies reactivas de oxígeno (Kudsk & Mathiassen, 2004; Bethke *et al.*, 2013). Esta acción temprana puede limitar las tasas de absorción y translocación de cualquier herbicida, incluido el GLI, y traducirse en un antagonismo (Takano *et al.*, 2020). Las interacciones antagonicas en el efecto fitoxótico también pueden atribuirse al aumento del metabolismo de un herbicida debido a la presencia de otro herbicida en la mezcla (Barbieri *et al.*, 2023). El metabolismo acelerado de los herbicidas en moléculas no tóxicas se considera un mecanismo de resistencia en muchas malezas (Yu & Powles, 2014).

En contraste, las interacciones de herbicidas en organismos no-blanco son mucho menos conocidas pero de gran importancia para las evaluaciones de riesgos ambientales (Chèvre *et al.*, 2006). Después de su uso, es común detectar mezclas de pesticidas pertenecientes a diferentes grupos químicos en las aguas superficiales y subterráneas y en sus sedimentos que amenacen la salud del ecosistema. De hecho, existen reportes de la existencia de estos dos herbicidas en los cuerpos de agua donde habitan peces, cangrejos y anfibios, y registros de su acumulación en los organismos acuáticos como peces, claves en la cadena alimenticia incluso humana (Yan *et al.*, 2022; Lajmanovich *et al.*, 2023).

Dado el gran número de compuestos factibles de coexistir, y sus respectivas combinaciones, el estudio de mezclas ambientales de pesticidas potencialmente relevantes resulta experimentalmente complejo. Es por ello que evaluación predictiva de riesgos ambientales de la toxicidad de las mezclas tiende a abordarse desde el llamado enfoque basado en componentes (in silico) que propone reunir los datos heterogéneos disponibles en un contexto de evaluación de riesgos para una serie de combinaciones claramente identificadas de especies de prueba y tipos de pesticidas (Coors & Frische, 2011). Aunque en la mayoría de los estudios que evalúan la toxicidad de mezclas de pesticidas las combinaciones no reflejan la complejidad total de las mezclas reales ambientalmente, la información resultante de cada uno permite contribuir acumulativamente a la estimación de los riesgos de las distintas mezclas factibles. Al respecto, es importante no sólo considerar los efectos combinados de distintos componentes, sino también los efectos combinados de los mismos componentes sobre diversos parámetros como en este estudio.

Existen diversos estudios ecotoxicológicos que comparan el efecto del GLI y el GA en distintos organismos no-blanco como ácaros, caracoles, anfibios y microbiota del suelo (Ahn *et al.*, 1997; Dinehart *et al.*, 2009; Druart *et al.*, 2011; Quinn, 2018). Sin embargo, las interacciones de la mezcla de ambos compuestos sobre el efecto tóxico han sido escasamente estudiada (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2022). En un estudio en larvas de *R. arenarum*, Lajmanovich *et al.* (2022) reportaron interacción entre HBGLI+HBGA en presencia de partículas de microplástico a las cuales los herbicidas se unen, sugiriendo un aumento de la toxicidad cuando los contaminantes están juntos. En este estudio, la mezcla HBGLI+HBGA tuvo una respuesta antagónica en los biomarcadores como la AChE, tamaño MM y el EG. El efecto antagónico de la mezcla podría estar relacionado a la respuesta más temprana del HBGA con respecto al HBGLI, como se ha detallado anteriormente (Takano *et al.*, 2020).

En contraste, la actividad de actividad de la GST y diversidad bacteriana mostró un efecto potenciado en el tratamiento HBGLI+HBGA con respecto a los efectos individuales. Al respecto, la mayor toxicidad puede deberse no sólo a los efectos tóxicos de los propios herbicidas sino también a aditivos supuestamente inertes (Lajmanovich *et al.*, 2013). Por ejemplo, en formulaciones comerciales de GLI, el surfactante de seboamina polietoxilada (POEA) ha sido reconocido como citotóxico y altera la membrana de las superficies respiratorias sensibles (Partearroya *et al.*, 1991). La relación sinérgica entre los herbicidas mezclados con el surfactante se podría deber entonces, al menos en parte, a la capacidad del surfactante para facilitar la absorción de los herbicidas en los tejidos. De ahí que esto produzca un mayor impacto toxicológico de cada herbicida (Green & Abdelghani, 2004).

Los mecanismos implicados en el efecto antagónico observado para varios de los biomarcadores estudiados podrían estar relacionados a los descriptos anteriormente para el antagonismo a nivel fitotóxico en los organismos blanco. Por su parte, la sinergia o potencia entre compuestos utilizados en la agricultura puede estar dada por distintos principios, según lo describe Jia *et al.* (2009); uno de los compuestos puede aumentar la biodisponibilidad del otro, o previene o retrasa su degradación; también puede ocurrir que ambos herbicidas actúen sobre el mismo proceso fisiológico, pero con mecanismos diferentes, o en la misma vía biosintética pero inhiben objetivos diferentes.

La diversidad de efectos combinados sobre los anfibios ha sido bien explicada desde diferentes aspectos bioecológicos. Algunos autores concluyeron que el efecto combinado depende de la concentración a la que se estudian los contaminantes, produciendo antagonismo en concentraciones bajas y sinergia en concentraciones más altas (Kunz & Fent, 2009; Ma *et al.*, 2016). Otros autores consideran la proporción de cada compuesto en la mezcla ya que estos informaron un efecto sinérgico de la mezcla no equitóxica (a distintas proporciones) a diferencia de la mezcla equitóxica (Peluso *et al.*, 2022). En otros casos, también se evaluaron los cambios en la interacción de los componentes de la mezcla en diferentes tiempos de exposición, y encontraron antagonismo en exposiciones agudas y sinergia en exposiciones crónicas a mezclas de xenobióticos (Svartz *et al.*, 2012). Además, los biomarcadores están distribuidos en diferentes lugares de los organismos, lo que aumenta la complejidad del sistema al evaluar mecanismos biológicos en sitios activos y comportamientos.

En su estudio, Ruiz de Arcaute *et al.* (2020) también informaron sobre la variación en la interacción de mezclas de herbicidas GLI-dicamba y GLI-flurocloridona en *R. arenarum*, que incluyó desde aditividad a antagonismo. Estos autores destacaron la importancia de considerar los excipientes desconocidos en formulaciones comerciales adicionales a los ingredientes activos en los bioensayos de mezclas para llegar a una conclusión realista. En este sentido, Coalova *et al.* (2014) propusieron que la toxicidad de los coadyuvantes puede ser aditiva a la toxicidad del ingrediente activo y que, por lo tanto, estas sustancias juegan un papel importante en el efecto que la formulación comercial de plaguicidas pueda tener sobre los organismos. Es importante señalar que el hecho de que los biomarcadores aquí estudiados muestren un efecto no aditivo revela la alta dificultad para asignar una toxicidad esperada, que podría ser diferente en la diversidad de las matrices ambientales.

En general, el análisis de biomarcadores de diferentes niveles de organización proporciona información precisa sobre diferentes aspectos del desarrollo larvario, lo que puede permitir una mejor comprensión de los efectos subletales de estos factores estresantes en la disminución de las poblaciones de anfibios (Van der Oost *et al.*, 2003; Peltzer *et al.*, 2017) y la



precisión de las evaluaciones de riesgos ambientales (ERA). Varias revisiones sobre ERA para HBGLI y HBGA en ambientes acuáticos han minimizado el riesgo de estos pesticidas para los anfibios en función de los criterios de valoración de mortalidad (por ejemplo, Soso *et al.*, 2007; Güngördü *et al.*, 2016; Geng *et al.*, 2021; Babalola *et al.*, 2021). Sin embargo, está más que claro que los efectos subletales merecen una consideración fundamental en las evaluaciones de riesgos ambientales de pesticidas y otros contaminantes, pero también se destaca la necesidad de evaluar efecto conjunto de las mezclas de contaminantes. Como se muestra en este y en estudios anteriores (Cuzziol Boccioni *et al.*, 2021, 2022; Lajmanovich *et al.*, 2022), los efectos de los contaminantes individuales pueden diferir en mezclas complejas, que es la forma más probable en que estos se encuentran en condiciones ambientales reales.

### *Interacciones entre herbicida y antibiótico*

Además de los pesticidas, los fármacos han demostrado ser componentes importantes en las matrices ambientales (Babić *et al.*, 2018). En los ambientes acuáticos, tanto pesticidas como antibióticos pueden formar mezclas complejas cuya toxicidad puede diferir de las toxicidades de los componentes individuales (Suk *et al.*, 2002; Pal *et al.*, 2014). Aunque el efecto conjunto de los herbicidas y antibióticos sobre organismos acuáticos es aún desconocido y son escasos, los estudios al respecto suceden con un creciente interés para comprender las interacciones entre estos contaminantes (Islam & Midya, 2023). Entre las combinaciones que se han estudiado hasta el momento, para la mayoría de los casos, se ha reportado sinergismo de mezclas de diversos fármacos y pesticidas especialmente a nivel subletal (Wang *et al.*, 2015).

En particular, la interacción entre GLI y CIP se ha estudiado a nivel fitotóxico en especies vegetales de interés agroindustrial como el maíz, en el cual se ha demostrado una mayor disminución de la actividad fotosintética y de las propiedades biomecánicas y del rendimiento de los cultivos (Gomes *et al.*, 2020). El estudio también plantea el riesgo toxicológico que la acumulación de ambos compuestos en tejidos vegetales como granos y hojas puede significar, dada su importancia como parte de la cadena alimenticia. La interacción estos compuestos también se ha evaluado en la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, en la cual se encontró que la exposición combinada de GLI y una mezcla de antibióticos incluyendo CIP tuvo efectos sinérgicos en el crecimiento de la especie; la mezcla de compuestos a concentraciones a las cuales individualmente no tuvieron efecto, indujo a la síntesis de microcistina y estimuló el crecimiento de cianobacterias a través de la regulación positiva de proteínas involucradas en la fotosíntesis, la división celular, fijación de carbono y otros de procesos metabólicos (Xu *et al.*, 2021). La relación entre GLI y CIP también se ha explorado a nivel microbiológico

indirectamente para determinar si la presencia de GLI afecta la resistencia al antibiótico CIP. Al respecto, Ospino & Spira (2023) establecieron que la presencia del herbicida induce a la producción de alomonas guanosina tetra- y pentafofato relacionadas a la persistencia y tolerancia de *E. coli* a CIP, pero no modifica la resistencia al antibiótico. Para todos los casos, resulta fundamental considerar el efecto de componentes adicionales de los formulados en las respuestas estudiadas.

En este estudio, los efectos de la mezcla de HBGLI+CIP en larvas de *R. arenarum* han mostrado variación en los tipos de interacción. La mezcla resultó aditiva para algunos biomarcadores bioquímicos como los niveles de hormona tiroidea y la actividad enzimática de la GST, así como para el crecimiento en términos de estadio de desarrollo, y para la diversidad bacteriana de la microbiota intestinal. En contraste, la interacción de la mezcla HBGLI+CIP resultó en antagonismo para los biomarcadores histológicos hepáticos, así como para la tasa de malformaciones y dominancia bacteriana. Respecto a esto último, el efecto antagónico sobre la dominancia bacteriana podría estar relacionada a la persistencia y tolerancia que genera el GLI a la CIP. Solo para AChE la mezcla HBGLI+CIP resultó en un efecto de potenciación. Estudios previos ya han reportado sinergismo de HBGLI con otros contaminantes como herbicidas (picloram y metasulfurón) e insecticidas como CP sobre la actividad de esta enzima en distintos organismos incluyendo larvas de anfibios, cangrejos (Lajmanovich *et al.*, 2013; Banae *et al.*, 2020). Respecto a esto último, Zhang *et al.* (2023) reportaron que el sinergismo entre GLI y CP puede deberse al hecho de que el insecticida puede inhibir directamente la función de la AChE mediante la fosforilación del residuo de serina en el dominio catalítico de la enzima (Adedara *et al.*, 2018), mientras que GLI carece de los grupos químicos específicos que contribuyen a la inhibición de la AChE. Así, el efecto de GLI sobre la AChE puede atribuirse al efecto indirecto de la glicina presente en su estructura química, y la mezcla de ambos pueden provocar efectos sinérgicos sobre la inhibición de la AChE (Cattani *et al.*, 2014).

Si bien en este ensayo se ha profundizado la interacción de GLI y CIP dado que la mezcla abarcó la batería completa de biomarcadores en esta tesis, también se han observado efectos diferenciales entre las mezclas binarias entre antibióticos (CIP+AMX), entre herbicida e insecticida (HBGLI+CP) y la mezcla cuaternaria de los cuatro compuestos con respecto a las acciones individuales de HBGLI y CIP, indicando que la complejidad de efectos aumenta según la complejidad de las mezclas. Así, el estudio de las interacciones entre contaminantes puede resultar divergente, para lo cual es importante tener en cuenta no sólo el significado biológico de cada parámetro implicado en el efecto y la magnitud de la interacción en términos del desvío de la aditividad (Santos *et al.*, 2011).

## **5 . CONCLUSIONES**



Este estudio permitió analizar y caracterizar la toxicidad de contaminantes de preocupación emergente (CPE) de los sistemas acuáticos de la región en larvas de anfibios sobre la base de la integración de múltiples biomarcadores. Las alteraciones de estos parámetros en distintas etapas del desarrollo de los anfibios anuros resaltan la implicancia que tiene la exposición crónica de estos contaminantes en el ambiente sobre la salud de los individuos, vulnerables a estos estresores durante su desarrollo desde distintos aspectos biológicos. Asimismo, la evaluación de exposiciones tanto individuales como mezclas de CPE demostró la necesidad no sólo de contemplar el efecto de cada contaminante, sino también su efecto conjunto para la estimación del riesgo ecotoxicológico.

El diseño experimental propuesto, así como la elección de biomarcadores para la evaluación de los efectos de los diferentes tratamientos y concentraciones han sido eficaces para lograr los objetivos propuestos y corroborar las hipótesis planteadas. Así, se ha logrado evaluar y caracterizar la toxicidad de dos herbicidas a base de GLI y GA, el insecticida clorpirifós, y los antibióticos CIP y AMX, determinando diferentes efectos a nivel bioquímico, histológico, morfológico, y sobre la microbiota bacteriana intestinal. Estos CPE han sido evaluados en formulaciones comerciales e incluyen ingredientes adicionales a los principios activos cuya identidad y potencial riesgo tóxico son desconocidos. En este sentido, es fundamental considerar la influencia de estos adyuvantes en la toxicidad de los CPE y su variabilidad marca-específica, como así también destacar la importancia de estudiar los contaminantes en forma de presentaciones comerciales, ya que es forma en la que son introducidos en el ambiente.

La exposición individual de cada herbicida destacó la toxicidad del HBGLI a nivel neurotóxico, hepático, de la tasa de desarrollo y la microbiota bacteriana intestinal generando disbiosis y aumento de géneros bacterianos. La exposición a HBGA mostró una marcada disrupción endócrina a nivel tiroideo y estrés oxidativo, así como un significativo efecto teratogénico a nivel morfológico. Los efectos de la mezcla de HBGLI+HBGA incluyeron tanto potenciación en cuanto al estrés oxidativo y diversidad bacteriana, y antagonismo para parámetros como neurotoxicidad, biomarcadores hepáticos y teratogénicos. La posible existencia de una fuerte interacción química entre los principios activos de ambos herbicidas se traduce en diversos y complejos efectos en los organismos -muchos aún desconocidos-, y a escala ambiental, en una complejización aún mucho mayor dada la posible mezcla con muchos otros compuestos.

Además, se ha comprobado la toxicidad del HBGLI y CIP, tanto individual como en mezclas. Las alteraciones histológicas, morfológicas y de la microbiota bacteriana intestinal de las larvas expuestas a ambos contaminantes tanto individualmente como en mezcla, alertan

sobre el riesgo ecotoxicológico de la coexistencia de estos dos contaminantes en las matrices donde los anfibios se reproducen, se desarrollan y sobreviven. La disbiosis de la microbiota bacteriana intestinal fue claramente distinta en los tratamientos evaluados, con un aumento de diversidad de taxones bacterianos ante la exposición a HBGLI y aumento de la dominancia en la exposición a CIP. También se determinó la sensibilidad de los taxones aislados de las larvas expuestas a cada CPE, siendo ésta menor que en larvas no expuestas. El potencial riesgo de tolerancia y de adquisición de resistencia bacteriana a los CPE en organismos silvestres expuestos refuerza la idea de que las larvas pueden representar reservorios de bacterias de interés y de peligro sanitario. Además, los hallazgos a nivel microbiológico enfatizan la necesidad sobre profundizar sobre el desequilibrio que pueden generar los CPE entre bacterias beneficiosas y patógenas, especialmente aquellas de interés para la salud que producen disbiosis.

Por otro lado, algunos biomarcadores bioquímicos (relacionados a la disrupción endócrina de la hormona tiroidea y potenciación de la neurotoxicidad, respectivamente) demostraron un efecto destacable sólo en la interacción del HBGLI y CIP, señalando el riesgo de la presencia conjunta de estos CPE en el ambiente. Aún más, la exposición de larvas en etapa más avanzada del desarrollo a tratamientos con el insecticida CP y el antibiótico AMX en mezclas binarias y también en las cuaternarias, mostraron neurotoxicidad, estrés oxidativo y alteración tiroidea (tiroxicosis). Los cambios observados en la diversidad y abundancia de la microbiota bacteriana intestinal en larvas expuestas tanto a HBGLI, como CIP y la mezcla de ambos, al igual que para HBGLI y HBGA en el ensayo anterior, sugieren un efecto de disbiosis. Este proceso conduce a problemas fisiológicos adicionales a través de alteraciones en el funcionamiento normal de la microbiota bacteriana intestinal, incluidas las actividades metabólicas relacionadas con los nutrientes y la recuperación de energía.

Finalmente, al considerar el deterioro de los sistemas acuáticos por la contaminación, se resalta la importancia de que las evaluaciones de riesgo ambiental consideren el análisis ontogénico de múltiples biomarcadores de distinta jerarquía y la exposición crónica, ya que resultan importantes como potenciales predictores sobre el concepto implementado por la Organización Mundial de la Salud de “*One Health*” o “*Una Salud*” (OMS, 2023). El término refiere a la interdependencia entre la sanidad animal, la salud humana y ambiental, y su vinculación con los ecosistemas que co-habitan para comprender, anticipar y abordar los riesgos para la salud. También se destaca la necesidad de profundizar estos estudios sobre mezclas complejas para conocer las interacciones específicas de contaminantes que coexisten en las matrices ambientales. Por lo mencionado anteriormente, resulta fundamental abordar un cambio de paradigma en el sistema productivo que actualmente ignora el impacto negativo

sobre “*Una Salud*” y en el que las producciones científicas resultarían importantes en la gestión del riesgo a distintos niveles jurisdiccionales de nuestro país como en el establecimiento de valores guía para la protección de la biota acuática nativa y sus ambientes.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abad, M. P. E., & Martínez, T. L. (1997). Cambios recientes en las relaciones entre agricultura y ganadería extensiva: de la complementariedad a la dependencia de la ganadería. *Polígonos: Revista de geografía*, (7), 47-76. <https://doi.org/10.18002/pol.v0i7.1049>
- Abass, K., & Pelkonen, O. (2013). The inhibition of major human hepatic cytochrome P450 enzymes by 18 pesticides: comparison of the N-in-one and single substrate approaches. *Toxicology in Vitro*, 27(5), 1584-1588. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.05.003>
- Agudelo-Londoño, P. A., Rivera-Caycedo, J. E., Bernal-Vera, M. M., & Castaño-Ramírez, E. (2012). Caracterización del riesgo de contaminación por actividades pecuarias en el río Molinos, Villamaría (Caldas, Colombia). *Veterinary & Animal Science/Veterinaria y Zootecnia*, 6(2), 56-82. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.09.016>
- Akinbami, O. R., Olofinsae, S., & Ayeni, F. A. (2018). Prevalence of extended spectrum beta lactamase and plasmid mediated quinolone resistant genes in strains of Klebsiella pneumonia, Morganella morganii, Leclercia adecarboxylata and Citrobacter freundii isolated from poultry in South Western Nigeria. *Peer J*, 6, e5053. <https://doi.org/10.7717/peerj.5053>
- Ahn, Y. J., Cho, J. R., Kim, Y. J., Yoo, J. K., & Lee, J. O. (1997). Toxicity of the herbicide glufosinate-ammonium to Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae) under laboratory and field conditions. *Pesticide science*, 51(4), 455-461. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199712\)51:4<455::AID-PS667>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199712)51:4<455::AID-PS667>3.0.CO;2-F)
- Alavanja, M. C. (2009). Introduction: Pesticides use and exposure, extensive worldwide. *Reviews on environmental health*, 24(4), 303-310. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2009.24.4.303>
- Albinati, A. C. L., Moreira, E. L. T., Albinati, R. C. B., Carvalho, J. V., De Lira, A. D., Santos, G. B., & Vidal, L. V. O. (2009). Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61, 621-627. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000300015>
- Aldridge, W. N. (1953). Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochemical Journal*, 53(1), 110. <https://doi.org/10.1042/bj0530110>

- Allen-King, R. M., Butler, B. J., & Reichert, B. (1995). Fate of the herbicide glufosinate-ammonium in the sandy, low-organic-carbon aquifer at CFB Borden, Ontario, Canada. *Journal of Contaminant Hydrology*, 18(2), 161-179. [https://doi.org/10.1016/0169-7722\(94\)00046-K](https://doi.org/10.1016/0169-7722(94)00046-K)
- Alonso, L. L., Podio, N. S., Marino, D. J., Almada, N. S., Gange, J. M., Bernigaud, I., & Wunderlin, D. A. (2024). Evaluating antibiotic occurrence, degradation, and environmental risks in poultry litter within Argentina's agricultural hub. *Science of The Total Environment*, 920, 170993. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170993>
- Álvarez-Ruiz, R., & Picó, Y. (2020). Analysis of emerging and related pollutants in aquatic biota. *Trends in environmental analytical chemistry*, 25, e00082. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2020.e00082>
- Annett, R., Habibi, H.R., & Hontela, A. (2014). Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology* 34(5), 458-479. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>
- ArgenBio© (2024). Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Cultivos transgénicos aprobados en Argentina. Disponible en: <http://www.argenbio.org/cultivos-transgenicos> (Último acceso: 03/03/2024)
- Aronzon, C. M., Sandoval, M. T., Herkovits, J., & Pérez-Coll, C. S. (2010). Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology*, 26(4), 373–381. <https://doi.org/10.1002/tox.20564>
- Aronzon, C. M., Sandoval, M. T., Herkovits, J., & Pérez-Coll, C. S. (2011). Stage-dependent toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environmental toxicology*, 26(4), 373-381. <https://doi.org/10.1002/tox.20564>
- Aronzón, C. M. (2013). Evaluación de la toxicidad de los contaminantes Cobre, Nonilfenol y Diazinón sobre embriones y larvas de *Rhinella (Bufo) arenarum*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires
- Attademo A. M., Peltzer, P. M., & Lajmanovich, R. C. (2005). Amphibians occurring in soybean and implications for biological control in Argentina. *Agriculture, ecosystems & environment*, 106, 389-394. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.08.012>



- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Cabagna, M., & Fiorenza, G. (2007). Plasma B-esterase and glutathione S-transferase activity in the toad *Chaunus schneideri* (Amphibia, Anura) inhabiting rice agroecosystems of Argentina. *Ecotoxicology*, *16*, 533-539. <https://doi.org/10.1007/s10646-007-0154-0>
- Attademo, A. M., Sanchez-Hernandez, J. C., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., & Junges, C. (2017). Effect of diet on carboxylesterase activity of tadpoles (*Rhinella arenarum*) exposed to chlorpyrifos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *135*, 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.09.012>
- Avila Vazquez, M., Maturano, E., Etchegoyen, M. A., Difilippo, F. S., & Maclean, B. (2017). Association between cancer and environmental exposure to glyphosate. *International Journal of Clinical Medicine*, *8*, 73-85. <https://doi.org/10.4236/ijcm.2017.82007>
- Attademo, A. M., Cuzziol Boccioni, A. P., Peltzer, P. M., Franco, V. G., Simoniello, M. F., Passeggi, M. C., & Lajmanovich, R. C. (2022). Effect of microplastics on the activity of carboxylesterase and phosphatase enzymes in *Scinax squalirostris* tadpoles. *Environmental Monitoring and Assessment*, *194*(10), 718. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10322-2>
- Babalola, O. O., Truter, J. C., & van Wyk, J. H. (2021). Impacts of three glyphosate formulations on gonadal development of *Xenopus laevis*. *Toxicology Research and Application*, *5*, 23978473211031467. <https://doi.org/10.1177/23978473211031467>
- Babić, S., Barišić, J., Stipaničev, D., Repec, S., Lovrić, M., Malev, O., & Klobučar, G. (2018). Assessment of river sediment toxicity: Combining empirical zebrafish embryotoxicity testing with in silico toxicity characterization. *Science of the total environment*, *643*, 435-450. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.124>
- Babini, M. S., Bionda, C. D. L., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2016). Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Environmental monitoring and assessment*, *188*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5473-2>
- Bacacela Arévalo, C., Quizhpe Peralta, A. (2022). Use of antibiotics in animal husbandry and agriculture within the framework of the National Action Plans in the Andean region. *Ciencia Digna*, N02.
- Bach, N. C., Marino, D. J., Natale, G. S., & Somoza, G. M. (2018). Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the

- neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 202, 289-297. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.110>
- Banaee, M., Akhlaghi, M., Soltanian, S., Sureda, A., Gholamhosseini, A., & Rakhshaninejad, M. (2020). Combined effects of exposure to sub-lethal concentration of the insecticide chlorpyrifos and the herbicide glyphosate on the biochemical changes in the freshwater crayfish *Pontastacus leptodactylus*. *Ecotoxicology*, 29, 1500-1515. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02233-0>
- Barbieri, G. F., Young, B. G., Dayan, F. E., Streibig, J. C., Takano, H. K., Merotto Jr, A., & Avila, L. A. (2023). Herbicide mixtures: interactions and modeling. *Advances in Weed Science*, 40, e020220051. <https://doi.org/10.51694/AdvWeedSci/2022;40:seventy-five011>
- Barlow, J.W., Crowe, T.C., Topliss, D.J., 1997. Thyroid hormone antagonism. In: *Pharmacotherapeutics of the Thyroid Gland*. Springer, Berlin, pp. 319-342.
- Barreto, E., Salgado Costa, C., Demetrio, P., Lascano, C., Venturino, A., & Natale, G.S. (2020). Sensitivity of *Boana pulchella* (Anura: Hylidae): Effects at the individual and biochemical levels. *Environmental Toxicology and Chemistry*, (4), 834-841. <https://doi.org/10.1002/etc.4664>
- Basilone, G., Gargano, A., Corriero, A., Zupa, R., Santamaria, N., Mangano, S., & Passantino, L. (2018). Liver melanomacrophage centres and CYP1A expression as response biomarkers to environmental pollution in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) from the western Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, 131, 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.028>
- Becker, C. G., Fonseca, C. R., Haddad, C. F. B., Batista, R. F., & Prado, P. I. (2007). Habitat split and the global decline of amphibians. *Science*, 318(5857), 1775-1777. <https://doi.org/10.1126/science.1149374>
- Behrendt, H., Matthies, M., Gildemeister, H., & Görlitz, G. (1990). Leaching and transformation of glufosinate-ammonium and its main metabolite in a layered soil column. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(5), 541-549. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090502>
- Beliaeff, B., & Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(6), 1316-1322. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>

- Benedict, K. M., Gow, S. P., Reid-Smith, R. J., Booker, C. W., Morley, P. S. (2012). Metrics for quantifying antimicrobial use in beef feedlots. *The Canadian Veterinary Journal*, 53(8), 841.
- Bernabò, I., Gallo, L., Sperone, E., Tripepi, S., & Brunelli, E. (2011). Survival, development, and gonadal differentiation in *Rana dalmatina* chronically exposed to chlorpyrifos. *The Journal of Experimental Zoology – A*, 315(5), 314-327. <https://doi.org/10.1002/jez.678>
- Bernard, A., & Lauwerys, R. 1986. Effects of cadmium in human. pp. 135-77. En: F. C. Foulkes (Ed.). *Handbook of Experimental Pharmacology*" Vol. 80. Springer-Verlag, Berlin.
- Bernardi, N., Gentile, N., Mañas, F., Méndez, Á., Gorla, N., & Aiassa, D. (2015). Evaluación del nivel de daño en el material genético de niños de la provincia de Córdoba expuestos a plaguicidas. *Archivos argentinos de pediatría*, 113(2), 6-11.
- Bethke, R. K., Molin, W. T., Sprague, C., & Penner, D. (2013). Evaluation of the Interaction between Glyphosate and Glufosinate. *Weed Science*, 61(01), 41-47. <https://doi.org/10.1614/WS-D-12-00031.1>
- Biesalski, H. K. (2016). Nutrition meets the microbiome: micronutrients and the microbiota. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 1372(1), 53-64. <https://doi.org/10.1111/nyas.13145>
- Bionda C. L., Lajmanovich, R. C., Salas, N. E., Martino, A. L., di Tada, I. E. (2011). Reproductive ecology of the common South American toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae): reproductive effort, clutch size, fecundity, and mate selection. *Journal of Herpetology*, 45, 261–264. <https://doi.org/10.1670/09-238.1>
- Bionda C. D. L., Salas, N.E., Caraffa, E., Baraquet, M., & Martino, A. (2012). On abnormalities recorded in an urban population of *Rhinella arenarum* from central Argentina. *Herpetology notes* 5, 237-241.
- Bionda, C.L, Babini, S., Martino, A.L., Salas, N.E., & Lajmanovich, R.C. (2018). Impact assessment of agriculture and livestock over age, longevity and growth of populations of common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae), central area of Argentina. *Global Ecology and Conservation*, 14, e00398. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2018.e00398>
- Blaustein, A. R., & Johnson, P. T. (2003). The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1(2), 87-94. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2003\)001\[0087:TCODA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2003)001[0087:TCODA]2.0.CO;2)

- Blot, N., Veillat, L., Rouzé, R., & Delatte, H. (2019). Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. *PLoS One*, *14*(4), e0215466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215466>
- Bolis, A., Gazzola, A., Pellitteri-Rosa, D., Colombo, A., Bonfanti, P., & Bellati, A. (2020). Exposure during embryonic development to Roundup® Power 2.0 affects lateralization, level of activity and growth, but not defensive behaviour of marsh frog tadpoles. *Environmental pollution*, *263*, 114395. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114395>
- Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., & Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, *239*(1-3), 229-246. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>
- Bonfanti, P., Saibene, M., Bacchetta, R., Mantecca, P., & Colombo, A. (2018). A glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*, *195*, 103-113. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.007>
- Bonifacio, A. F., & Hued, A. C. (2019). Single and joint effects of chronic exposure to chlorpyrifos and glyphosate based pesticides on structural biomarkers in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere*, *236*, 124311. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.042>
- Bonomo, M. M., de Castro Sachi, I. T., Paulino, M. G., Fernandes, J. B., Carlos, R. M., & Fernandes, M. N. (2021). Multi-biomarkers approach to access the impact of novel metal-insecticide based on flavonoid hesperidin on fish. *Environmental Pollution*, *268*, 115758. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115758>
- Boone, M. D., & James, S. M. (2005). Aquatic and terrestrial mesocosms in amphibian ecotoxicology. *Applied Herpetology*, *2*(3), 231. <https://doi.org/10.1163/1570754054507442>
- Bote, K., Pöppe, J., Merle, R., Makarova, O., & Roesler, U. (2019) Minimum inhibitory concentration of glyphosate and of a glyphosate-containing herbicide formulation for *Escherichia coli* isolates—differences between pathogenic and non-pathogenic isolates and between host species. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 932. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00932>
- Brade, T., Gessert, S., Kühl, M., & Pandur, P. (2007). The amphibian second heart field: *xenopus islet-1* is required for cardiovascular development. *Developmental Biology*, *311*, 297-310. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.08.004>

- Brande-Lavridsen, N., Christensen-Dalsgaard, J., & Korsgaard, B. (2010). Effects of ethinylestradiol and the fungicide prochloraz on metamorphosis and thyroid gland morphology in *Rana temporaria*. *The Open Zoology Journal*, 3(1). <https://doi.org/10.2174/1874336601003010007>
- Bravo, E. (2006). Biocombustibles, cutlivos energeticos y soberania alimentaria: encendiendo el debate sobre biocommstibles. Accion Ecologica, Quito, Ecuador
- Brisse, S., Milatovic, D., Fluit, A. C., Verhoef, J., & Schmitz, F. J. (2000). Epidemiology of quinolone resistance of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19, 64-68. <https://doi.org/10.1007/s100960050014>
- Brodeur, J. C., Svartz, G., Perez-Coll, C. S., Marino, D. J., & Herkovits, J. (2009). Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquatic Toxicology*, 91(2), 161-170. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.003>
- Brodeur, J. C., Sassone, A., Hermida, G. N., & Codugnello, N. (2013). Environmentally-relevant concentrations of atrazine induce non-monotonic acceleration of developmental rate and increased size at metamorphosis in *Rhinella arenarum* tadpoles. *Ecotoxicology and environmental safety*, 92, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.019>
- Brodeur, J.C., Poliserpi, M.B., D'Andrea, M.F., & Sánchez, M. (2014). Synergy between glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American toad *Rhinella arenarum*. *Chemosphere* 112, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.065>
- Brodeur, J. C., Damonte, M. J., Rojas, D. E., Cristos, D., Vargas, C., Poliserpi, M. B., & Andriulo, A. E. (2022). Concentration of current-use pesticides in frogs from the Pampa region and correlation of a mixture toxicity index with biological effects. *Environmental Research*, 204, 112354. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112354>
- Brovini, E. M., Cardoso, S. J., Quadra, G. R., Vilas-Boas, J. A., Paranaíba, J. R., Pereira, R. D. O., & Mendonça, R. F. (2021). Glyphosate concentrations in global freshwaters: are aquatic organisms at risk? *Environmental Science and Pollution Research*, 28(43), 60635-60648. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14609-8>

- Brunetti, A. E., Lyra, M. L., Monteiro, J. P., Zurano, J. P., Baldo, D., Haddad, C. F., & Moeller, A. H. (2023). Convergence of gut microbiota in myrmecophagous amphibians. *Proceedings of the Royal Society B*, *290*(2011), 20232223. <https://doi.org/10.1098/rspb.2023.2223>
- Buchholz, D.R. (2015). More similar than you think: Frog metamorphosis as a model of human perinatal endocrinology. *Developmental Biology* *408*, 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.02.018>
- Cabagna, M. C., Lajmanovich, R. C., Stringhini, G., Sanchez Hernandez, J. C., & Peltzer, P. (2005). Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Applied Herpetology* *2*, 373-380. <https://doi.org/10.1163/157075405774483085>
- Çakıcı, Ö. (2015). Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). *Experimental and Toxicologic Pathology*, *67*(3), 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2014.12.003>
- Calas, A. G., Richard, O., Mème, S., Beloeil, J. C., Doan, B. T., Gefflaut, T., & Montécot, C. (2008). Chronic exposure to glufosinate-ammonium induces spatial memory impairments, hippocampal MRI modifications and glutamine synthetase activation in mice. *Neurotoxicology*, *29*(4), 740-747. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.04.020>
- Caldwell, J. P., & Shepard, D. B. (2007). Calling site fidelity and call structure of a neotropical toad, *Rhinella ocellata* (Anura: Bufonidae). *Journal of Herpetology*, *41*(4), 611-621. <https://doi.org/10.1670/07-025.1>
- Calsolaro, V., Pasqualetti, G., Niccolai, F., Caraccio, N., & Monzani, F. (2017). Thyroid Disrupting Chemicals. *International Journal of Molecular Sciences* *18*(12), 2583. <https://doi.org/10.3390/ijms18122583>
- Cardoza, L. A., Knapp, C. W., Larive, C. K., Belden, J. B., Lydy, M., & Graham, D.W. (2005). Factors affecting the fate of ciprofloxacin in aquatic field systems. *Water Air Soil Poll.* *161*, 383-398. <https://doi.org/10.1007/s11270-005-5550-6>
- Carlsson, G. (2019). Effect-based environmental monitoring for thyroid disruption in Swedish amphibian tadpoles. *Environmental Monitoring and Assessment*, *191*, 454. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7590-1>
- Carrão, D. B., Habenchus, M. D., de Albuquerque, N. C. P., da Silva, R. M., Lopes, N. P., & de Oliveira, A. R. M. (2019). In vitro inhibition of human CYP2D6 by the chiral pesticide

- fipronil and its metabolite fipronil sulfone: prediction of pesticide-drug interactions. *Toxicology letters*, 313, 196-204.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.07.005>
- Carvalho, F. P., Fowler, S. W., & Readman, J. W. (1998). The fate and effects of agrochemical residues in tropical coastal lagoons investigated with <sup>14</sup>C-labelled compounds and radiotracer techniques. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie. Verhandlungen*, 26(3), 1430-1432.  
<https://doi.org/10.1080/03680770.1995.11900960>
- Casabé, N., Piola, L., Fuchs, J., Oneto, M. L., Pamparato, L., Basack, S., & Kesten, E. (2007). Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *Journal of Soils and Sediments*, 7, 232-239.  
<https://doi.org/10.1065/jss2007.04.224>
- Casco, V. H., & Lajmanovich, R. C. (1999). Atlas histo-embriológico de los principales estadios organogénicos de *Physalaemus bilingnigerus*-Amphibia: Leptodactilydae. *Comunicaciones Nueva Serie*, 7, 70.
- Casco, V. H., Izaguirre, M. F., Marín, L., Vergara, M. N., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P., & Soler, A. P. (2006). Apoptotic cell death in the central nervous system of *Bufo arenarum* tadpoles induced by cypermethrin. *Cell biology and toxicology*, 22, 199-211.  
<https://doi.org/10.1007/s10565-006-0174-1>
- Cauble, K., & Wagner, R.S. (2005). Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75, 429-435.  
<https://doi.org/10.1007/s00128-005-0771-3>
- Cattani, D., de Liz Oliveira Cavalli, V. L., Heinz Rieg, C.E., Domingues, J.T., Dal-Cim, T., Tasca, C.I., Mena Barreto Silva, F.R., Zamoner, A. (2014). Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology*, 320, 34-45.  
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.03.001>
- Cayuela, H., Lambrey, J., Vacher, J. P., & Miaud, C. (2015). Highlighting the effects of land-use change on a threatened amphibian in a human-dominated landscape. *Population ecology*, 57, 433-443. <https://doi.org/10.1007/s10144-015-0483-4>

- Cedergreen, N. (2014). Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PloS one*, 9(5), e96580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096580>
- Cei, J. M. (1980). Amphibians of Argentina. (Vol. 2). Università degli studi di Firenze, Italia
- Cengiz, M. F., Basancelebi, O., & Kitis, Y. E. (2017). Glyphosate residues in drinking waters and adverse health effects. *The Turkish Journal of Occupational/Environmental Medicine and Safety*, 2(1(3)), 247-258.
- Chai, L., Li, Y., Chen, Z., Chen, A., & Deng, H. (2017) Responses of growth, malformation, and thyroid hormone-dependent genes expression in *Bufo gargarizans* embryos following chronic exposure to Pb<sup>2+</sup>. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(36), 27953–27962. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0413-4>
- Chan, Y. C., Chang, S. C., Hsuan, S. L., Chien, M. S., Lee, W. C., Kang, J. J., & Liao, J. W. (2007). Cardiovascular effects of herbicides and formulated adjuvants on isolated rat aorta and heart. *Toxicology in vitro*, 21(4), 595-603. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.12.007>
- Chapman, P. M. (2002). Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine pollution bulletin*, 44(1), 7-15. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00253-3](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00253-3)
- Chapman, K., Creton, S., Kupferschmidt, H., Bond, G. R., Wilks, M. F., & Robinson, S. (2010). The value of acute toxicity studies to support the clinical management of overdose and poisoning: A cross-discipline consensus. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 58(3), 354-359. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.07.003>
- Chedik, L., Bruyere, A., Bacle, A., Potin, S., Le Vée, M., & Fardel, O. (2018). Interactions of pesticides with membrane drug transporters: implications for toxicokinetics and toxicity. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 14(7), 739-752. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1487398>
- Chèvre, N., Loepfe, C., Singer, H., Stamm, C., Fenner, K., & Escher, B.I. (2006). Including mixtures in the determination of water quality criteria for herbicides in surface water. *Environmental Science and Technology* 40, 426-435. <https://doi.org/10.1021/es050239l>



- Chiesa, M. E., Rosenberg, C. E., Fink, N. E., & Salibián, A. (2006). Serum protein profile and blood cell counts in adult toads *Bufo arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae): effects of sublethal lead acetate. *Archives of environmental contamination and toxicology*, *50*, 384-391. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0252-4>
- Choung, C. B., Hyne, R. V., Stevens, M. M., & Hose, G. C. (2013). The ecological effects of a herbicide–insecticide mixture on an experimental freshwater ecosystem. *Environmental Pollution*, *172*, 264-274. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.09.002>
- Chuah, T. S., Teh, H. H., Cha, T. S., & Ismail, B. S. (2008). Antagonism of glufosinate ammonium activity caused by glyphosate in the tank mixtures used for control of goosegrass (*Eleusine indica Gaertn.*). *Plant Protection Quarterly*, *23*(3), 116-119. <https://doi.org/10.3316/ielapa.396037525116072>
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and environmental safety*, *59*(3), 309-315. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00141-6](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00141-6)
- Coady, K., Marino, T., Thomas, J., Currie, R., Hancock, G., Crofoot, J., & Klecka, G. (2010). Evaluation of the amphibian metamorphosis assay: exposure to the goitrogen methimazole and the endogenous thyroid hormone L-thyroxine. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, *29*(4), 869-880. <https://doi.org/10.1002/etc.74>
- Coalova, I., Mencacci, S., & Fassiano, A. V. (2013). Genotoxicidad de mezclas de pesticidas: ¿algo más que la suma de las partes? *Acta toxicológica argentina*, *21*(1), 5-14.
- Coalova, I., de Molina, M. D. C. R., & Chaufan, G. (2014). Influence of the spray adjuvant on the toxicity effects of a glyphosate formulation. *Toxicology in Vitro*, *28*(7), 1306-1311. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.06.014>
- Collins, J. P., Crump, M. L., & Lovejoy III, T. E. (2009). *Extinction in our times: global amphibian decline*. Oxford University Press.
- Collins, J. P. (2010). Amphibian decline and extinction: what we know and what we need to learn. *Diseases of aquatic organisms*, *92*(2-3), 93-99. <https://doi.org/10.3354/dao02307>
- Connon, R.E., Geist, J. & Werner, I. (2012). Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors* *12*, 12741-12771. <https://doi.org/10.3390/s120912741>

- Coors, A., & Frische, T. (2011). Predicting the aquatic toxicity of commercial pesticide mixtures. *Environmental Sciences Europe*, 23, 1-18. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-23-22>
- Costantini, D. (2014). Oxidative stress and hormesis in evolutionary ecology and physiology. *A marriage between mechanistic and evolutionary approaches*, 362.
- Conti M.E. (2008) – Biomarkers for environmental monitoring. Pp: 25-46. En: Conti M.E. (Ed). *Biological monitoring: Theory and applications*. Wit Press, UK.
- Costa, M. J., Monteiro, D. A., Oliveira-Neto, A. L., Rantin, F. T., & Kalinin, A. L. (2008). Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. *Ecotoxicology*, 17, 153-163. <https://doi.org/10.1007/s10646-007-0178-5>
- Costa, F. R., Rech, R., Duke, S. O., & Carvalho, L. B. (2018). Lack of effects of glyphosate and glufosinate on growth, mineral content, and yield of glyphosate and glufosinate-resistant maize. *GM crops & food*, 9(4), 189-198. <https://doi.org/10.1080/21645698.2018.1511204>
- Cox, C., & Surgan, M. (2006). Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environmental health perspectives*, 114(12), 1803-1806. <https://doi.org/10.1289/ehp.9374>
- Croft, A.M., & Herxheimer, A. (2002). Adverse effects of the antimalaria drug, mefloquine: due to primary liver damage with secondary thyroid involvement? *BMC Public Health* 2(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-2-6>
- Cserhádi, T. (1995). Alkyl ethoxylated and alkylphenol ethoxylated nonionic surfactants: interaction with bioactive compounds and biological effects. *Environmental Health Perspectives*, 103(4), 358-364. <https://doi.org/10.1289/ehp.103-1519097>
- Curi, L. M., Peltzer, P. M., Sandoval, M. T., Lajmanovich, R. C., & Céspedes, J. A. (2017). Efectos letales y subletales causados por la exposición al herbicida 2, 4D sobre larvas *Physalaemus albonotatus* (anura, leptodactylidae). XXIII Reunión De Comunicaciones Científicas Y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste.
- Curi, L. M., Peltzer, P. M., Sandoval, M. T., & Lajmanovich, R. C. (2019). Acute toxicity and sublethal effects caused by a commercial herbicide formulated with 2, 4-D on *Physalaemus albonotatus* tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-4073-x>

- Cuzziol Boccioni, A. P., Peltzer, P. M., Martinuzzi, C. S., Attademo, A. M., León, E. J., & Lajmanovich, R. C. (2020). Morphological and histological abnormalities of the neotropical toad, *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) larvae exposed to dexamethasone. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 56(1), 41-53. <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1832410>
- Cuzziol Boccioni, A. P., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., & Martinuzzi, C. S. (2021). Toxicity assessment at different experimental scenarios with glyphosate, chlorpyrifos and antibiotics in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Chemosphere*, 273, 128475. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128475>
- Cuzziol Boccioni, A. P. C., Lener, G., Peluso, J., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Aronzon, C., & Lajmanovich, R. C. (2022). Comparative assessment of individual and mixture chronic toxicity of glyphosate and glufosinate ammonium on amphibian tadpoles: A multibiomarker approach. *Chemosphere*, 309, 136554. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136554>
- Cuzziol Boccioni, A. P., García-Effron, G., Peltzer, P. M., & Lajmanovich, R. C. (2023). Effect of glyphosate and ciprofloxacin exposure on enteric bacteria of tadpoles. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(2), 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.08.004>
- Da Silva, R. A., Arenas, N. E., Luiza, V. L., Bermudez, J. A. Z., Clarke, S. E. (2023). Regulations on the use of antibiotics in livestock production in South America: a comparative literature analysis. *Antibiotics*, 12(8), 1303. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081303>
- de Araujo, J. S., Delgado, I. F., & Paumgarten, F. J. (2016). Glyphosate and adverse pregnancy outcomes, a systematic review of observational studies. *BMC public health*, 16, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12889-016-3153-3>
- De Liguoro, M., Bona, M. D., Gallina, G., Capolongo, F., Gallochio, F., Binato, G., & Di Leva, V. (2014). A monitoring of chemical contaminants in waters used for field irrigation and livestock watering in the Veneto region (Italy), using bioassays as a screening tool. *Environmental science and pollution research*, 21, 3546-3557. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2357-7>
- de Moraes, A. C., Orlando, E. A., da Rosa Prado, E. J., de Carvalho, A. C. C., Machado-Neto, J. G., Simionato, A. V. C., & de Andrade Belo, M. A. (2022). Ecotoxicological assessment of amoxicillin trihydrate: Stability, solubility, and acute toxicity for

- Oreochromis niloticus*, *Lemna minor*, and *Daphnia magna*. *Cleaner Chemical Engineering*, 1, 100005. <https://doi.org/10.1016/j.clce.2022.100005>
- de Souza, J. S., Kizys, M. M. L., da Conceicao, R. R., Glebocki, G., Romano, R. M., Ortiga-Carvalho, T. M., Giannocco, G., Guerreiroda, I.D., da Silva, M.R.D., Romano, M. A., & Chiamolera, M.I. (2017). Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. *Toxicology* 377, 25-37. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.11.005>
- Del Conte, E., & Sirlin, J. L. (1952). Pattern series of the first embryony stages in *Bufo arenarum*. *The Anatomical Record*, 112, 125-135. <https://doi.org/10.1002/ar.1091120109>
- Degitz, S. J., Holcombe, G. W., Flynn, K. M., Kosian, P. A., Korte, J. J., & Tietge, J. E. (2005). Progress towards development of an amphibian-based thyroid screening assay using *Xenopus laevis*. Organismal and thyroidal responses to the model compounds 6-propylthiouracil, methimazole, and thyroxine. *Toxicological sciences*, 87(2), 353-364. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi246>
- Demichelis, S. O., De La Torre, F. R., Ferrari, L., Garcia, M. E., & Salibian, A. (2001). Tadpoles assay: Its application to a water toxicity assessment of a polluted urban river. *Environmental monitoring and assessment*, 68, 63-73. <https://doi.org/10.1023/A:1010786906823>
- Demonte, L. D., Michlig, N., Gaggiotti, M., Adam, C. G., Beldoménico, H. R., & Repetti, M. R. (2018). Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method. *Science of the total environment*, 645, 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.340>
- Dennis, P. G., Kukulies, T., Forstner, C., Orton, T. G., & Pattison, A. B. (2018). The effects of glyphosate, glufosinate, paraquat and paraquat-diquat on soil microbial activity and bacterial, archaeal and nematode diversity. *Scientific reports*, 8(1), 2119. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20589-6>
- Denver, R. J., Glennemeier, K. A., & Boorse, G. C. (2002). Endocrinology of complex life cycles: amphibians. En: *Hormones, Brain and Behavior*, pp 469. Eds D Pfaff, A Arnold, A Etgen, S Fahrbach & R Rubin. San Diego: Academic Press.
- Denver, R. J. (2013). Neuroendocrinology of amphibian metamorphosis. *Current topics in developmental biology*, 103, 195-227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385979-2.00007-1>

- Di Paola, M. M. (2005). Expansión de la frontera agropecuaria. *Apuntes Agroeconómicos*, 3(4), 1-12.
- Dias, C., Borges, A., Saavedra, M.J., Simões, M. (2018). Biofilm formation and multidrug-resistant *Aeromonas spp.* from wild animals. *The Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 12, 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.010>
- Dinehart, S. K., Smith, L. M., McMurry, S. T., Anderson, T. A., Smith, P. N., & Haukos, D. A. (2009). Toxicity of a glufosinate-and several glyphosate-based herbicides to juvenile amphibians from the Southern High Plains, USA. *Science of the Total Environment*, 407(3), 1065-1071. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.010>
- Dionisio, R., Daniel, D., de Alkimin, G. D., & Nunes, B. (2020). Multi-parametric analysis of ciprofloxacin toxicity at ecologically relevant levels: Short-and long-term effects on *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 74, 103295. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103295>
- Dong, T., Guan, Q., Hu, W., Zhang, M., Zhang, Y., Chen, M., & Xia, Y. (2020). Prenatal exposure to glufosinate ammonium disturbs gut microbiome and induces behavioral abnormalities in mice. *Journal of hazardous materials*, 389, 122152. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122152>
- Donthi, D. N. R., & Kumar, A. D. (2022). Glufosinate Ammonium An Overview. *Pan India: Pesticide Action Network*.
- Dornelles, M. F., & Oliveira, G. T. (2014). Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 66, 415-429. <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9967-4>
- Druart, C., Millet, M., Scheifler, R., Delhomme, O., & De Vaufleury, A. (2011). Glyphosate and glufosinate-based herbicides: fate in soil, transfer to, and effects on land snails. *Journal of Soils and Sediments*, 11, 1373-1384. <https://doi.org/10.1007/s11368-011-0409-5>
- Duke, S. O. (2018). Interaction of Chemical Pesticides and Their Formulation Ingredients with Microbes Associated with Plants and Plant Pests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(29), 7553–7561. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02316>

- Ebert, E., Leist, K. H., & Mayer, D. (1990). Summary of safety evaluation toxicity studies of glufosinate ammonium. *Food and Chemical Toxicology*, 28(5), 339-349. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(90\)90108-Y](https://doi.org/10.1016/0278-6915(90)90108-Y)
- Egea-Serrano, A., Relyea, R. A., Tejado, M., & Torralva, M. (2012). Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review. *Ecology and Evolution*, 2(7), 1382–1397. <https://doi.org/10.1002/ece3.249>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andreas, V. Jr., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid calorimetric determination of cholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Ensibi, C., Hernández Moreno, M.D., Soler, F., Daly Yahya, M.N., Míguez-Santiyán, M.P., Pérez-López, M. (2011). Effects of subchronic exposure to carbofuran on antioxidant defence system and malondialdehyde levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry* 94, 748-759. <https://doi.org/10.1080/02772248.2012.672821>
- Eterovick, P. C., Sloss, B. L., Scalzo, J. A., & Alford, R. A. (2016). Isolated frogs in a crowded world: Effects of human-caused habitat loss on frog heterozygosity and fluctuating asymmetry. *Biological Conservation*, 195, 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.12.036>
- Evariste, L., Barret, M., Mottier, A., Mouchet, F., Gauthier, L., & Pinelli, E. (2019). Gut microbiota of aquatic organisms: a key endpoint for ecotoxicological studies. *Environmental Pollution* 248, 989-999. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.101>
- Fariás, A., Hermida, G. N., & Fiorito, L. E. (2003). Structure of the kidney of *Bufo arenarum*: Intermediate segment, distal tubule and collecting tubule. *Biocell* 27, 19–28. <https://doi.org/10.32604/biocell.2003.27.019>
- FDA. (2012). The Green Book- FDA approved products. Food and Drug Administration, Rockville. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/animaldrugsatfda>
- FAO (Food and Agricultural Organization). Producción y protección vegetal (n.d.). (2024), <https://www.fao.org/newsroom/detail/fao-welcomes-decision-to-mark-international-day-of-plant-health/es#:~:text=causan%20grandes%20p%C3%A9rdidas-.La%20FAO%20estima%20que%20las%20plagas%20y%20enfermedades%20de%20las,los%20medios%20de%20vida%20rurales>

- Fatta-Kassinou, D., Kalavrouziotis, I. K., Koukoulakis, P. H., & Vasquez, M. I. (2011). The risks associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment. *Science of the Total Environment*, 409(19), 3555-3563. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.036>
- Feat-Vetel, J., Larrigaldie, V., Meyer-Dilhet, G., Herzine, A., Mougin, C., Laugeray, A., & Mortaud, S. (2018). Multiple effects of the herbicide glufosinate-ammonium and its main metabolite on neural stem cells from the subventricular zone of newborn mice. *Neurotoxicology*, 69, 152-163. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.10.001>
- Ferrari, M.J., Ator, S.W., Blomquist, J.D., & Dysart, J.E. (1997). Pesticides in surface water of the Mid-Atlantic Region, U. S. *Geological Survey Water-Resources Investigations Report*, 20, 9797-4280. <https://doi.org/10.3133/wri974280>
- Flach, H., Lenz, A., Pfeffer, S., Kühl, M., & Kühl, S. J. (2022). Impact of glyphosate-based herbicide on early embryonic development of the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*, 244, 106081. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106081>
- Franjesevic, A. J., Sillart, S. B., Beck, J. M., Vyas, S., Callam, C. S., & Hadad, C. M. (2019). Resurrection and reactivation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chemistry—A European Journal*, 25(21), 5337-5371. <https://doi.org/10.1002/chem.201805075>
- Freitas, J.S., Felício, A.A., Teresa, F.B., & Alves de Almeida, E. (2017). Combined effects of temperature and clomazone (Gamit®) on oxidative stress responses and B esterase activity of *Physalaemus nattereri* (Leiuperidae) and *Rhinella schneideri* (Bufonidae) tadpoles. *Chemosphere*, 185, 58-562. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.061>
- Fréville, M., Estienne, A., Ramé, C., Lefort, G., Chahnamian, M., Staub, C., & Dupont, J. (2022). Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in total or partial reversibility of plasma oxidative stress, cecal microbiota abundance and short-chain fatty acid composition in broiler hens. *Frontiers in Physiology*, 13, 974688. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.974688>
- Frost (2024). Amphibian Species of the World: an Online Reference. Versión 6.1. Base de datos electrónica disponible en: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php> American Museum of Natural History, New York, USA. Último acceso: 25/03/24
- Fu, Y., Zhang, W., Wang, H., Zhao, S., Chen, Y., Meng, F., & Zhang, F. (2013). Specific patterns of gyr A mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin

- in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *BMC infectious diseases*, 13(1), 1-6.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-8>
- Gaines, T.A., Duke, S.O., Morran, S., Rigon, C.A.G., Tranel, P.J., Küpper, A., & Dayan, F.E. (2020). Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 295, 10307–10330. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.013572>
- Gallardo, J. M. (1974). *Anfibios de los alrededores de Buenos Aires*. EUDEBA. Buenos Aires, Argentina.
- Gancedo, B., Alonso-Gómez, A.L., de Pedro, N., Delgado, M.J., & Alonso-Bedate, M. (1997). Changes in thyroid hormone concentrations and total contents through ontogeny in three anuran species: evidence for daily cycles. *General and Comparative Endocrinology*, 107, 240-250. <https://doi.org/10.1006/gcen.1997.6922>
- García, L. Avance de la dependencia agrícola al paquete transgénico altamente tóxico en Paraguay. En: *Con la soja al cuello 2021 Informe sobre Agronegocios en Paraguay*. M. Palau (Ed.). BASE-IS, Asunción, Paraguay.
- García, J., Cantón, R., García, E., Gómez, M., Martínez, L., Rodríguez, C., & Vila, J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Giddings, J.M., Williams, W.M., Solomon, K.R., & Giesy, J.P. (2014). Risks to aquatic organisms from use of chlorpyrifos in the United States. In *Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in Terrestrial and Aquatic Systems in the United States*. Springer, Cham., pp. 119-162
- Githinji, L.J., Musey, M.K., & Ankumah, R.O. (2011). Evaluation of the fate of Ciprofloxacin and Amoxicillin in domestic wastewater. *Water Air and Soil Pollution*, 219, 191–201. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0697-1>
- Geng, Y., Jiang, L., Zhang, D., Liu, B., Zhang, J., Cheng, H., & Liu, X. (2021). Glyphosate, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate ammonium in agricultural groundwater and surface water in China from 2017 to 2018: Occurrence, main drivers, and environmental risk assessment. *Science of The Total Environment*, 769, 144396. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144396>
- Goldfarb, K. C., Karaoz, U., Hanson, C. A., Santee, C. A., Bradford, M. A., Treseder, K. K., Wallenstein, M. D., & Brodie, E. L. (2011). Differential growth responses of soil



- bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance. *Frontiers in Microbiology*, 2, 94. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00094>
- Gomes, M. P., Rocha, D. C., de Brito, J. C. M., Tavares, D. S., Marques, R. Z., Soffiatti, P., & Sant'Anna-Santos, B. F. (2020). Emerging contaminants in water used for maize irrigation: Economic and food safety losses associated with ciprofloxacin and glyphosate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 196, 110549. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110549>
- Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Valdés-Alanís, A., Islas-Flores, H., & Neri-Cruz, N. (2014). Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug and chemical toxicology*, 37(4), 391-399. <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.870191>
- González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., & Fernández-Piñas, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: implications for environmental risk assessment. *Water research*, 47(6), 2050-2064. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.01.020>
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183-190.
- Gottardi, M., Birch, M.R., Dalhoff, K., & Cedergreen, N. (2017). The effects of epoxiconazole and  $\alpha$ -cypermethrin on *Daphnia magna* growth, reproduction, and offspring size. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(8), 2155-2166. <https://doi.org/10.1002/etc.3752>
- Graesser, J., Ramankutty, N., & Coomes, O. T. (2018). Increasing expansion of large-scale crop production onto deforested land in sub-Andean South America. *Environmental Research Letters*, 13(8), 084021. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aad5bf>
- Grau, H. R., Gasparri, N. I., & Aide, T. M. (2005). Agriculture expansion and deforestation in seasonally dry forests of north-west Argentina. *Environmental Conservation*, 32(2), 140-148. <https://doi.org/10.1017/S0376892905002092>
- Green, R. M., & Abdelghani, A. A. (2004). Effects of long-term exposure of the red swamp crawfish *Procambarus clarkii* to a mixture of two herbicides, 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid and monosodium methanearsonate, and associated human health risks. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 1(2), 124-131. <https://doi.org/10.3390/ijerph2004020124>

- Grill, M.F., & Maganti, R.K. (2011). Neurotoxic effects associated with antibiotic use: management considerations. *The British Journal of Clinical Pharmacology*, 72(3), 381-393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.03991.x>
- Gripp, H. S., Freitas, J. S., Almeida, E. A., Bisinoti, M. C., & Moreira, A. B. (2017). Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: Leiuperidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 136, 173-179. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.027>
- Grott, S. C., Israel, N., Lima, D., Bitschinski, D., Abel, G., Alves, T. C., & de Almeida, E. A. (2022). Influence of temperature on growth, development and thyroid metabolism of American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to the herbicide tebuthiuron. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 94, 103910. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103910>
- Guilhermino, L., Lacerda, M. N., Nogueira, A. J. A., & Soares, A. M. V. M. (2000). In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *Science of the Total Environment*, 247(2-3), 137-141. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00485-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00485-4)
- Güngördü, A., Uçkun, M., & Yoloğlu, E. (2016). Integrated assessment of biochemical markers in premetamorphic tadpoles of three amphibian species exposed to glyphosate- and methidathion-based pesticides in single and combination forms. *Chemosphere*, 144, 2024-2035. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.125>
- Gupta, S., Venkatesh, A., Ray, S., & Srivastava, S. (2014). Challenges and prospects for biomarker research: a current perspective from the developing world. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1844(5), 899-908. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.12.020>
- Gürkan, M., & Hayretdağ, S. (2012). Morphological and histological effects of copper sulfate on the larval development of green toad, *Bufo viridis*. *Turkish Journal of Zoology*, 36(2), 231-240. <https://doi.org/10.3906/zoo-0909-18>
- Habdous, M., Vincent-Viry, M., Visvikis, S., & Siest, G. (2002). Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clinica Chimica Acta*, 326, 131-142. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(02\)00329-7](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00329-7)
- Habig, W.H., Pabst, M.J., & Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)

- Hanlon, S. M., & Relyea, R. (2013). Sublethal effects of pesticides on predator–prey interactions in amphibians. *Copeia*, 2013(4), 691-698. <https://doi.org/10.1643/CE-13-019>
- Healy-Fried, M.L., Funke, T., Priestman, M.A., Han, H., & Schönbrunn, E. (2007). Structural Basis of Glyphosate Tolerance Resulting from Mutations of Pro101 in *Escherichia coli* 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 32949–32955. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705624200>
- Hernández, A. F., Gil, F., & Lacasaña, M. (2017). Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. *Archives of Toxicology*, 91, 3211-3223. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2043-5>
- Herraez, M. P., & Zapata, A. G. (1986). Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 12(1-4), 117-126. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(86\)90116-9](https://doi.org/10.1016/0165-2427(86)90116-9)
- Herkovits, J., & Helguero, L. A. (1998). Copper toxicity and copper–zinc interactions in amphibian embryos. *Science of the total environment*, 221(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00184-3](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00184-3)
- Herkovits, J., & Pérez Coll, C. S. (1993). Stage dependent susceptibility of *Bufo arenarum* embryos to cadmium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 608-611. <https://doi.org/10.1007/BF00191253>
- Herkovits, J., & Pérez-Coll, C. S. (2003). AMPHITOX: a customized set of toxicity tests employing amphibian embryos. In *Multiple stressor effects in relation to declining amphibian populations*. ASTM International. <https://doi.org/10.1520/STP11174S>
- Herkovits, J., Perez-Coll, C., & Herkovits, F. D. (2002). Ecotoxicological studies of environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Environmental pollution*, 116(1), 177-183. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00167-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00167-1)
- Hertz-Picciotto, I., Sass, J. B., Engel, S., Bennett, D. H., Bradman, A., Eskenazi, B., & Whyatt, R. (2018). Organophosphate exposures during pregnancy and child neurodevelopment: Recommendations for essential policy reforms. *PLoS medicine*, 15(10), e1002671. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002671>

- Hertzberg, R. C., & MacDonell, M. M. (2002). Synergy and other ineffective mixture risk definitions. *Science of the total environment*, 288(1-2), 31-42. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)01113-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)01113-5)
- Herzine, A., Laugeray, A., Feat, J., Menuet, A., Quesniaux, V., Richard, O., & Mortaud, S. (2016). Perinatal exposure to glufosinate ammonium herbicide impairs neurogenesis and neuroblast migration through cytoskeleton destabilization. *Frontiers in cellular neuroscience*, 10, 191. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00191>
- Heymsfield, S. B., Bethel, R. A., Ansley, J. D., Gibbs, D. M., Felner, J. M., & Nutter, D. O. (1978). Cardiac abnormalities in cachectic patients before and during nutritional repletion. *American heart journal, Amsterdam*, 95(5), 584-594. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(78\)90300-9](https://doi.org/10.1016/0002-8703(78)90300-9)
- Hird, D.W., Diesch, S.L., McKinnell, R.G., Gorham, E., Martin, F.B., Meadows, C.A., Gasiorowski, M. (1983). Enterobacteriaceae and *Aeromonas hydrophila* in Minnesota frogs and tadpoles (*Rana pipiens*). *Applied Environmental Microbiology*, 46(6), 1423-1425. <https://doi.org/10.1128/aem.46.6.1423-1425.1983>
- Holzer, G., & Laudet, V. (2013). Thyroid hormones and postembryonic development in amniotes. *Current Topics in Developmental Biology*, 103, 397-425. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385979-2.00014-9>
- Hopkins, W. A. (2007). Amphibians as models for studying environmental change. *ILAR journal*, 48(3), 270-277. <https://doi.org/10.1093/ilar.48.3.270>
- Howe, C. M., Berrill, M., Pauli, B. D., Helbing, C. C., Werry, K., & Veldhoen, N. (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(8), 1928-1938. <https://doi.org/10.1897/03-71>
- Huang, H., Cai, L., Remo, B.F., & Brown, D.D. (2001). Timing of metamorphosis and the onset of the negative feedback loop between the thyroid gland and the pituitary is controlled by type II iodothyronine deiodinase in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), 7348-7353. <https://doi.org/10.1073/pnas.13119899>
- Hudek, L., Enez, A., & Bräu, L. (2021). Comparative analyses of glyphosate alternative weed management strategies on plant coverage, soil and soil biota. *Sustainability*, 13(20), 11454. <https://doi.org/10.3390/su132011454>

- Huespe, I., Cabagna-Zenklusen, M., Curi, L.M., Peltzer, P., Attademo, M.A., Villafañe, N., & Lajmanovich, R. (2017). Melanomacrófagos hepáticos y actividad de la enzima Glutation S-Transferasa en *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae) como biomarcadores de estrés oxidativo por la exposición a clorpirifos. *Acta biológica Colombiana* 22(2), 234-237. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n2.60823>
- Humason, G. L. (1962). Animal tissue techniques. *Animal tissue techniques*.
- Hutler Wolkowicz, I. R., Aronzon, C. M., & Pérez Coll, C. S. (2013). Lethal and sublethal toxicity of the industrial chemical epichlorohydrin on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) embryos and larvae. *Journal of hazardous materials*, 263, 784-791. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.018>
- Imparato, V., Santos, S. S., Johansen, A., Geisen, S., & Winding, A. (2016). Stimulation of bacteria and protists in rhizosphere of glyphosate-treated barley. *Applied Soil Ecology*, 98, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.09.007>
- Islam, S. S., & Midya, S. (2023). Growth regulatory pattern of zooplankton in herbicide and antibiotic contaminated aquatic ecosystem: an overview. *Watershed Ecology and the Environment*, 5, 153-160 <https://doi.org/10.1016/j.wsee.2023.06.001>
- IUCN. (2023). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>
- Izaguirre, M. F., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Soler, A. P., & Casco, V. H. (2000). Cypermethrin-induced apoptosis in the telencephalon of *Physalaemus biligonigerus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 65(4), 501-507. <https://doi.org/10.1007/s001280000152>
- Janda, J. M., Abbott, S.L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 35–73. <https://doi.org/10.1128/cmr.00039-09>
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology: WJG*, 21(29), 8787. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Jia, B., Liu, Y., Zhu, Y. C., Liu, X., Gao, C., & Shen, J. (2009). Inheritance, fitness cost and mechanism of resistance to tebufenozide in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65(9), 996-1002. <https://doi.org/10.1002/ps.1785>

- Jiménez, R. R., & Sommer, S. (2016). The amphibian microbiome: Natural range of variation, pathogenic dysbiosis, and role in conservation. *Biodiversity and Conservation*, 26, 763–786. <https://doi.org/10.1007/s10531-016-1272-x>
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E. S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., & Pokethitiyook, P. (2003). Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology: An International Journal*, 18(4), 260-267. <https://doi.org/10.1002/tox.10123>
- Johnson, P.T.J., Lunde, K. B., Ritchie, E.G., Reaser, J.K., & Launer, A.E. (2001). Morphological abnormality patterns in a California amphibian community. *Herpetologica* 57, 336–352.
- Jokanović, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166(3), 139-160. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00463-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00463-2)
- Jones, D. P., & Go, Y. M. (2010). Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 12, 116-125. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01266.x>
- Karpuzcu, M. E., & Stringfellow, W. T. (2012). Kinetics of nitrate removal in wetlands receiving agricultural drainage. *Ecological Engineering*, 42, 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.02.015>
- Kim, Y., Nurakhayev, S., Nurkesh, A., Zharkinbekov, Z., & Saparov, A. (2021). Macrophage polarization in cardiac tissue repair following myocardial infarction. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2715. <https://doi.org/10.3390/ijms22052715>
- Kamrin, M.A. (1997). *Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate*. CRC Press, Boca Raton.
- Kivits, T., Broers, H. P., Beeltje, H., van Vliet, M., & Griffioen, J. (2018). Presence and fate of veterinary antibiotics in age-dated groundwater in areas with intensive livestock farming. *Environmental Pollution*, 241, 988-998. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.085>
- Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schreckenberger, P., & Winn, W. (2004). *Diagnóstico Microbiológico*. 5ta ed. Editorial Panamericana S.A. Argentina.
- Koyama, K., Kasuya, Y., Koyama, K., & Goto, K. (1997). Nitric oxide-mediated vasorelaxation induced by sodium polyoxyethylene laurylether sulfate. *Toxicology and applied pharmacology*, 145(2), 294-300. <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8192>

- Kudsk, P., & Mathiassen, S. K. (2004). Joint action of amino acid biosynthesis-inhibiting herbicides. *Weed Research*, 44(4), 313-322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2004.00405.x>
- Kumar, S., Jakhar, K. K., Kapoor, S., & Sharma, A. (2012). Serotyping and antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* isolated from gastrointestinal tract disorders in sheep. *Haryana Vet*, 51, 61-62. <https://doi.org/10.1155/2016/2548517>
- Kunz, P. Y., & Fent, K. (2009). Estrogenic activity of ternary UV filter mixtures in fish (*Pimephales promelas*) An analysis with nonlinear isobolograms. *Toxicology and applied pharmacology*, 234(1), 77-88. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.09.032>
- Kurenbach, B., Hill, A.M., Godsoe, W., van Hamelsveld, S., & Heinemann, J.A. (2018). Agrochemicals and antibiotics in combination increase antibiotic resistance evolution. *Peer J*, 6, e5801 <https://doi.org/10.7717/peerj.5801>
- Kutlesa, N. J., & Caveney, S. (2001). Insecticidal activity of glufosinate through glutamine depletion in a caterpillar. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 57(1), 25-32. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200101\)57:1<25::AID-PS272>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200101)57:1<25::AID-PS272>3.0.CO;2-I)
- Kwet, A., Reichle, S., Silvano, D., Úbeda, C., Baldo, D., & Di Tada, I. (2004). *Rhinella arenarum*. *The International Union for Conservation of Nature. List of Threatened Species*.
- Längin, A., Alexy, R., König, A., & Kümmerer, K. (2009). Deactivation and transformation products in biodegradability testing of  $\beta$ -lactams amoxicillin and piperacillin. *Chemosphere* 75, 347-354. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.032>
- Lajmanovich, R. C. (2000). Interpretación ecológica de una comunidad larvaria de anfibios anuros. *Interciencia*, 25, 71-79.
- Lajmanovich, R. C., & Peltzer, P. M. (2001). Evaluación de la diversidad de anfibios de un remanente forestal del valle aluvial del río Paraná (Entre Ríos-Argentina). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 12(1), 12-16.
- Lajmanovich, R. C., Izaguirre, M. F., & Casco, V. H. (1998). Paraquat tolerance and alteration of internal gill structure of *Scinax nasica* tadpoles (Anura: Hylidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34, 364-369. <https://doi.org/10.1007/s002449900331>

- Lajmanovich, R. C., Emiliani, F., & Peltzer, P. M. (2011). Bacterias coliformesy otras bacterias de interés sanitario en larvas de *Bufo arenarum* Hensel, 1887 (Anura, Bufonidae) en Santa Fe (Argentina). *Alytes* 18, 197-208.
- Lajmanovich, R., Lorenzatti, E., De La Sierra, P., Marino, F. & Peltzer, P. (2002). First records of organochlorine pesticide residues in amphibians of the Mesopotamic Region, Argentina. *Froglog*, 54, 4.
- Lajmanovich, R. C., Sandoval, M. T., & Peltzer, P. (2003). Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed by glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70, 612-618  
<https://doi.org/10.1007/s00128-003-0029-x>
- Lajmanovich, R. C., Cabagna, M., Peltzer, P. M., Stringhini, G. A., & Attademo, A. M. (2005). Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 587(1-2), 67-72.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.08.001>
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Junges, C. M., Attademo, A. M., Sanchez, L. C., & Bassó, A. (2010). Activity levels of B-esterases in the tadpoles of 11 species of frogs in the middle Paraná River floodplain: implication for ecological risk assessment of soybean crops. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), 1517-1524.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.047>
- 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, 681-689.  
<https://doi.org/10.1007/s00244-010-9578-2>
- 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.
- Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., & Basso, A. (2013). Individual and mixture toxicity of commercial formulations containing glyphosate, metsulfuron-methyl, bispyribac-sodium, and picloram on *Rhinella arenarum* tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224, 1-13.  
<https://doi.org/10.1007/s11270-012-1404-1>



- 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., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Martinuzzi, C. S., Simoniello, M. F., Colussi, C. L., & Sigrist, M. (2019). First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Heliyon*, 5(10), e02601 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02601>
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P.M., Cuzziol Boccioni, A.P., & Attademo, A.M. (2021). El ecocidio de los anfibios y sus territorios. En: Con la soja al cuello 2021 Informe sobre Agronegocios en Paraguay. M. Palau (Ed.). BASE-IS, Asunción, Paraguay.
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Lener, G., Boccioni, A. P. C., Peltzer, P. M., Martinuzzi, C. S., & Repetti, M. R. (2022). Glyphosate and glufosinate ammonium, herbicides commonly used on genetically modified crops, and their interaction with microplastics: Ecotoxicity in anuran tadpoles. *Science of The Total Environment*, 804, 150177. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150177>
- Lajmanovich, R. C., Repetti, M. R., Boccioni, A. P. C., Michlig, M. P., Demonte, L., Attademo, A. M., & Peltzer, P. M. (2023). Cocktails of pesticide residues in *Prochilodus lineatus* fish of the Salado River (South America): First record of high concentrations of polar herbicides. *Science of The Total Environment*, 870, 162019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162019>
- Lanctôt, C., Robertson, C., Navarro-Martín, L., Edge, C., Melvin, S. D., Houlahan, J., & Trudeau, V. L. (2013). Effects of the glyphosate-based herbicide Roundup WeatherMax® on metamorphosis of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) in natural wetlands. *Aquatic toxicology*, 140, 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.012>
- Lee, H. J., & Kang, J. H. (2021). Prolonged cognitive dysfunction in patient with splenial lesion of the corpus callosum caused by glufosinate ammonium poisoning. *Turkish Journal of Emergency Medicine*, 21(2), 82-85. <https://doi.org/10.4103/2452-2473.309136>
- Leino, L., Tall, T., Helander, M., Saloniemi, I., Saikkonen, K., Ruuskanen, S., & Puigbò, P. (2020). Classification of the glyphosate target enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-

- phosphate synthase) for assessing sensitivity of organisms to the herbicide. *Journal of Hazardous Materials*, 408, 124556. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124556>
- Levy, S. B., Marshall, B., Schleuderberg, S., Rowse, D., & Davis, J. (1988) High frequency of antibiotic resistance in human faecal flora. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32, 1801–1806. <https://doi.org/10.1128/aac.32.12.1801>
- Li, S., Li, M., Wang, Q., Gui, W., & Zhu, G. (2016). Exposure to butachlor causes thyroid endocrine disruption and promotion of metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Chemosphere*, 152, 158-65. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.098>
- Li, W., Zha, J., Spear, P. A., Li, Z., Yang, L., & Wang, Z. (2009). Changes of thyroid hormone levels and related gene expression in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) during 3-amino-1, 2, 4-triazole exposure and recovery. *Aquatic toxicology*, 92(1), 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.01.006>
- Lima, I. B., Machado, J. R., Machado, J. F. F., & Rivaroli, L. (2020). Effect of exposure to glyphosate based herbicide-roundup original®-and nutritional therapy with folic acid and selenium on cardiac histogenesis of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*, Shaw-1802). *Revista Acta Ambiental Catarinense*, 17(1), 73-85. <https://doi.org/10.24021/raac.v17i1.5336>
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M.E., Erroi, E., & Schettino, T. (2016). Biomonitoring of water and soil quality: a case study of ecotoxicological methodology application to the assessment of reclaimed agroindustrial wastewaters used for irrigation. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 27, 105–112. <https://doi.org/10.1007/s12210-015-0486-2>
- Liu, L., Wu, W., Zhang, J., Lv, P., Xu, L., & Yan, Y. (2018). Progress of research on the toxicology of antibiotic pollution in aquatic organisms. *Acta Ecologica Sinica*, 38, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.01.006>
- Livingstone, D.R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8), 656-666. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00060-1)
- Lopardo, H., Predari, S., & Vay, C. (2016). Manual de microbiología clínica de la asociación argentina de microbiología. Volumen I. Bacterias de Importancia Clínica. Asociación Argentina de Microbiología.

- Lopes, A. T. D. C., de Benvindo-Souza, M., Sotero, D. F., Pedroso, T. M. A., Guerra, V., Vieira, T. B., & de Melo e Silva, D. (2023). The Use of Multiple Biomarkers to Assess the Health of Anuran Amphibians in the Brazilian Cerrado Savanna: An Ecotoxicological Approach. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(11), 2422-2439. <https://doi.org/10.1002/etc.5723>
- Lopez-Cadenas, C., Sierra-Vega, M., Garcia-Vieitez, J. J., Diez-Liéban, M. J., Sahagun-Prieto, A., & Fernandez-Martinez, N. (2013). Enrofloxacin: Pharmacokinetics and metabolism in domestic animal species. *Current drug metabolism*, 14(10), 1042-1058. <https://doi.org/10.2174/1389200214666131118234935>
- López González, E.C., Siroski, P.A., & Poletta, G.L. (2019). Genotoxicity induced by widely used pesticide binary mixtures on *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman). *Chemosphere*, 232, 337-344. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.218>
- López González, E., Larricera, A., Siroski, P. A., & Poletta, G. L. (2017). Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 136, 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.035>
- Lozano, V. L., Defarge, N., Rocque, L. M., Mesnage, R., Hennequin, D., Cassier, R., de Vendômois, J. S., Panoff, J. M., Séralini, G. E., & Amiel, C. (2018). Sex-dependent impact of Roundup on the rat gut microbiome. *Toxicology Reports*, 5, 96-107. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.005>
- Luedtke, J. A., Chanson, J., Neam, K., Hobin, L., Maciel, A. O., Catenazzi, 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>
- Lushchak, V. I., & Bagnyukova, T. V. (2006). Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(1), 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.018>
- Ma, M., Chen, C., Yang, G., Li, Y., Chen, Z., & Qian, Y. (2016). Combined cytotoxic effects of pesticide mixtures present in the Chinese diet on human hepatocarcinoma cell line. *Chemosphere*, 159, 256-266. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.050>
- Madison, J. D., Austin, S., Davis, D. R., & Kerby, J. L. (2018). Bacterial microbiota response in *Graptemys pseudogeographica* to captivity and Roundup® exposure. *Copeia*, 106(4), 580-588. <https://doi.org/10.1643/CH-18-082>

- Makanera, A., Conde, M., Conde, M., Camara, D., & Diakite, T. (2018). A Multi-drug resistance pattern of a *Leclercia adecarboxylata* strain isolated from a urinary tract infection of a patient at China-Guinea friendship hospital of Kipé/Conakry. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 12(4), 1550-1556. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v12i4.3>
- Malafaia, G., Nascimento, Í. F., Estrela, F. N., Guimarães, A. T. B., Ribeiro, F., da Luz, T. M., & de Lima Rodrigues, A. S. (2021). Green toxicology approach involving polylactic acid biomicroplastics and neotropical tadpoles:(Eco) toxicological safety or environmental hazard?. *Science of the Total Environment*, 783, 146994. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146994>
- Mann, R. M., & Bidwell, J. R. (1999). The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 36, 193-199. <https://doi.org/10.1007/s002449900460>
- Mann, R.M., Hyne, R.V., Choung, C.B., Wilson, S.P. (2009). Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*, 157(11), 2903-2927. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.015>
- Marlatt, V. L., Veldhoen, N., Lo, B. P., Bakker, D., Rehaume, V., Vallée, K., & Helbing, C. C. (2013). Triclosan exposure alters postembryonic development in a Pacific tree frog (*Pseudacris regilla*) Amphibian Metamorphosis Assay (TREEMA). *Aquatic toxicology*, 126, 85-94. McDiarmid, R. W., & Altig, R. (Eds.). *Tadpoles: the biology of anuran larvae*. University of Chicago Press.
- Martin, O., Scholze, M., Ermler, S., McPhie, J., Bopp, S. K., Kienzler, A., & Kortenkamp, A. (2021). Ten years of research on synergisms and antagonisms in chemical mixtures: A systematic review and quantitative reappraisal of mixture studies. *Environment international*, 146, 106206. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106206>
- Martino, D., Methol, M., Oleaga, A., Pirelli, H., Rodríguez, L., Vidal, L., & Kindgard, A. (2008). Cambios en el uso de la tierra. GEO Uruguay, pp. 56-117.
- Martinson, J. N., Pinkham, N. V., Peters, G. W., Cho, H., Heng, J., Rauch, M., & Walk, S.T. (2019). Rethinking gut microbiome residency and the Enterobacteriaceae in healthy human adults. *ISME Journal*, 13(9), 2306-2318. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0435-7>
- Martinuzzi, C. S., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Mac Loughlin, T. M., Marino, D. J., & Lajmanovich, R. C. (2020). Comparative toxicity of two different dimethoate

- formulations in the common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 104, 35-40. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02741-8>
- McDiarmid, R. W., & Altig, R. (Eds.). (1999). Tadpoles: the biology of anuran larvae. University of Chicago Press.
- Mesnage, R., Defarge, N., De Vendômois, J. S., & Séralini, G. E. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 133-153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>
- Mesnage, R., & Antoniou, M.N. (2020). Computational modelling provides insight into the effects of glyphosate on the shikimate pathway in the human gut microbiome. *Current Research in Toxicology*, 1, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.crtox.2020.04.001>
- Metcalf, J.L. (1989). Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: history and present status in Europe. *Environmental Pollution*, 60, 101–139. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(89\)90223-6](https://doi.org/10.1016/0269-7491(89)90223-6)
- Meyer, C. J., Norsworthy, J. K., & Kruger, G. R. (2021). Antagonism in mixtures of glufosinate+ glyphosate and glufosinate+ clethodim on grasses. *Weed Technology*, 35(1), 12-21. <https://doi.org/10.1017/wet.2020.49>
- Michelena, R., Eiza, M., & Carfagno, P. (2013). Los suelos, la soja y la agriculturización. Instituto de Suelos CIRN, INTA Castelar.
- Mie, A., Rudén, C., & Grandjean, P. (2018). Safety of safety evaluation of pesticides: developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl. *Environmental Health*, 17(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0421-y>
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., & Ventura, M. (2017). The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews*, 81(4), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/mmb.00036-17>
- MINAGRI. (2020). Anuario Estadístico de Producción Agrícola 2019. Disponible en: <http://sica.minagri.gob.pe/sica/?q=noticias/anuario-estadistico-de-produccion-agricola>. Último acceso: 17/01/2024.
- Miyata, K., & Ose, K. (2012). Thyroid Hormone-disrupting Effects and the Amphibian Metamorphosis Assay. *Journal of Toxicologic Pathology*, 25(1), 1–9. <https://doi.org/10.1293/tox.25.1>

- Murdoch, P. S., Baron, J. S., & Miller, T. L. (2000) Potential Effects of Climate Change on Surface-Water Quality in North America. *Journal of the American Water Resources Association*, 36, 347–366. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.2000.tb04273.x>
- Nagy, K., Duca, R. C., Lovas, S., Creta, M., Scheepers, P. T., Godderis, L., & Ádám, B. (2020). Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. *Environmental Research*, 181, 108926. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108926>
- Navarro-Martín, L., Lanctôt, C., Jackman, P., Park, B. J., Doe, K., Pauli, B. D., & Trudeau, V. L. (2014). Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. I Chronic laboratory exposures to VisionMax®. *Aquatic Toxicology*, 154, 278-290. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.017>
- Newman, M.C. (2014). Fundamentals of ecotoxicology: the science of pollution. CRC press, Boca Ratón, Florida.
- Niedobová, J., Skalský, M., Ouředničková, J., Michalko, R., & Bartošková, A. (2019). Synergistic effects of glyphosate formulation herbicide and tank-mixing adjuvants on Pardosa spiders. *Environmental Pollution*, 249, 338-344. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.031>
- Niewold, T. A. (2007). The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poultry science*, 86(4), 605-609. <https://doi.org/10.1093/ps/86.4.605>
- Nottingham, E. R., & Messer, T. L. (2021). A Literature Review of Wetland Treatment Systems Used to Treat Runoff Mixtures Containing Antibiotics and Pesticides from Urban and Agricultural Landscapes. *Water*, 13(24), 3631. <https://doi.org/10.3390/w13243631>
- Nourouzi, M. M., Chuah, T. G., Choong, T. S., & Lim, C. J. (2011). Glyphosate utilization as the source of carbon: Isolation and identification of new bacteria. *Journal of Chemistry* 8(4), 1582-1587. <https://doi.org/10.1155/2011/614109>
- Ochoa, A. D., & Ochoa, S. A. (2017). Identificación de bacilos no fermentadores y perfiles de sensibilidad, en laboratorios de microbiología de menor complejidad. Servicio integral de Laboratorio, Colegio de Bioquímicos de la provincia de Córdoba, Argentina.
- Oldenkamp, R., Beusen, A. H., & Huijbregts, M. A. (2019). Aquatic risks from human pharmaceuticals—modelling temporal trends of carbamazepine and ciprofloxacin at the

- global scale. *Environmental Research Letters*, 14(3), 034003. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab0071>
- Oliveira, R., McDonough, S., Ladewig, J. C., Soares, A. M., Nogueira, A. J., & Domingues, I. (2013). Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(3), 903-912. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.019>
- OMS (Organización mundial de la salud). (2023). Una sola salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/one-health> (Último acceso 15/06/24).
- Ospino, K., & Spira, B. (2023). Glyphosate affects persistence and tolerance but not antibiotic resistance. *BMC microbiology*, 23(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02804-1>
- Otero, M. A., Grenat, P. R., Pollo, F. E., Baraquet, M., & Martino, A. L. (2023). Effect on growth and development of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles in environment related to fluorite mine. *Science of The Total Environment*, 904, 166936. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166936>
- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S.L., Carrasco, A.E. (2010). Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical Research in Toxicology*, 23(10), 1586–1595. <https://doi.org/10.1021/tx1001749>
- Pal, A., He, Y., Jekel, M., Reinhard, M., & Gin, K. Y. H. (2014). Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environment international*, 71, 46-62. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.025>
- Palau, M. (Ed.). (2021). *Con la soja al cuello 2021: Informe sobre agronegocios en Paraguay*. Base IS.
- Palma, P., Palma, V.L., Fernández, R.M., Bohn, A., Soares, A.M.V.M., & Barbosa, I.R. (2009). Embryo-toxic effects of environmental concentrations of chlorpyrifos in the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72,1714–1718. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.04.026>
- Pampulha, M. E., Ferreira, M. A. S. S., & Oliveira, A. (2007). Effects of a phosphinothricin based herbicide on selected groups of soil microorganisms. *Journal of Basic Microbiology*, 47(4), 325–331. <https://doi.org/10.1002/jobm.200610274>

- Panthi, S., Sapkota, A. R., Raspanti, G., Allard, S. M., Bui, A., Craddock, H. A., Murray, R., Zhu, L., East, C., Handy, E. (2019). Pharmaceuticals, herbicides, and disinfectants in agricultural water sources. *Environmental Research*, *174*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.04.011>
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, *18*(4), 657-686. <https://doi.org/10.1128/cmr.18.4.657-686.2005>
- Paruelo, J. M., & Sierra, M. (2023). Sustainable intensification and ecosystem services: how to connect them in agricultural systems of southern South America. *Journal of Environmental Studies and Sciences*, *13*(1), 198-206. <https://doi.org/10.1007/s13412-022-00791-9>
- Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman Jr, C. U., & Mohan, D. (2019). Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: chemistry, occurrence, effects, and removal methods. *Chemical reviews*, *119*(6), 3510-3673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>
- Pattison, A. B., McBeath, A. V., Masters, B., & Dennis, P. G. (2024). Direct and indirect effects of Basta®, a glufosinate-based herbicide, on banana plantation soil microbial diversity and function. *Applied Soil Ecology*, *195*, 105225. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.105225>
- Pehrsson, E. C., Tsukayama, P., Patel, S., Mejía-Bautista, M., Sosa-Soto, G., Navarrete, K. M., Calderon, M., Cabrera, L., Hoyos-Arango, W., Bertoli, M. T., Berg, D. E., Gilman, R. H., & Dantas, G. (2016). Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. *Nature* *533*, 212–216. <https://doi.org/10.1038/nature17672>
- Peillex, C., & Pelletier, M. (2020). The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *Journal of Immunotoxicology*, *17*(1), 163-174. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2020.1804492>
- Peltzer, P. M., Ponsa, M. L., Lajmanovich, R. C. (2001). Caso de malformación en *Leptodactylus mystacinus* (Anura: Leptodactylidae). *Natura Neotropicalis*. *32*(2), 173-176.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., & Beltzer, A.H. (2003). The effects of habitat fragmentation on amphibian species richness in the floodplain of the middle Paraná River. *Herpetological Journal*, *13*, 95–98.



- Peltzer, P. M. (2006). *La fragmentación de hábitat y su influencia en la diversidad y distribución de anfibios anuros de áreas ecotonales de los dominios fitogeográficos amazónico y chaqueño*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., & Beltzer, A. H. (2006). Diversity of anurans across agricultural ponds in Argentina. *Marine, Freshwater, and Wetlands Biodiversity Conservation*, 131-145. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5734-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5734-2_10)
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Sánchez-Hernandez, J. C., Cabagna, M. C., Attademo, A. M., & Bassó, A. (2008). Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(1), 185-197. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.06.005>
- Peltzer, P. M., Junges, C. M., Attademo, A. M., Bassó, A., Grenón, P., & Lajmanovich, R. C. (2013). Cholinesterase activities and behavioral changes in *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) tadpoles exposed to glufosinate ammonium herbicide. *Ecotoxicology*, 22, 1165-1173. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1103-8>
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Teglia, C.M., Martinuzzi, C., & Goicoechea, H.C. (2017). Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 51, 114-123. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.01.021>
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Martinuzzi, C., Attademo, A. M., Curi, L.M., & Sandoval, T. (2019). Biototoxicity of diclofenac on two larval anuran amphibians: assessment of development, growth, cardiac function and rhythm, behavior and antioxidant system. *Science of Total Environment*, 683, 624-637. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.275>
- Peltzer, P. M., Cuzziol Boccioni, A. P., Martinuzzi, C. S., Bassó, A., Attademo, A. M., Culzoni, M. J., Paradina-Fernandez, L., & Lajmanovich R. C. (2023). Chapter 5: Ecotoxicity and Risk Assessment Characterization of Veterinary Pharmaceuticals on Anuran Amphibian Larvae. En: *Amphibian Species in Environmental Risk Assessment Strategies*. Larramendy, M. L., Liwszyc. G. E. (Eds). The Royal Society Chemistry.
- Peltzer, P. M., Cuzziol Boccioni, A. P., Attademo, A. M., Simoniello, M. F., Lener, G., & Lajmanovich, R. C. (2024). Ecotoxicological Characterization of Lithium as a “Timebomb” in Aquatic Systems: Tadpoles of the South American Toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) as Model Organisms. *Toxics*, 12(3), 176. <https://doi.org/10.3390/toxics12030176>

- Peluso, M. L., & Carriquiriborde, P. (2021). Bioensayos de toxicidad. *Libros de Cátedra*.
- Peluso, J., Furió Lanuza, A., Pérez Coll, C. S., & Aronzon, C. M. (2022). Synergistic effects of glyphosate-and 2, 4-D-based pesticides mixtures on *Rhinella arenarum* larvae. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(10), 14443-14452. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16784-0>
- Pereyra, M. O., Vera Candiotti, M. F., Faivovich, J., & Baldo, J. D. (2015). Egg clutch structure of *Rhinella rumbolli* (Anura: Bufonidae), a toad from the Yungas of Argentina, with a review of the reproductive diversity in *Rhinella*.
- Pérez, D. J., Iturburu, F. G., Calderon, G., Oyesqui, L. A., De Gerónimo, E., & Aparicio, V. C. (2021). Ecological risk assessment of current-use pesticides and biocides in soils, sediments and surface water of a mixed land-use basin of the Pampas region, Argentina. *Chemosphere*, 263, 128061. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128061>
- Pérez-Coll, C. S., Herkovits, J., & Salibián, A. (1988). Embryotoxicity of lead on *Bufo arenarum*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(2), 247-252 <https://doi.org/10.1007/BF01705438>
- Pérez Coll, C. P., Aronzon, C. M., Svartz, G. V. (2017). Developmental stages of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) in toxicity studies: AMPHITOX, a customized laboratory assay. *Ecotoxicology and Genotoxicology*. The Royal Society of Chemistry.
- Pérez Iglesias, J.M. (2018). Empleo de anuros autóctonos como herramienta bioanalítica de respuesta temprana a la exposición de herbicidas utilizados en agroecosistemas pampeanos. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata.
- Pérez-Iglesias, J. M., de Arcaute, C. R., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G. S., & Larramendy, M. L. (2014). The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 104, 120-126. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.002>
- Pérez-Iglesias, J. M., Soloneski, S., Nikoloff, N., Natale, G. S., & Larramendy, M. L. (2015). Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 119, 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.045>

- Pérez-Iglesias, J. M., Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., de Oliveira, C., & Natale, G. S. (2016). Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research* 23(10), 9852-9861. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6153-z>
- Pérez-Iglesias, J. M., Ruiz de Arcaute, C., Natale, G. S., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2017). Evaluation of imazethapyr-induced DNA oxidative damage by alkaline Endo III- and Fpg-modified single-cell gel electrophoresis assay in *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 503–508. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.054>
- Pérez-Iglesias, J. M., Franco-Belussi, L., Natale, G. S., & de Oliveira, C. (2019). Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environmental pollution*, 244, 733-746. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.073>
- Pérez-Iglesias, J. M., Brodeur, J. C., Larramendy, M. L. (2020) An imazethapyr-based herbicide formulation induces genotoxic, biochemical, and individual organizational effects in *Leptodactylus latinasus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Science and Pollution Research* 27(2), 2131-2143. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06880-7>
- Perkins, P. J., Boermans, H. J., & Stephenson, G. R. (2000). Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus*. *Environmental Toxicology Chemistry*, 19, 940–945 <https://doi.org/10.1002/etc.5620190422>
- Picó, Y., Alvarez-Ruiz, R., Alfarhan, A. H., El-Sheikh, M. A., Alshahrani, H. O., & Barceló, D., (2020). Pharmaceuticals, pesticides, personal care products and microplastics contamination assessment of Al-Hassa irrigation network (Saudi Arabia) and its shallow lakes. *Science of Total Environment*, 701, 135021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135021>
- Pindling, S., Azulai, D., Zheng, B., Dahan, D., & Perron, G. G. (2017). Dysbiosis and early mortality in zebrafish larvae exposed to subclinical concentrations of streptomycin. *FEMS Microbiology Letter*, 365(18), fny188. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny188>

- Plhalova, L., Zivna, D., Bartoskova, M., Blahova, J., Sevcikova, M., Skoric, M., Marsalek, P., Stancova, V., & Svobodova, Z. (2014). The effects of subchronic exposure to ciprofloxacin on zebrafish (*Danio rerio*). *Neuro Endocrinology Letters*, 35(2), 64-70
- Pomati, F., Orlandi, C., Clerici, M., Luciani, F., & Zuccato, E. (2008). Effects and interactions in an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals. *Toxicological sciences*, 102(1), 129-137. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm291>
- Pontius, F.W. (2021). Emerging Contaminants in Water: Detection, Treatment, and Regulation. *Water*, 13, 1470. <https://doi.org/10.3390/w13111470>
- Pop, M., Paulson, J. N., Chakraborty, S., Astrovskaya, I., Lindsay, B. R., Li, S., & Stine, O. C. (2016). Individual-specific changes in the human gut microbiota after challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* and subsequent ciprofloxacin treatment. *BMC Genomics* 17(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2777-0>
- Puigbò, P., Leino, L. I., Rainio, M. J., Saikkonen, K., Saloniemi, I., & Helander, M. (2022). Does glyphosate affect the human microbiota?. *Life*, 12(5), 707. <https://doi.org/10.3390/life12050707>
- Qin, P., & Liu, R. (2013). Oxidative stress response of two fluoroquinolones with catalase and erythrocytes: a combined molecular and cellular study. *Journal of hazardous materials*, 252, 321-329. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.03.006>
- Quinn, J. P. (2018). Interactions of the herbicides glyphosate and glufosinate (phosphinothricin) with the soil microflora. *Pesticide interactions in crop production*, pp. 245-265.
- Raices, M. (2018). Comunicación química en larvas de *Rhinella arenarum*. Caracterización del comportamiento antipredatorio y de las señales de alarma. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Radjenović, J., Petrović, M., & Barceló, D. (2009). Complementary mass spectrometry and bioassays for evaluating pharmaceutical-transformation products in treatment of drinking water and wastewater. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(5), 562-580. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.02.006>
- Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2011). Mixtures of environmental pollutants: effects on microorganisms and their activities in soils. En: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volumen 211, Springer, New York.

- Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in microbiology*, 22(8), 438-445. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>
- Relyea, R. A. (2005). The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological applications*, 15(4), 1118-1124. <https://doi.org/10.1890/04-1291>
- Relyea, R. A., & Jones, D. K. (2009). The toxicity of Roundup Original Max to 13 species of larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9), 2004-2008. <https://doi.org/10.1897/09-021.1>
- Rodríguez-Mozaz, S., Serra-Compte, A., Gil-Solsona, R., & Álvarez-Muñoz, D. (2020). Environmental metabolomics and xenometabolomics for the assessment of exposure to contaminant mixtures. En: *Environmental Metabolomic*, Elsevier.
- Roy, N. M., Ochs, J., Zambrzycka, E., & Anderson, A. (2016). Glyphosate induces cardiovascular toxicity in *Danio rerio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 46, 292-300. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.08.010>
- Ruiz de Arcaute, C., Brodeur, J. C., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2020). Toxicity to *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura, Bufonidae) of herbicide mixtures commonly used to treat fallow containing resistant weeds: glyphosate–dicamba and glyphosate–flurochloridone. *Chemosphere*, 245, 125623. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125623>
- Rustom, S. Y., Webster, E. P., Blouin, D. C., & McKnight, B. M. (2019). Interactions of quizalofop-p-ethyl mixed with contact herbicides in ACCase-resistant rice production. *Weed Technology*, 33(2), 233-238. <https://doi.org/10.1017/wet.2018.116>
- Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Folador, A., Skovronski, V. J., do Amaral, A. M. B., Leitemperger, J., Costa, M. D., Hartmann, P. A., Müller, C., Loro, V. L., & Hartmann, M. T. (2020). Morphological and biochemical traits and mortality in *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles exposed to the insecticide chlorpyrifos. *Chemosphere*, 250, 126162. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126162>
- Rutkoski, C. F., Grott, S. C., Israel, N. G., Carneiro, F. E., de Campos Guerreiro, F., Santos, S., & de Almeida, E. A. (2022). Hepatic and blood alterations in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to sulfamethoxazole and oxytetracycline. *Chemosphere*, 307, 136215. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136215>

- Saborío Cervantes, I. E., Mora Valverde, M., & Durán Monge, M. D. P. (2019). Intoxicación por organofosforados. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 110-117.
- Saccol, S. D. S. A., Bolzan, A. M. R., & dos Santos, T. G. (2017). In the shadow of trees: does eucalyptus afforestation reduce herpetofaunal diversity in Southern Brazil? *South American Journal of Herpetology*, 12(1), 42-56. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-16-00028.1>
- Salibián, A. (1992). Effects of deltamethrin on the South American toad, *Bufo arenarum*, tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(4), 616-621. <https://doi.org/10.5555/19930513710>
- Salgado Costa, C., Bahl, F., Natale, G. S., Mac Loughlin, T. M., Marino, D. J. G., Venturino, A., & Santos, L. H. M. L. M. (2023). First evidence of environmental bioaccumulation of pharmaceuticals on adult native anurans (*Rhinella arenarum*) from Argentina. *Environmental Pollution*, 334, 122231. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122231>
- Sanchez, L. C., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Manzano, A. S., Junges, C. M., & Attademo, A. M. (2013). Reproductive activity of anurans in a dominant agricultural landscape from central-eastern Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(3), 912-926. <https://doi.org/10.7550/rmb.32842>
- Sanchez, L. C., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P., Manzano, A. S., Junges, C. M., & Attademo, A. M. (2014). First evidence of the effects of agricultural activities on gonadal form and function in *Rhinella fernandezae* and *Dendropsophus sanborni* (Amphibia: Anura) from Entre Ríos Province, Argentina. *Acta Herpetológica*, 2014, 75-88. [https://doi.org/10.13128/Acta\\_Herpetol-13759](https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-13759)
- Sanchez-Hernandez, J. C. (2007). Ecotoxicological perspectives of B-esterases in the assessment of pesticide contamination. En: *Environmental pollution: new research*. Nova Science Publishers.
- Sandoval, M. T., Gaona, R., Curi, L. M., Abreliano, F., Lajmanovich, R. C., & Peltzer, P. M. (2022). Anuran heart development and critical developmental periods: A comparative analysis of three neotropical anuran species. *The Anatomical Record*, 305(12), 3441-3455. <https://doi.org/10.1002/ar.24933>
- Sansiñena, J. A. (2020). Estudio de calidad ambiental con larvas de anfibios como bioindicadores. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata.

- Sansiñena, J. A., Peluso, L., Costa, C. S., Demetrio, P. M., Mac Loughlin, T. M., Marino, D. J., & 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, M. J., Morgado, R., Ferreira, N. G. C., Soares, A. M., & Loureiro, S. (2011). Evaluation of the joint effect of glyphosate and dimethoate using a small-scale terrestrial ecosystem. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(7), 1994-2001. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.06.003>
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5), 725-759. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>
- Sasal, M. C., Wilson, M. G., Sione, S. M., Beghetto, S. M., Gabioud, E. A., Oszust, J. D., & Schulz, G. A. (2017). Monitoring of glyphosate in surface waters in Entre Rios: participatory action research as a methodological approach. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 43(2), 195-205. <https://doi.org/10.5555/20173313653>
- Sayed, A. H., & Younes, H. A. (2017). Melanomacrophage centers in *Clarias gariepinus* as an immunological biomarker for toxicity of silver nanoparticles. *Journal of microscopy and ultrastructure*, 5(2), 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2016.07.003>
- Screpanti, C., Accinelli, C., Vicari, A., & Catizone, P. (2005). Glyphosate and glufosinate-ammonium runoff from a corn-growing area in Italy. *Agronomy for sustainable development*, 25(3), 407-412. <https://doi.org/10.1051/agro:2005031>
- Scursoni, J. A., Vera, A. C. D., Oreja, F. H., Kruk, B. C., & de la Fuente, E. B. (2019). Weed management practices in Argentina crops. *Weed Technology* 33, 459-463. <https://doi.org/10.1017/wet.2019.26>
- Searcy, B.T., Beckstrom-Sternberg, S.M., Beckstrom-Sternberg, J.S., Stafford, P., Schwendiman, A.L., Soto-Pena, J., & Helbing, C.C. (2012). Thyroid hormone-dependent development in *Xenopus laevis*: a sensitive screen of thyroid hormone signaling disruption by municipal wastewater treatment plant effluent. *General and Comparative Endocrinology*, 176(3), 481-492. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.12.036>

- Shehata, A. A., Schrödl, W., Aldin, A. A., Hafez, H. M., & Krüger, M. (2013). The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Current microbiology*, *66*, 350-358. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0277-2>
- Siddiqui, M.A., & Naqvi, S.N.H. (2010). Evaluation of the teratogenic potentials of ciprofloxacin in albino rat. *Journal of Morphology*, *27*(1), 14–18.
- Simoniello, M. F., Kleinsorge, E. C., Scagnetti, J. A., Grigolato, R. A., Poletta, G. L., & Carballo, M. A. (2008). DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. *Journal of Applied Toxicology*, *28*(8), 957-965. <https://doi.org/10.1002/jat.1361>
- Siyum, Z. G. (2020). Tropical dry forest dynamics in the context of climate change: syntheses of drivers, gaps, and management perspectives. *Ecological processes*, *9*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13717-020-00229-6>
- Skwor, T., Shinko, J., Augustyniak, A., Gee, C., Andraso, G. (2014). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* predominate among potentially pathogenic ciprofloxacin-and tetracycline-resistant *Aeromonas* isolates from Lake Erie. *Applied Environmental Microbiology*, *280*(3), 841-848. <https://doi.org/10.1128/AEM.03645-13>
- Solomon, K., & Thompson, D. (2003). Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B*, *6*(3), 289-324. <https://doi.org/10.1080/10937400306468>
- Sørensen, H., Cedergreen, N., Skovgaard, I. M., & Streibig, J. C. (2007). An isobole-based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. *Environmental and Ecological Statistics*, *14*, 383-397. <https://doi.org/10.1007/s10651-007-0022-3>
- Soso, A. B., Barcellos, L. J. G., Ranzani-Paiva, M. J., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., Anziliero, D., & Finco, J. A. (2007). Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *23*(3), 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.11.008>
- Sotelo, M. I., Bingman, V. P., Muzio, R. N. (2019). The mating call of the terrestrial toad, *Rhinella arenarum*, as a cue for spatial orientation and its associated brain activity. *Brain, Behavior and Evolution*, *94*, 7-17. <https://doi.org/10.1159/000504122>



- Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A., & Krest, S.K. (2010). *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. SETAC Books.
- Steinel, N. C., & Bolnick, D. I. (2017). Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in immunology*, 8, 283198. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00827>
- Suk, W. A., Olden, K., & Yang, R. S. (2002). Chemical mixtures research: significance and future perspectives. *Environmental Health Perspectives*, 110(6), 891-892. <https://doi.org/10.1289/ehp.110-1241268>
- Sun, J., Jin, L., He, T., Wei, Z., Liu, X., Zhu, L., & Li, X. (2020). Antibiotic resistance genes (ARGs) in agricultural soils from the Yangtze River Delta, China. *Science of The Total Environment*, 740, 140001. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140001>
- Suppa, A, Kvist, J., Li, X., Dhandapani, V., Almulla, H., Tian, A.Y., Kissane, S., Zhou, J., Perotti, A., Mangelson, H., Langford, K., Rossi, V., Brown, J.B., & Orsini, L. (2020). Roundup causes embryonic development failure and alters metabolic pathways and gut microbiota functionality in non-target species. *Microbiome*, 8(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00943-5>
- Suter, P., & Sachsse, K. (1986). Combined chronic toxicity/oncogenicity study in the rat. *Dietary administration. Research and Consulting Company AG Report, 18505*.
- Svartz, G. V., & Pérez–Coll, C. S. (2013). Comparative toxicity of cypermethrin and a commercial formulation on *Rhinella arenarum* larval development (Anura: Bufonidae). *International Journal of Environment and Health*, 6(4), 320-329. <https://doi.org/10.1504/IJENVH.2013.056973>
- Svartz, G.V., Herkovits, J., & Pérez-Coll, C.S. (2012). Sublethal effects of atrazine on embryo-larval development of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology* 21(4), 1251-1259. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0880-9>
- Svartz, G. V., Aronzon, C. M., & Pérez Coll, C. S. (2016). Combined endosulfan and cypermethrin-induced toxicity to embryo–larval development of *Rhinella arenarum*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 79(5), 197-209. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1126211>
- Sviridov, A. V., Shushkova, T. V., Ermakova, I. T., Ivanova, E. V., Epiktetov, D. O., Leontievsky, A. A. (2015). Microbial degradation of glyphosate herbicides. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(2), 188-195. <https://doi.org/10.1134/S0003683815020209>

- Takano, H. K., Beffa, R., Preston, C., Westra, P., & Dayan, F. E. (2020). A novel insight into the mode of action of glufosinate: how reactive oxygen species are formed. *Photosynthesis research*, 144(3), 361-372. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00749-4>
- Tamburini, S., Shen, N., Wu, H. C., & Clemente, J. C. (2016). The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nature medicine*, 22(7), 713-722. <https://doi.org/10.1038/nm.4142>
- Tang, T., Chen, G., Liu, F., Bu, C., Liu, L., & Zhao, X. (2019). Effects of transgenic glufosinate-tolerant rapeseed (*Brassica napus* L.) and the associated herbicide application on rhizospheric bacterial communities. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 106, 246-252. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2019.03.004>
- R.P. Tasho, & Cho, J.Y. (2016). Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: a review. *Science of Total Environment*, 563–564, 366-376. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.140>
- Tata, J. R. (1998). Amphibian metamorphosis as a model for studying the developmental actions of thyroid hormone. *Cell Research*, 8(4), 259-272. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(99\)80082-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(99)80082-0)
- Teglia, C. M., Perez, F. A., Michlig, N., Repetti, M. R., Goicoechea, H. C., & Culzoni, M. (2019). Occurrence, distribution, and ecological risk of fluoroquinolones in rivers and wastewaters, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38, 2305–2313. <https://doi.org/10.1002/etc.4532>
- Thambirajah, A.A., Koide, E.M., Imbery, J.J., & Helbing, C.C. (2019). Contaminant and Environmental Influences on Thyroid Hormone Action in Amphibian Metamorphosis. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 276. <https://doi.org/10.1897/04-105R.1>
- Tietge, J. E., Holcombe, G. W., Flynn, K. M., Kosian, P. A., Korte, J. J., Anderson, L. E., & Degitz, S. J. (2005). Metamorphic inhibition of *Xenopus laevis* by sodium perchlorate: effects on development and thyroid histology. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(4), 926-933. <https://doi.org/10.1897/04-105R.1>
- Tong, Q., Cui, L. Y., Hu, Z. F., Du, X. P., Abid, H. M., & Wang, H.B. (2020). Environmental and host factors shaping the gut microbiota diversity of brown frog *Rana dybowskii*. *Science of Total Environment*, 741, 140142. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140142>

- Tong, S., Zhang, P., Cheng, Q., Chen, M., Chen, X., Wang, Z., & Wu, H. (2022). The role of gut microbiota in gout: Is gut microbiota a potential target for gout treatment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 1051682. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1051682>
- Torremorell, A., Hegoburu, C., Brandimarte, A. L., Rodrigues, E. H. C., Pompêo, M., da Silva, S. C., Navarro, E. (2021). Current and future threats for ecological quality management of South American freshwater ecosystems. *Inland Waters*, *11*(2), 125–140. <https://doi.org/10.1080/20442041.2019.1608115>
- Tran, J. H., Jacoby, G.A., & Hooper, D. C. (2005). Interaction of the plasmid encoded quinolone resistance protein Qnr with Escherichia coli DNA gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*, 118-125. <https://doi.org/10.1128/aac.49.1.118-125.2005>
- Tripathi, A., & Srivastava, U.C. (2008). Acetylcholinesterase: a Versatile Enzyme of Nervous System. *Annals of Neurosciences*, *15*(4), 106–111. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.2008.150403>
- Tu, H.T., Silvestre, F., Scippo, M.L., Thome, J.P., Phuong, N.T., & Kestemont, P. (2009). Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *72*(5), 1463-1470. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.04.008>
- Urrutia, 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. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.039>
- Vaira, M., Akmentins, M., Attademo, A. M., Baldo, J. D., Barrasso, D. A., Barrionuevo, S., Basso, N., Blotto, B., Cairo, S., Cajade, R., Céspedes, J., Corbalán, V., Chilote, P., Duré, M., Falcione, C., Ferraro, D., Gutierrez, F. R., Ingaramo, M. R., Junges, C., Lajmanovich, R., Lescano, J. N., Marangoni, F., Martinazzo, L., Marti, R., Moreno, L., Natale, G. S., Pérez Iglesias, J. M., Peltzer, P., Quiroga, L., Rosset, S., Sanabria, E., Sanchez, L., Schaefer, E., Úbeda, C., & Zaracho, V. (2012). Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de herpetología*, *26*, 131–159
- van Bruggen, A. H. C., Finckh, M. R., He, M., Ritsema, C. J., Harkes, P., Knuth, D., & Geissen, V. (2021). Indirect effects of the herbicide glyphosate on plant, animal and human health

- through its effects on microbial communities. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 464. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.763917>
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Van Eerd, L. L., Hoagland, R. E., Zablutowicz, R. M., & Hall, J. C. (2003). Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Science*, 51, 472-495. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2003\)051\[0472:PMIPAM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2003)051[0472:PMIPAM]2.0.CO;2)
- Van Wyk, J. H. (2013). Thyroid-disrupting activity in the South African aquatic environment. *Cape Town: Stellenbosch University*.
- Vandenberg, L.N., Stevenson, C., & Levin, M. (2012). Low frequency vibrations induce malformations in two aquatic species in a frequency-, waveform-, and direction-specific manner. *Plos One*, 7(12), e51473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051473>
- Vanithakumari, G., & Priyadarshin, K. M. (2013). Ciprofloxacin induced hormonal changes in the thyroid gland of rats and Anti-oxidant vitamin A, C and E as rescue agents. *JPBS*, 5(3), 12-18. <https://doi.org/10.9790/3008-0531218>
- 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. *Biomarkers*, 8, 167-186. <https://doi.org/10.1080/1354700031000120116>
- Verzeñassi, D., Vallini, A., Fernández, F., Ferrazini, L., Lasagna, M., Sosa, A. J., & Hough, G. E. (2023). Cancer incidence and death rates in Argentine rural towns surrounded by pesticide-treated agricultural land. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 20, 101239. <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2023.101239>
- Villarreal-Chiu, J. F., Acosta-Cortés, A. G., Kumar, S., & Kaushik, G. (2017). Biological limitations on glyphosate biodegradation. *Green technologies and environmental sustainability*, 179-201. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-50654-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-50654-8_8)
- Villatoro-Castañeda, M., Forsburg, Z. R., Ortiz, W., Fritts, S. R., Gabor, C. R., & Carlos-Shanley, C. (2023). Exposure to Roundup and Antibiotics Alters Gut Microbial Communities, Growth, and Behavior in *Rana berlandieri* Tadpoles. *Biology*, 12(9), 1171. <https://doi.org/10.3390/biology12091171>

- Wada, H. (2008). Glucocorticoids: mediators of vertebrate ontogenetic transitions. *General and comparative endocrinology*, 156(3), 441-453.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.02.004>
- Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., Peakall, D. B. (2006). Principles of Exotoxicology, Third Edition, CRC Press, Boca Ratón, 321 pp.
- Wagner, N., Müller, H., & Viertel, B. (2017). Effects of a commonly used glyphosate-based herbicide formulation on early developmental stages of two anuran species. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 1495-1508.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-7927-z>
- Walsh, L., Hill, C., & Ross, R. P. (2023). Impact of glyphosate (Roundup™) on the composition and functionality of the gut microbiome. *Gut microbes*, 15(2), 2263935.  
<https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2263935>
- Wang, H., Che, B., Duan, A., Mao, J., Dahlgren, R. A., Zhang, M., & Wang, X. (2014). Toxicity evaluation of  $\beta$ -diketone antibiotics on the development of embryo-larval zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology*, 29(10), 1134-1146.  
<https://doi.org/10.1002/tox.21843>
- Wang, Y., Chen, C., Qian, Y., Zhao, X., & Wang, Q. (2015). Ternary toxicological interactions of insecticides, herbicides, and a heavy metal on the earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of Hazardous Materials*, 284, 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.11.017>
- Wang, F., Chen, X., Yang, D., Yang, J., Kang, G., Zhao, B., Li, X., Pu, Y., Zheng, N., Dong, W. (2016). Toxic effects of glufosinate-ammonium on zebrafish embryos and larvae. *Chinese Journal of Pesticide Science* 18(3), 323-329.  
<https://doi.org/10.16801/j.issn.1008-7303.2016.0044>
- Watanabe, T., & Iwase, T. (1996). Developmental and dysmorphogenic effects of glufosinate ammonium on mouse embryos in culture. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 16(6), 287-299. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6866\(1996\)16:6<287::AID-TCM1>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6866(1996)16:6<287::AID-TCM1>3.0.CO;2-E)
- Watkinson, A., Murby, E., Kolpin, D.W., & Costanzo, S.D. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. *Science of Total Environment*, 407, 2711–2723. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.059>

- Wehtje, G., Altland, J. E., Gilliam, C. H. (2008). Interaction of glyphosate and diquat in ready-to-use weed control products. *Weed Technology*, 22, 472–476 <https://doi.org/10.1614/WT-07-181.1>
- Weigel, L. M., Steward, C. D., Tenover, F.C. (1998). *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(10), 2661-2667. <https://doi.org/10.1128/aac.42.10.2661>
- Wells K. D. (2007). *The ecology and behavior of Amphibians*. – Chicago University. Press.
- Wilkins, A. L., Valgas, A. A., & Oliveira, G. T. (2019). Effects of ecologically relevant concentrations of Boral® 500 SC, Glifosato® Biocarb, and a blend of both herbicides on markers of metabolism, stress, and nutritional condition factors in bullfrog tadpoles. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 23242-23256 <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05533-z>
- Xie, L., Zhang, Y., Gao, J., Li, X., & Wang, H. (2020) Nitrate exposure induces intestinal microbiota dysbiosis and metabolism disorder in *Bufo gargarizans* tadpoles. *Environmental Pollution*, 264, 114712. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114712>
- Xu, S., Liu, Y., Zhang, J., & Gao, B. (2021). Proteomic mechanisms for the combined stimulatory effects of glyphosate and antibiotic contaminants on *Microcystis aeruginosa*. *Chemosphere*, 267, 129244. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129244>
- Yan, X., Zhang, Z., Chen, L., Jiao, C., Zhu, K., Guo, J., & Shen, Z. (2022). Pesticide fate at watershed scale: A new framework integrating multimedia behavior with hydrological processes. *Journal of Environmental Management*, 319, 115758. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115758>
- Yang, H. Y., Nam, Y. S., & Lee, H. J. (2014). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among ciprofloxacin-nonsusceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures in Korea. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 25, 163-169. <https://doi.org/10.1155/2014/329541>
- Yang, X., Song, Y., Zhang, C., Pang, Y., Song, X., Wu, M., & Cheng, Y. (2019). Effects of the glyphosate-based herbicide roundup on the survival, immune response, digestive activities and gut microbiota of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Aquatic Toxicology*, 214, 105243. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105243>

- Yehia, H. M. (2013). Antimicrobial resistance patterns of Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae isolated from poultry intestinal. *Life Science Journal*, *10*, 3438-3446. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00268.x>.
- Yeon, S., Kim, S. H., Sim, J., Kim, S., Lee, Y., Kim, H., & Cha, Y. S. (2022). Major component causing neurological toxicity in acute glufosinate ammonium poisoning: determination of glufosinate, 1-methoxy-2-propanol, and ammonia in serum and cerebrospinal fluid. *Clinical Toxicology*, *60*(3), 286-292. <https://doi.org/10.1080/15563650.2021.1952215>
- Yin, X., Jiang, S., Yu, J., Zhu, G., Wu, H., & Mao, C. (2014). Effects of spirotetramat on the acute toxicity, oxidative stress, and lipid peroxidation in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) tadpoles. *Environmental toxicology and pharmacology*, *37*(3), 1229-1235. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.04.016>
- Yoshida, J., Tei, G., Mochizuki, C., Masu, Y., Koda, S., & Kumagai, S. (2009). Use of a closed system device to reduce occupational contamination and exposure to antineoplastic drugs in the hospital work environment. *Annals of occupational hygiene*, *53*(2), 153-160. <https://doi.org/10.1093/annhyg/men081>
- Yslas, E. I., Ibarra, L. E., Peralta, D. O., Barbero, C. A., Rivarola, V. A., & Bertuzzi, M. L. (2012). Polyaniline nanofibers: Acute toxicity and teratogenic effect on *Rhinella arenarum* embryos. *Chemosphere*, *87*(11), 1374-1380. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.033>
- Yslas, E. I. (2016). Nanomaterials toxicity and teratogenicity in aquatic environment using *Rhinella arenarum* model. *Toxicology Letters*, *259*, S64.
- Yu, Q., & Powles, S. (2014). Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production. *Plant physiology*, *166*(3), 1106-1118. <https://doi.org/10.1104/pp.114.242750>
- Yusoff, S. N. M., Kamari, A., & Aljafree, N. F. A. (2016). A review of materials used as carrier agents in pesticide formulations. *International journal of environmental science and technology*, *13*, 2977-2994. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1096-y>
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical analysis*. Pearson Education India.
- Zhang, J., Hamill, A. S., & Weaver, S. E. (1995). Antagonism and synergism between herbicides: trends from previous studies. *Weed technology*, *9*(1), 86-90. <https://doi.org/10.1017/S0890037X00023009>

- Zhang, L., Nichols, R. G., Correll, J., Murray, I. A., Tanaka, N., Smith, P. B., & Patterson, A. D. (2015). Persistent organic pollutants modify gut microbiota–host metabolic homeostasis in mice through aryl hydrocarbon receptor activation. *Environmental health perspectives*, 123(7), 679-688. <https://doi.org/10.1289/ehp.140905>
- Zhang, Y., Wang, X., Yin, X., Shi, M., Dahlgren, R. A., & Wang, H. (2016). Toxicity assessment of combined fluoroquinolone and tetracycline exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 31(6), 736-750. <https://doi.org/10.1002/tox.22087>
- Zhang, L., Diao, J., Chen, L., Wang, Z., Zhang, W., Li, Y., & Zhou, Z. (2019). Hepatotoxicity and reproductive disruption in male lizards (*Eremias argus*) exposed to glufosinate-ammonium contaminated soil. *Environmental Pollution*, 246, 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.004>
- Zhang, Y., Dang, Y., Pei, F., Yuan, Y., Yuan, J., Gu, Z., & Wang, J. (2023). Sub-acute toxicity of the herbicide glufosinate-ammonium exposure in adult red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Environmental Pollution*, 337, 122605. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122605>
- Zhang, Q., Lei, C., Jin, M., Qin, G., Yu, Y., Qiu, D., & Qian, H. (2024). Glyphosate Disorders Soil Enchytraeid Gut Microbiota and Increases Its Antibiotic Resistance Risk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(4), 2089-2099. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c05436>
- Zhao, H., Chai, L., & Wang, H. (2013). Effects of fluoride on metamorphosis, thyroid and skeletal development in *Bufo gargarizans* tadpoles. *Ecotoxicology* 22(7), 1123-1132. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1099-0>
- Zhelev, Z., Tsonev, S., Georgieva, K., Arnaudova, D. (2018). Health status of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) in a rice paddy ecosystem in southern Bulgaria and its importance in assessing environmental state: haematological parameters. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 7884–7895. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1109-5>
- Zhu, W., Yang, D., Chang, L., Zhang, M., Zhu, L., & Jiang, J. (2022). Animal gut microbiome mediates the effects of antibiotic pollution on an artificial freshwater system. *Journal of Hazardous Materials*, 425, 127968. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127968>



Zuccato, E., & Castiglioni, S. (2009). Illicit drugs in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 367(1904), 3965-3978. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0107>

## **TESIS DOCTORAL**

*Efectos de contaminantes de preocupación emergente en la morfología, histología y composición de la microbiota intestinal de larvas de anfibios anuros*



**Lic. Ana Paula Cuzziol Boccioni**