

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**“Contaminantes emergentes: efectos de la exposición crónica al  
glifosato en el desarrollo de larvas de anuros”**

**Lic. Agustín Bassó**

**Director: Dr. Rafael C. Lajmanovich**

**Codirector: Dr. Maximiliano A. Attademo**

Laboratorio de Ecotoxicología (ESS-FBCB-UNL-CONICET)

2022

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (FBCB-UNL), por brindar el marco académico para el desarrollo de la presente tesis.

A la Universidad Nacional del Litoral por haberme otorgado las becas correspondientes para la realización de este doctorado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por haber financiado mis tareas de investigación.

Mi mayor reconocimiento y agradecimiento a los Dres. Rafael C. Lajmanovich, Paola M. Peltzer y Maximiliano A. Attademo por su gran apoyo, orientación, conocimientos compartidos y acompañamiento durante todo el transcurso de mi tesis.

A mi consejera de estudios la Dra. Valeria I. Gómez por haber sido parte de mi formación académica durante este período.

A mi mamá, mi papá, mi hermano y mi sobrina que han sido mis grandes compañeros en esta vida.

Además, quisiera agradecer a mis compañeros de laboratorio Candela, Carlina, Celina y Mariana por haber estado siempre dispuestas a compartir momentos y aprendizajes.

A mis amigos.

A Victoria Torres por su asesoramiento técnico.

Y un agradecimiento muy especial a Camila, por estar y por ser mi gran fuente de motivación e inspiración.



## Aportes científico-tecnológicos obtenidos durante el desarrollo del doctorado

### • Publicaciones en journals con referato

1. Basso, A., Devin, S., Peltzer P.M., Attademo A.M., Lajmanovich R.C. (2022). The integrated biomarker response in three anuran species larvae at sublethal concentrations of cypermethrin, chlorpyrifos, glyphosate and glufosinate ammonium. Journal of Environmental Science and Health, Part B. <https://doi.org/10.1080/03601234.2022.2099197>
2. Curi, L.M., Cuzziol Boccioni, A.P., Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Basso, A., Leon, E.J., Lajmanovich, R.C. (2022). Predator, conspecific and pesticides signals switch swimming behavior of gregarious tadpoles *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae). Canadian Journal of Zoology. <https://doi.org/10.1139/cjz-2021-0075>
3. Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Martinuzzi, C., Attademo A.M, Basso, A., Colussi, C. (2019). Insecticide pyriproxyfen (Dragón®) damage biotransformation, thyroid hormones, heart rate, and swimming performance of *Odontophrynus americanus* tadpoles. Chemosphere 220: 714-722.
4. Lajmanovich, R.C., Peltzer, P., Martinuzzi, C, Attademo A.M., Basso, A., Marglianese, M., Colussi, C. (2018). B-esterases and behavioral biomarkers in tadpoles exposed to pesticide pyrethroid- TRISADA®. Toxicology and Environmental Health Sciences 10 (5): 237-244.
5. Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Basso, A., Curi, L., Martinuzzi., C, Agostini, G., Ghirardi, R., López, A., Kacoliris, F., Martino, A., Natale, G., Arellano, M., Úbeda, C., Vaira, M., Akmentins, S. (2018). Componente 3. Amenazas. En Plan de Acción para la Conservación de los Anfibios de la República Argentina. Cuadernos de Herpetología 32 (supl. 1): 29-35
6. Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Martinuzzi, C.S., Attademo, A.M., Colussi, C.L., Bassó, A. (2018). Acute Toxicity of Colloidal Silicon Dioxide Nanoparticles on Amphibian Larvae: Emerging Environmental Concern. International Journal of Environmental Research 12 (3): 269-278

### • Capítulos de libros

1. Lajmanovich, R.C., Cuzziol, A.P., Curi, L.M., Attademo, M.A., Martinuzzi, C, Bassó, A, Colussi, C., Peltzer, P.M. (2021). Técnicas para el relevamiento de Anfibios en ambientes contaminados. Pp: 332-352. En: Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de Anfibios de Argentina. Parte I. Pereyra, L.C., Etchepare, E. y Vaira, M., (Ed.). Editorial Ediunju, San Salvador de Jujuy, Argentina., (En prensa)
2. Lajmanovich, R.C., Martinuzzi, C.S., Colussi, C.L., Peltzer, P.M., Bassó, A., Attademo, A.M., Curi, L.M. (2017). Amphibians: Possible Effects of Insect-Resistant Intacta RR2

Pro® Soybean Diets on *Leptodactylus gracilis* Tadpoles. Pp: 67-96. En: *Bacillus thuringiensis*: Biological Characteristics, Toxicological Effects and Environmental Implications. Balenger R., (ed), Nova Publishers, New York.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	1
Aportes científico-tecnológicos obtenidos durante el desarrollo del doctorado.....	2
Abreviaturas y símbolos .....	5
Resumen.....	8
Summary .....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Agricultura .....	12
1.2. Agro-economía Argentina .....	13
1.3. Agriculturización, mecanización y sojización .....	15
1.4. Plaguicidas.....	18
1.4.1. Herbicidas como contaminantes emergentes.....	19
1.5. Consecuencias del uso del glifosato en ambientes y fauna silvestre.....	20
1.5.1. Destino del glifosato en el ambiente .....	22
1.6. Anfibios anuros como especies bioindicadoras.....	23
1.6.1 Biomarcadores más usados para estudio de riesgo ecotoxicológico en anuros.....	24
1.6.2. Biomarcadores etológicos .....	29
1.6.3. Biomarcadores hormonales.....	32
1.7. Problemática de la anfibiafauna de la región asociada a los agroecosistemas.....	36
1.8. Rol ecológico de los anfibios anuros y la depredación como un factor de estrés ambiental.....	40
1.8.1. La depredación en anfibios anuros en un contexto de contaminación .....	44
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	46
2.1. Objetivo general.....	46
2.2. Objetivos particulares .....	46
2.3. Hipótesis.....	46
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.1. Área de estudio y sitios de muestreo .....	47
3.2. Selección y descripción de las especies .....	50
3.2.1. Depredadores .....	50
3.2.2. Presas.....	51
3.3.3. Recolección y acondicionamiento de depredadores y presas .....	54

3.3.4. Formulación seleccionada del herbicida glifosato .....	55
3.3.5. Pictogramas de las especies de anfibios anuros y de los estresores evaluados	56
3.4. Diseños experimentales .....	56
3.4.1. Experimentos agudos a corto plazo.....	56
3.4.2. Experimentos a largo plazo.....	59
4. RESULTADOS.....	66
4.1. Experimentos a corto plazo.....	66
4.1.1. Experimento agudo 1 (EA1): Bioensayo de toxicidad aguda de una formulación comercial de glifosato en larvas de <i>R. arenarum</i> .....	66
4.1.2. Experimento agudo 2 (EA2): Evaluación del comportamiento a corto plazo de larvas <i>R. arenarum</i> , <i>P. albonotatus</i> y <i>S. nasicus</i> a señales del depredador <i>B.</i> <i>elongatum</i> y a una concentración ambientalmente relevante de glifosato .....	68
4.2. Experimentos a largo plazo .....	71
4.2.1. Experimento crónico 1 (EC1): Evaluación del crecimiento y desarrollo de las larvas de <i>R. arenarum</i> expuestas a señales del depredador <i>B. elongatum</i> y a una concentración ambientalmente relevante de glifosato .....	71
4.2.2. Experimento crónico 2 (EC2): Evaluación de los efectos de la exposición crónica a glifosato y a depredadores en variables morfométricas, enzimáticas y hormonales de larvas de <i>R. arenarum</i> , <i>P. albonotatus</i> y <i>S. nasicus</i> .....	80
5. DISCUSIÓN.....	110
5.1. Experimento agudo 1 (EA1): Bioensayo de toxicidad aguda de una formulación comercial de glifosato en larvas de <i>R. arenarum</i> .....	110
5.2. Experimento agudo 2 (EA2): Evaluación del comportamiento a corto plazo de larvas <i>R. arenarum</i> , <i>P. albonotatus</i> y <i>S. nasicus</i> , a señales del depredador <i>B. elongatum</i> y a una concentración ambientalmente relevante de glifosato.....	113
5.3. Experimento crónico 1 (EC1): Evaluación del crecimiento y desarrollo de las larvas de <i>R. arenarum</i> expuestas a señales del depredador <i>B. elongatum</i> y a una concentración ambientalmente relevante de glifosato.....	117
5.4. Experimento crónico 2 (EC2): Evaluación de los efectos de la exposición crónica a glifosato y a depredadores en variables morfométricas, enzimáticas y hormonales de larvas de <i>R. arenarum</i> , <i>P. albonotatus</i> y <i>S. nasicus</i> .....	120
5.4.1 Morfometría clásica.....	120
5.4.2. Morfometría geométrica .....	122
5.4.3. Variables enzimáticas.....	124
5.4.4. Variables hormonales .....	127
6. CONCLUSIONES.....	131
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	133

### Abreviaturas y símbolos

a.C.	Antes de Cristo
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AF	Agroquímicos formulados
AG	Actividad global
AMPA	Ácido aminometil fosfónico
ANOSIM	Análisis de similitud
ANOVA	Análisis de la varianza
AVC	Análisis de variables canónicas
BChE	Butirilcolinesterasa
BCI	Índice de condición corporal
CCA	Contaminants of emerging concern
ChEs	Colinesterasas
Cl50	Concentración letal 50
cm	Centímetro
col.	Colaboradores
CORT	Cortisol
DE	Disruptores endocrinos
ds	Desvío estándar
DTR	Distancia total recorrida
e.g.	Por ejemplo
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EPSP sintasa	5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa
ER	Especie reactiva
es	Error estándar
etc.	Etcétera
FBCB	Facultad de Bioquímica y Ciencias biológicas
g	Gramo
GC	Glucocorticoides

<b>GLY</b>	Glifosato
<b>h</b>	Hora
<b>ha</b>	Hectáreas
<b>HHA</b>	Hipotálamo-hipófiso-adrenal
<b>HPA/I</b>	Hipotalámico-pituitario-suprarrenal/interrenal
<b>i.a.</b>	Ingrediente activo
<b>i.c.</b>	Intervalo de confianza
<b>IPA</b>	Isopropilamina
<b>L</b>	Litro
<b>LOEC</b>	Concentración más baja de efecto observado
<b>LT</b>	Longitud total
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mg/L</b>	Miligramos por litro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Micromolar
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µmol</b>	Micromol
<b>N</b>	Número Total
<b>NOEC</b>	Concentración más alta de efecto no observado
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ONU</b>	Organización de las Naciones Unidas
<b>OP</b>	Compuestos organofosforados
<b>p</b>	Valor p
<b>POEA</b>	Polioxietileno-amina
<b>PRED</b>	Depredador
<b>PT</b>	Proteínas totales
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RR</b>	Roundup Ready
<b>Ru</b>	Rutenio

<b>s</b>	Segundo
<b>SIMPER</b>	Porcentaje de similitud
<b>T3</b>	Triyodotironina
<b>T4</b>	Tiroxina
<b>TH</b>	Hormonas tiroideas
<b>TR</b>	Receptores de hormonas tiroideas
<b>TRE</b>	Elementos sensibles a hormonas tiroideas
<b>UICN</b>	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
<b>UNL</b>	Universidad Nacional del Litoral
<b>UPGMA</b>	Unweighted pair-group average
<b>US.EPA</b>	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
<b>VC</b>	Variables canónicas
<b>Vmax</b>	Velocidad máxima
<b>Vmed</b>	Velocidad media
<b>%</b>	Por ciento
<b>&lt;</b>	Menor que
<b>&gt;</b>	Mayor que
<b>®</b>	Marca registrada
<b>2,4-D</b>	2,4-diclorofenoxiacético

## Resumen

El glifosato es uno de los agroquímicos más utilizados a escala global y es frecuentemente hallado en los cuerpos de agua donde los anfibios, uno de los grupos taxonómicos más amenazados, se reproducen. Por esta razón el objetivo general de esta tesis fue el de determinar respuestas etológicas, morfológicas, enzimáticas y hormonales al stress por depredadores (PRED) en larvas de anuros del litoral mesopotámico argentino bajo la influencia de la formulación comercial de glifosato Roundup Controlmax (GLY) pre y post metamorfosis en las especies de anuros nativas *Rhinella arenarum*, *Physalaemus albonotatus* y *Scinax nasicus*. La especie de depredador seleccionada fue *Belostoma elongatum*. Se realizaron dos experimentos de corta duración (EA1 y EA2) y dos de exposición crónica (EC1 y EC2). En el EA1 se evaluó la  $CL_{50}/24h$  que fue de 25,13 mg/L (intervalo de confianza; IC 95% = 20,85-28,31), mientras que la concentración NOEC fue de 12,5 mg/L y la LOEC de 15 mg/L GLY. En el EA2 se analizó el comportamiento de las larvas de las 3 especies de anuros en presencia de PRED y GLY a través de las variables distancia total recorrida (DTR), velocidad máxima (Vmax), velocidad media (Vmed) y actividad global (AG). Las especies *R. arenarum* y *S. nasicus* modificaron su DTR y AG en presencia de GLY. *R. arenarum* aumentó su Vmax en presencia de PRED y la disminuyó en presencia de GLY mientras que *S. nasicus* tuvo la misma respuesta en su Vmed. *P. albonotatus* no modificó su comportamiento ni por GLY ni por PRED. En el EC1 se evaluó el desarrollo de larvas de *R. arenarum* en presencia de PRED y/o GLY en dos concentraciones (1,5 y 2,5mg/L) y además se evaluó el peso, el largo total (LT), el índice de condición corporal y el ancho de cabeza de los juveniles post metamorfosis. La presencia de PRED y GLY aceleraron el proceso de metamorfosis respecto al control, aunque GLY lo hizo en menor intensidad. Además, tanto PRED como GLY indujeron un aumento de las variables peso, LT y ancho de cabeza de los juveniles. En el EC2 se evaluaron el peso, el LT, variaciones en la morfometría, las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y glutatión-s-transferasa (GST) y las hormonas cortisol (CORT), triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) en un experimento de diseño factorial 2x2 en presencia y ausencia de PRED y GLY en *R. arenarum*, *P. albonotatus* y *S. nasicus*. Todos los biomarcadores se evaluaron en la fase de renacuajo y en la fase de juvenil justo después de la reabsorción de la cola. En larvas de *R. arenarum* se observó un aumento del peso, LT, y AChE por GLY además de cambios morfométricos luego de la exposición a GLY y a PRED, mientras que en juveniles se vio un aumento de AChE por GLY y PRED y una reducción en los niveles de CORT por PRED. En larvas de *P. albonotatus* se observó un aumento en la AChE, una interacción en las variables peso y en la enzima GST, con aumentos en la concentración de GST en presencia de GLY y PRED; en juveniles se determinó una disminución del peso por PRED.

En larvas de *S. nasicus* se observaron aumentos por PRED en AChE, CORT y T4 e interacciones para las variables GST y T3; mientras que en juveniles de esta especie, se detectaron interacciones para GST y un aumento de la hormona T4 en presencia de GLY. Estos resultados demuestran que la respuesta a PRED y GLY es especie específica lo que dificulta la elección de un único biomarcador para la evaluación ecotoxicológica en anfibios anuros y refuerzan la necesidad de incorporar múltiples marcadores etológicos, morfológicos, enzimáticos y hormonales en estudios ecotoxicológicos con fines de conservación.



## Summary

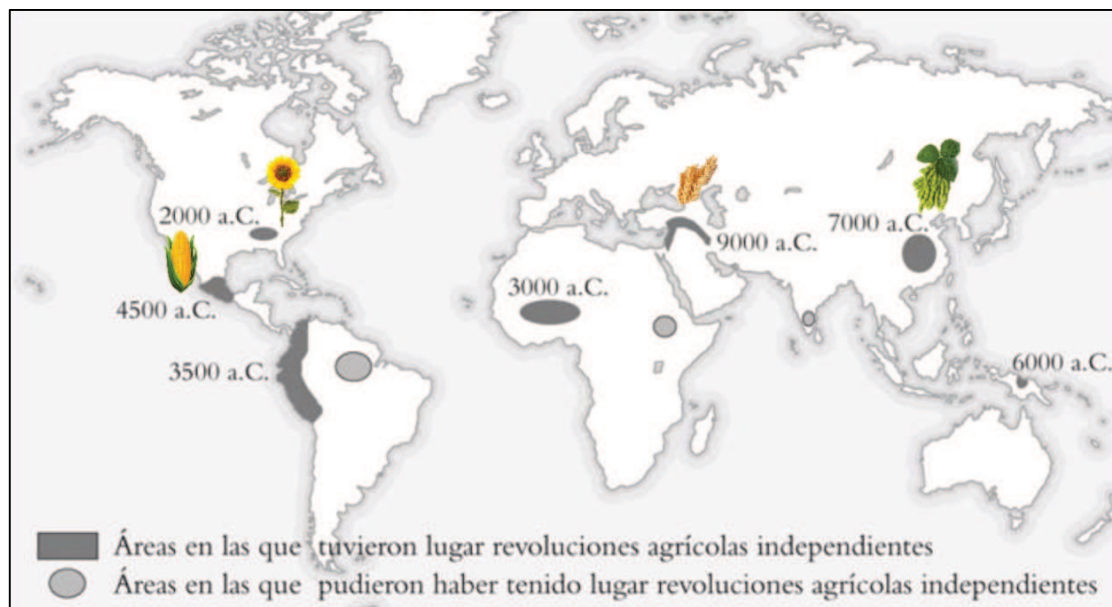
Glyphosate is one of the most widely used agrochemicals on a global scale and is frequently found in water-bodies where amphibians -one of the most threatened taxonomic groups- reproduce. For this reason, the general objective of this thesis was to determine pre and post metamorphosis the ethological, morphological, enzymatic and hormonal responses to predator stress (PRED) and the commercial formulation of glyphosate Roundup Controlmax (GLY) in the native in anuran species *Rhinella arenarum*, *Physalaemus albonotatus* and *Scinax nasicus*. The selected predator species was *Belostoma elongatum*, an abundant water bug. Two experiments of short duration (EA1 and EA2) and two of chronic exposure (EC1 and EC2) were carried out to test the different responses to PRED and/or GLY stimuli. In EA1, the  $CL_{50/24h}$  was 25.13 mg/L (confidence interval; 95% CI = 20.85-28.31), while the NOEC concentration was 12.5 mg/L and the LOEC of 15 mg/L GLY. In EA2, the behavior of the larvae of the 3 species of anurans in the presence of PRED and GLY was analyzed through the variables total distance traveled (DTR), maximum speed ( $V_{max}$ ), average speed ( $V_{med}$ ) and global activity (AG). The species *R. arenarum* and *S. nasicus* modified their DTR and AG in the presence of GLY. *R. arenarum* increased its  $V_{max}$  in the presence of PRED and decreased it in the presence of GLY while *S. nasicus* had the same response in its  $V_{med}$ . *P. albonotatus* did not modify its behavior neither by GLY nor by PRED. In EC1, the development of *R. arenarum* larvae in the presence of PRED and/or GLY in two concentrations (1.5 and 2.5mg/L) was evaluated, as well as weight, total length (LT), animal condition factor and head width of post-metamorphosis juveniles. The presence of PRED and GLY accelerated the metamorphosis process compared to the control, although GLY did so less intensely. In addition, both PRED and GLY induced an increase in the variables weight, LT and head width of the *R. arenarum* juveniles. In EC2, weight, LT, variations in morphometry, the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and glutathione-s-transferase (GST) and the hormones cortisol (CORT), triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) were evaluated in a 2x2 factorial design experiment in the presence and absence of PRED and GLY in *R. arenarum*, *P. albonotatus* and *S. nasicus*. All biomarkers were evaluated in the tadpole and in the juvenile phase just after tail resorption. In *R. arenarum* larvae, an increase in weight, LT, and AChE by gly was observed, in addition to morphometric changes due to GLY and PRED, while in juveniles an increase in AChE by GLY and PRED and a reduction in CORT levels were observed in the presence of PRED. In *P. albonotatus* larvae, an increase in AChE, an interaction in the variables weight and and GST, with increases in the concentration of GST in the presence of GLY and PRED was detected; in juveniles, a decrease in weight was determined by PRED presence. In *S. nasicus* larvae, PRED increased

AChE, CORT and T4 while interactions in GST and T3 were observed; in juveniles of this species, interactions were detected in GST and GLY induced the hormone T4. These results show that the response to PRED and GLY is species-specific, which makes it difficult to choose a single biomarker for ecotoxicological evaluation in anuran amphibians and reinforce the need to incorporate multiple ethological, morphological, enzymatic and hormonal markers in ecotoxicological studies for the purpose of conservation.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Agricultura

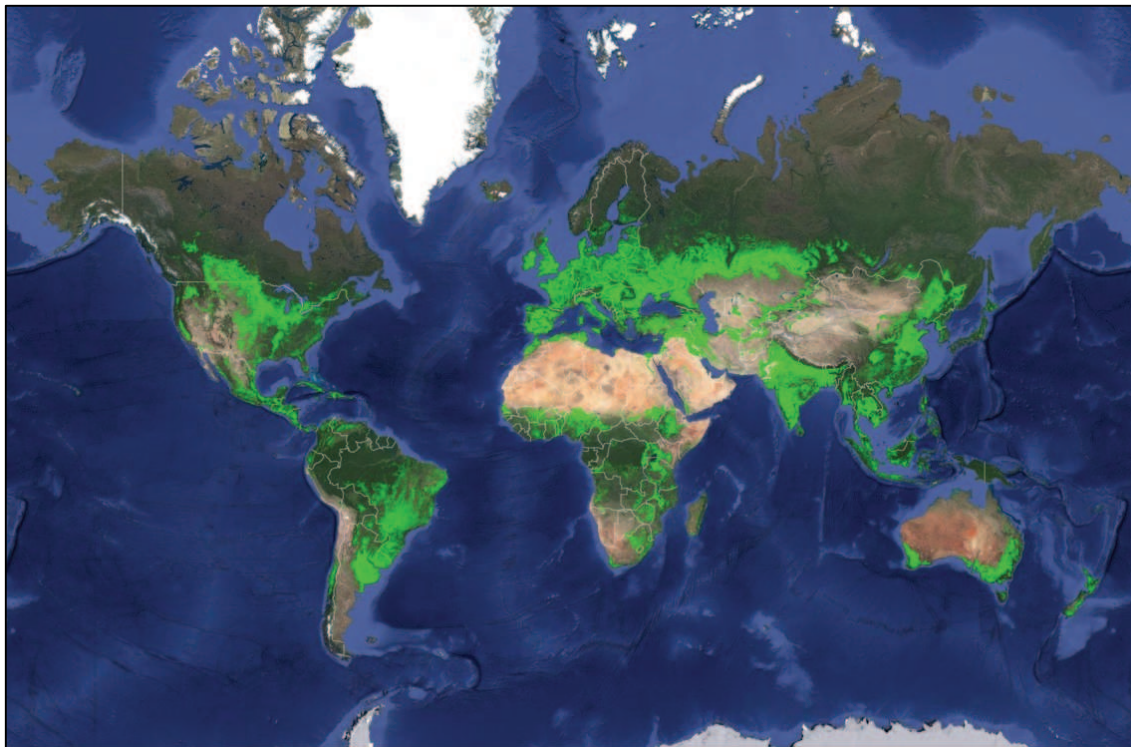
Durante la mayor parte de la historia de la especie humana, el *Homo sapiens* vivió y se alimentó mediante actividades de caza y recolección de alimentos. La transición a la agricultura comenzó alrededor de 9000 a.C. a orillas de los ríos Éufrates y Tigris (Turquía e Irán), aunque se originó independientemente en al menos siete regiones diferentes (Figura 1) y se extendió por todas partes del planeta (Figura 2). Hacia el siglo I a.C., la inmensa mayoría de las personas eran agricultores, mientras que en los últimos 200 años, sólo la mitad de la población mundial vive en regiones rurales (ONU, 2022).



**Figura 1.** Localización y fechas de las revoluciones agrícolas. No hay consenso sobre las fechas, y el mapa se redibuja continuamente para incorporar los últimos descubrimientos arqueológicos (Adaptado de Harari, 2014). Las flechas indican el origen de la domesticación de los principales cultivos actuales.

Si bien actualmente, la mayoría de los humanos no son agricultores, la población mundial sigue aumentando y con ello, la demanda de alimentos y la superficie cultivada. Los impactos ambientales de la agricultura incluyen aquellos causados por su expansión e intensificación, es decir, cuando los agroecosistemas se extienden sobre paisajes o ecosistemas naturales; y cuando esta expansión se gestiona mediante incendios, mecanización, fertilizantes y plaguicidas con la finalidad de incrementar su productividad en términos agronómicos. Más precisamente, la “revolución” de la agricultura moderna se vio favorecida, en efecto, por el gran desarrollo de compuestos para el control de plagas. Actualmente existen alrededor de mil ingredientes activos (i.a.) de plaguicidas (Goldman,

2007) y una amplia variedad de formulaciones comerciales con diferentes propiedades y efectos toxicológicos.



**Figura 2.** Tierras de cultivo (en verde) a escala global con una resolución de 30 m (GCEP30). Derivado de datos de series temporales de satélite Landsat para el año 2015 (Thenkabail y col., 2021).

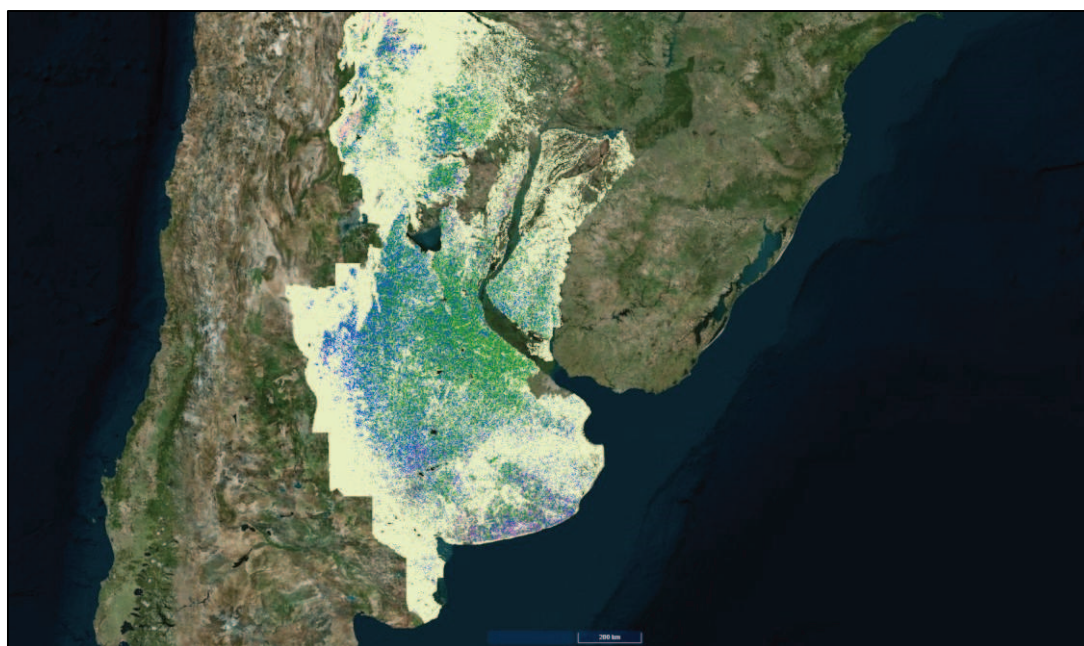
## **1.2. Agro-economía Argentina**

En Argentina, la agricultura es una de las principales actividades económicas que genera el 68% del ingreso de dólares por exportaciones, además de abastecer de alimento y materias primas al mercado interno (BCR, 2021). La superficie continental de nuestro país abarca 278 millones de hectáreas (ha), lo que lo ubica en el octavo país del mundo en términos de superficie, de las cuales aproximadamente 38 millones están destinadas a la producción de 6 cultivos principales (**Tabla 1**). Se destacan la soja, el maíz y el trigo por presentar la mayor superficie de ocupación del suelo, abarcando un 80% de las tierras cultivadas del país. Esta distribución de cultivos, se evidencia principalmente en la región núcleo, comprendida por las provincias de Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires y La Pampa, donde la productividad es mayor para el cultivo extensivo debido a la calidad de suelo, abundantes precipitaciones y proximidad a los puertos y cursos navegables (**Figura 3**). La provincia de Santa Fe destina alrededor de un 18,08% de su superficie al cultivo de soja,

siendo una de las provincias que, junto a Buenos Aires y Córdoba, representan el 75,43% de la superficie sembrada declarada total de soja (SISA 2021/2022).

**Tabla 1.** Superficie sembrada y producción en millones de toneladas de las principales especies vegetales cultivadas en Argentina en la campaña 2020/2021.

Cultivo	Superficie Sembrada (MHa)	Producción (MTn)
Soja ( <i>Glycine max L.</i> )	16,9	56,5
Maíz ( <i>Zea mays</i> )	7,3	51,5
Trigo ( <i>Triticum spp</i> )	6,5	19,0
Girasol ( <i>Helianthus annuus</i> )	1,6	2,7
Cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> )	1,2	3,8
Sorgo ( <i>Sorghum bicolor L. Moench</i> )	0,95	3,3



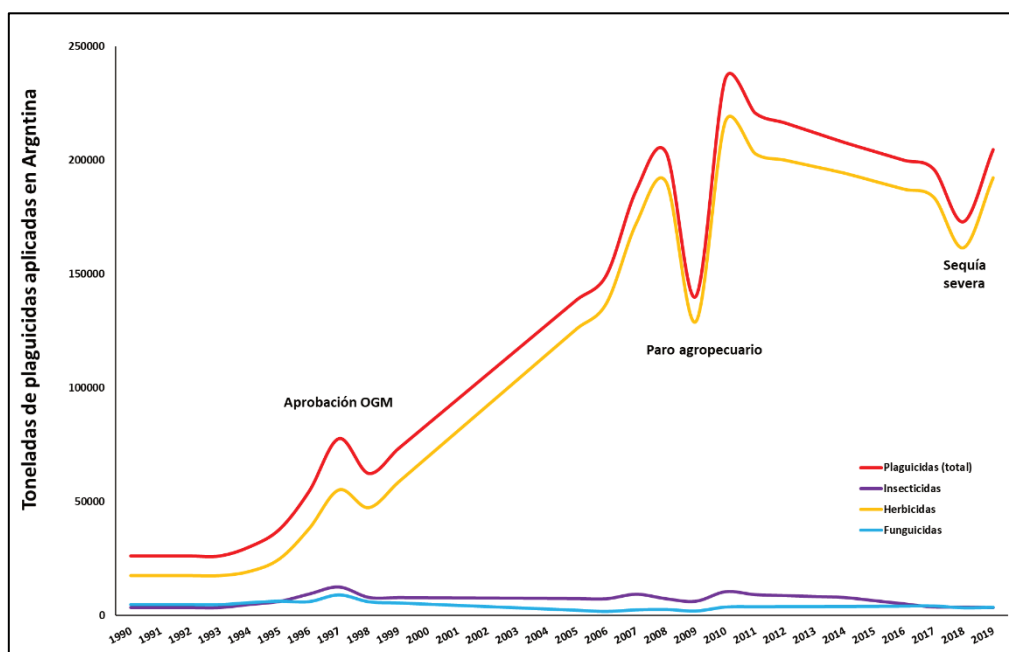
**Figura 3.** Mapa nacional de cultivos de verano 2020/2021 (modif. de Abelleira y col, 2021). Soja en verde. Maíz en azul.



### 1.3. Agriculturización, mecanización y sojización

El 70% de la deforestación mundial es causada por el avance de la frontera agropecuaria (FAO, 2017). En Argentina, las innovaciones en la agroindustria con el surgimiento de la soja transgénica y la siembra directa asociada a otros paquetes tecnológicos aceleraron el proceso de deforestación desde la Región Pampeana hacia el Parque Chaqueño (Carrasco, 2012). Actualmente, una gran superficie de la matriz de pastizales, humedales y montes naturales nativos de las ecorregiones chaqueña (Chaco, Formosa, Salta y Santiago del Estero) y pampeana (Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos) se encuentra atravesando un fuerte proceso de fragmentación, principalmente por áreas destinadas al monocultivo de soja o sojización (Haro Sly, 2017; Mónaco y col., 2020). La deforestación y particularmente los monocultivos, simplifican la estructura del paisaje, disminuyen la riqueza y abundancia de la biodiversidad e interfieren la provisión de numerosas funciones y servicios ecosistémicos (Volante, 2014).

El desarrollo de siembra directa ha sido favorecido por sus ventajas en la disminución, en cierta medida, de la degradación física y química de los suelos en cuanto a la erosión hídrica y eólica y debido a que conserva mayor contenido de materia orgánica en comparación con el arado convencional (Hernández, 2010; Michelena y col., 2011). No obstante, la misma requiere el uso de grandes cantidades de agroquímicos, especialmente herbicidas con los que se elimina toda otra especie vegetal que no sean las variedades transgénicas de interés (Papa y Tuesca, 2014). Desde los años 90, la aplicación de agroquímicos en Argentina se ha incrementado muy significativamente alrededor de 1138 % de 17 a 217 millones de kg/año (**Figura 4**). De todos los pesticidas vendidos durante este período, un 64 % corresponde a herbicidas, un 20% a fungicidas y un 16% a insecticidas (FAO, 2022). El mercado de herbicidas está mayormente dominado por 3 i.a.: Glifosato, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y atrazina (FAO, 2022).



**Figura 4.** Evolución del mercado de fitosanitarios en Argentina en el período 1990-2019 según datos de FAO, 2022).

La expansión del monocultivo de soja ha sido impulsada por la gran demanda en los mercados asiáticos (principalmente chino donde se utiliza para alimentar ganado porcino) y por los avances en la biotecnología aplicada que logró modificaciones genéticas en especies vegetales de interés agronómico. Este es el caso de la soja Roundup Ready® (RR) producida en sus inicios por la empresa Monsanto, la cual fue genéticamente modificada para resistir al herbicida glifosato (Carrasco y col., 2012). La soja RR fue aprobada en Argentina en el año 1996 y a partir de ese momento su uso se ha expandido rápidamente (**Figura 5**) junto al glifosato y a otros Agroquímicos Formulados (AF) de mayor peligrosidad (**Figura 4**). De acuerdo con el informe de SISA (2020/2021), el 97,06% del total de la superficie de soja sembrada en Argentina corresponde a semillas RR (**Tabla 2**). Esta transición de cultivos no transgénicos a transgénicos también se ha llevado a cabo en el maíz y en el algodón. Actualmente existen 40 especies vegetales resistentes a uno o más tipos de herbicidas sólo en Argentina, el proceso de resistencia a plaguicidas también se da en otros clados lo que genera un aumento de la concentración del i.a. y en un aumento en la aplicación de las formulaciones comerciales en el ambiente (**Figura 4**).

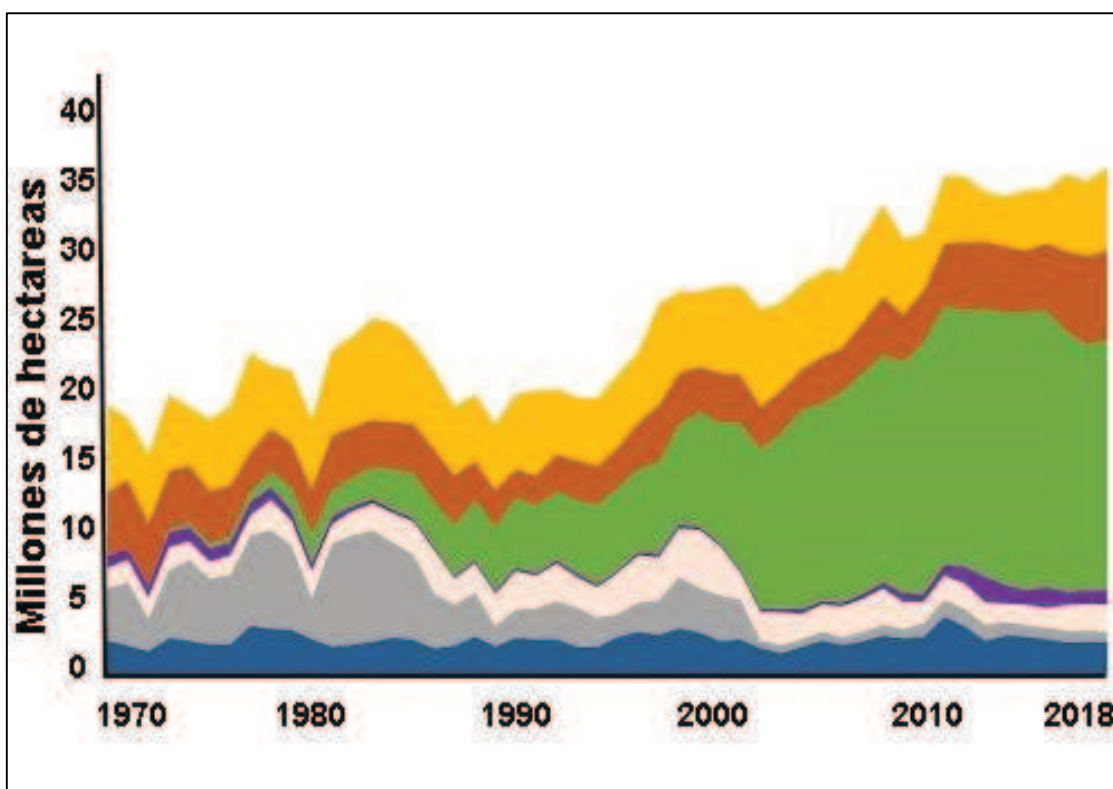


Figura 5. Evolución del área sembrada por cultivo en Argentina desde 1899 a 2020 (Modificado de BCR, 2021). Soja (verde), maíz (rojo), trigo (amarillo), cebada (violeta), girasol (rosado), sorgo (gris), otros (azul).

Tabla 2. Superficie y variedades cultivadas de soja según sus características (Tomado de SISA 2021/2022).

Características	Superficie (Has) Campaña		Cantidad Variedades	% Superficie sobre Superficie total	Variedades Sembradas 2020 2021		Productores Campaña 2020 2021	
	2020	2021			2020	2021		
Transgénicas	13.403.924		790,00	97,06%	614		55.041	
No transgénicas	369.402		298,00	2,68%	100		1.674	
Otras*	36.002		0,00	0,26%	16		140	
<b>Totales</b>	<b>13.809.328</b>		<b>1.088</b>	<b>100,00%</b>	<b>730</b>		<b>56.855</b>	

Fuente: Sistema de Información Simplificado Agrícola (SISA) y Catálogo de Cultivares INASE. \* Se refiere a variedades fuera del Catálogo (F/C) y variedades canceladas.



#### 1.4. Plaguicidas

Los plaguicidas o AF son sustancias, o mezclas de sustancias, destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga que cause daño o interfiera con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera (FAO, 2006; OMS, 2019). Los plaguicidas formulados constan de dos partes: una conformada por el i.a. o principio activo (p.a), que es el constituyente que actuará controlando la plaga y otra parte compuesta por los surfactantes, también denominados inertes o inactivos, por su relativa falta de acción biocida per se (Arregui y col., 2013). Estos últimos ingredientes corresponden a todos los aditivos tales como vehículos, emulsionantes, tensioactivos o adyuvantes que se agregan para alterar algunas de las propiedades físicas y químicas de los agroquímicos y ayudan a transportar y/o facilitar la penetración del i.a. en el organismo blanco para el cual fue diseñado el plaguicida (Aparicio y col., 2015). La información sobre la composición, el mecanismo de acción o la peligrosidad de estos surfactantes no se brinda en el etiquetado de los agroquímicos que se comercializan y frecuentemente resultan más peligrosos y tóxicos que el propio i.a (Larramendy y col., 2010). Uno de los casos más emblemáticos de las últimas décadas es el polioxietileno-amina (POEA) surfactante del glifosato (Defarge y col., 2016).

Las clases toxicológicas se definen en base a la Dosis Letal Media (DL50) de cada sustancia y su formulación (OMS, 2019; **Tabla 3**). La DL50 es usada con frecuencia como un indicador general de la toxicidad aguda de un agente químico o físico (radiación), que se calcula que genere la mortalidad al 50% de los organismos de una población muestral bajo un conjunto de condiciones definidas (Repetto y col., 1995). Se expresa en miligramo (mg) del tóxico por kilogramo (kg) de peso vivo y se informa la especie de estudio, el sexo y la vía de absorción.

**Tabla 3.** Clasificación toxicológica de los contaminantes químicos según la DL50 en ratas determinadas según el criterio de OMS (2019).

Clase toxicológica	DL50 en ratas [mg/kg de peso corporal]	
	Oral	Dérmica
Ia Extremadamente peligroso	< 5	< 50
Ib Muy peligroso	5-50	50-200
II Moderadamente peligroso	50-2000	200-2000
III Poco peligroso	por arriba de 2000	por arriba de 2000
IV Poco probable de presentar peligro agudo	5000 o superior	

No obstante, en esta clasificación sólo consideran evaluaciones en contadas especies de mamíferos y no los efectos generados en otras especies silvestres, ni se tienen en cuenta los riesgos que puede producir una prolongada exposición, la persistencia ambiental o bioacumulación tanto de su i.a, coadyuvantes o metabolitos. Es importante destacar que más allá de la letalidad, existen otros efectos de gran importancia en la supervivencia de los organismos como la oncogénesis, neurotoxicidad, efectos mutagénicos, teratogénicos o alteraciones en la reproducción, en el metabolismo, posibles efectos retardados y la potenciación entre otros (Carballo y Mudry, 2006).

La forma más común de clasificar a los plaguicidas es considerando el organismo blanco sobre el cual hará el efecto para el que fue diseñado, es decir, herbicidas, insecticidas, fungicidas, entre otros (Aparicio y col., 2015).

#### **1.4.1. Herbicidas como contaminantes emergentes**

Se define como contaminantes emergentes o de preocupación emergente (por sus siglas en inglés *contaminants of emerging concern* CCA) a las sustancias químicas o materiales naturales, manufacturados o hechos por el hombre que están presentes en diversos compartimentos y cuya toxicidad o persistencia sean susceptibles de alterar significativamente el metabolismo de un ser vivo (Bravo y col., 2009). Sin embargo, esta definición es un poco elusiva ya que, lo que está emergiendo, es una cuestión de perspectiva y de tiempo (Field y col., 2006). Algunos autores, sostienen que mientras haya escasez de información en la literatura científica o existan reportes mal documentados sobre los problemas potenciales que podrían causar, debería considerarse a todos los pesticidas como CCA (Sauvé y Desrosiers, 2014). En general, se espera que las sustancias CCA presenten cierto potencial para ocasionar riesgos en la salud humana o el medio ambiente y que aún no estén sujetos a criterios o normas reglamentarias para su protección (Kissane y Shephard, 2017). Si bien no todos los contaminantes muestran potencial para ser considerados de preocupación tangible, la falta información sobre el destino ambiental y datos ecotoxicológicos o toxicológicos de estos dificulta la evaluación adecuada de los riesgos asociados (Sauvé y Desrosiers, 2014; Kissane y Shephard, 2017).

Los herbicidas son productos químicos elaborados para controlar especies de plantas no deseadas ya que se considera pueden generar un impacto negativo, principalmente por competición por recursos como luz, agua y nutrientes. La mayoría de los herbicidas suelen

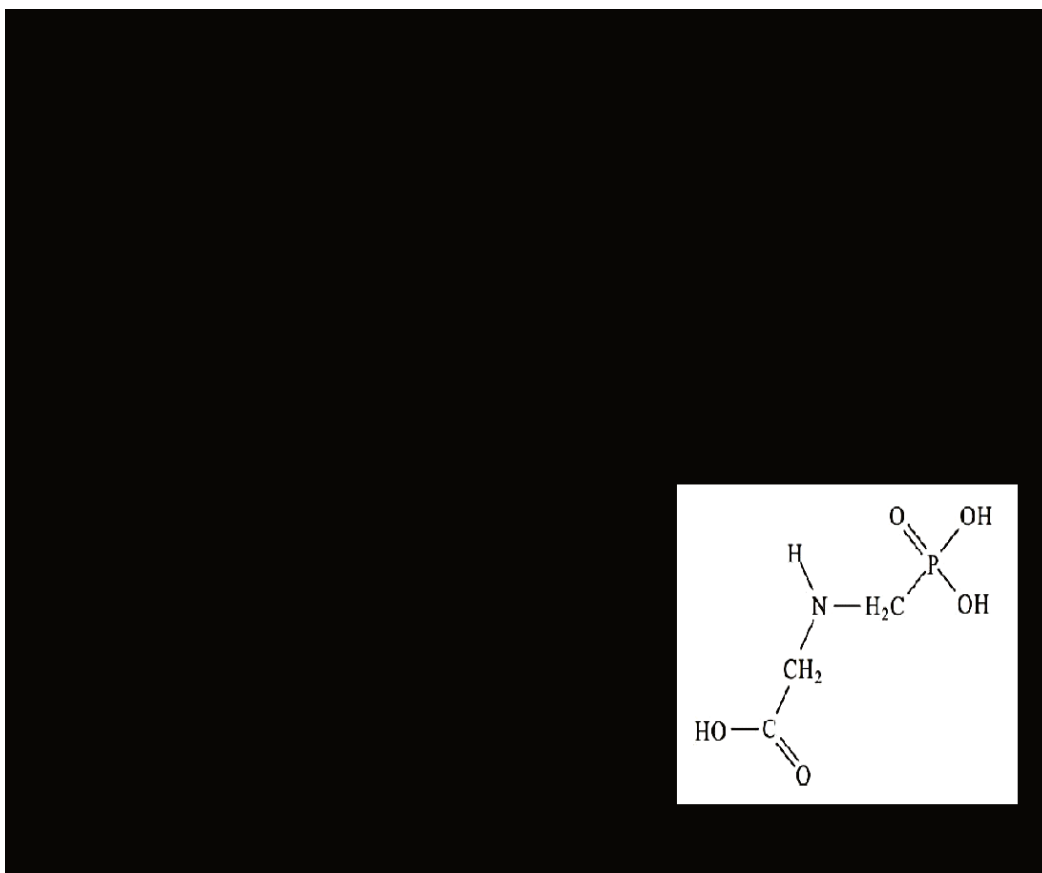
afectar el proceso de la fotosíntesis, la división celular o el crecimiento, aunque algunos herbicidas parecen afectar más de uno (Ulzurrún, 2013). El mercado de herbicidas ha crecido a nivel mundial y ha generado un aumento del 50% en el consumo global de plaguicidas, alcanzando una tasa de aumento anual del 17% durante 1990 y 2005 y siendo el glifosato uno de los plaguicidas más ampliamente utilizados en los campos de producción agrícola en nuestra región y en el mundo, lo que justifica el interés por conocer sus efectos en el ecosistema (Zhang y col., 2011).

El glifosato funciona como un inhibidor de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSP sintasa) no solo en plantas sino también en protozoos, hongos, bacterias (Duke, 2018), afectando comunidades planctónicas (Perez y col. 2007; Vera y col., 2010; Gattás y col., 2016, 2018) y generando resistencias de hongos y bacterias (Van Bruggen y col., 2018; Spinelli y col., 2021). Por su presencia en suelo, aguas superficiales y subterráneas, agua de lluvia y productos de consumo (Battaglin y Kolok, 2014; Ronco y col., 2016; Castro Berman y col., 2018) sumado a su difundido y frecuente uso y a su potencial carcinogenicidad entre otros efectos adversos en el ambiente (ver Van Bruggen y col., 2018) es que varios autores (Battaglin y col., 2014) han considerado al herbicida glifosato como un contaminante emergente debido a su potencial como sustancia cancerígena, por lo que la contaminación por este compuesto en el ambiente es un problema de salud para los ecosistemas y para la salud humana (Pereira y col., 2021).

### **1.5. Consecuencias del uso del glifosato en ambientes y fauna silvestre**

El herbicida glifosato (N° CAS: 1071-83-6) es un pesticida sistémico de postemergencia no selectivo de amplio espectro utilizado para el control de plantas, principalmente poáceas anuales, perennes y leñosas en los cultivos de soja, maíz, trigo, girasol, algodón, arroz, frutales (Devine y col., 1993). Este herbicida se emplea siempre antes de la emergencia de las malezas, lo cual puede o no ser antes de la emergencia del cultivo y su aplicación se realiza sobre la planta, aunque actúa a distancia al ser transportado hasta la raíz mediante el floema. Una vez aplicado, el glifosato circula por el sistema vascular de las plantas una vez que ingresa en ellas a través de las hojas. Las características físico-químicas del i.a. de este herbicida se detallan en la **Tabla 4:**

**Tabla 4.** Características físico-químicas del herbicida glifosato



El mecanismo de acción del glifosato es la inhibición de la enzima cloroplástica EPSP sintasa, responsable de la producción de un intermediario en la biosíntesis de varios aminoácidos aromáticos como triptófano, fenilalanina y tirosina (Funke, 2006). Debido a que este proceso metabólico no existe en mamíferos, se argumenta que el glifosato no produce toxicidad en mamíferos. Dentro de las clases toxicológicas, el glifosato está clasificado en la Clase III (producto poco peligroso), para exposición oral e inhalación (OMS, 2019). No obstante, en el año 2015 fue reclasificado por la IARC (2015) como una sustancia cancerígena en el Grupo II A (probablemente carcinógeno para humanos). En ratas, la DL50 oral aguda es igual a 4230 mg/kg, se absorbe escasamente en el tracto digestivo y, por lo tanto, se excreta en gran parte sin ser metabolizado. De acuerdo a estudios de toxicidad aguda el glifosato es considerado moderadamente tóxico para peces (Cavalcante y col., 2008) y anfibios (Lajmanovich y col., 2003). En aves es ligeramente tóxico, con DL50 oral aguda mayores a 4500 mg/L para patos y codornices (Solomon y col., 2007). Otros estudios de exposición al glifosato reportaron efectos negativos en microorganismos procariotas del tipo Acidobacteriota que participan en los procesos

biogeoquímicos (Newman y col., 2016), en lombrices, abejas (Gregorc y Ellis., 2011) y crustáceos (Hansen y col., 2016) por citar algunos ejemplos.

En cuanto a la toxicidad en organismos fotosintéticos no blanco, el glifosato presenta efectos de fitotoxicidad letal y severa como así también retraso en el crecimiento (Ferreira y col., 2017). Por tanto, los parches de bosques inmersos o cercanos a agroecosistemas suelen ser afectados por la aplicación de glifosato y otros AF en los cultivos (Alonso y col., 2018; Lupi y col., 2019) resultando en detrimento de la biodiversidad de los bosques, pastizales y otros ecosistemas (ver Cederlund, 2017; Botten y col., 2021).

Los efectos negativos de la agricultura en el ecosistema, no sólo se producen a nivel de la superficie sino que también afectan a la micro, meso y macrobiota del suelo (bacterias, hongos, artrópodos, anélidos, etc.) que intervienen en procesos de gran importancia ecológica como la descomposición de la materia orgánica, el reciclaje de los nutrientes, la fijación de nitrógeno, amonificación, nitrificación y desnitrificación (Uribe-Hernández y col., 2010, Attademo y col., 2021), así como la aparición de plagas emergentes en cultivos que utilizan el mecanismo de siembra directa y que se benefician de la falta de depredadores y de la abundancia de alimento del monocultivo (Carmona, 2001).

### **1.5.1. Destino del glifosato en el ambiente**

Por sus propiedades de presión de vapor, si el glifosato es liberado al aire a 25 °C este puede existir únicamente en la fase de partículas en la atmósfera, las cuales serán eliminadas mediante deposición húmeda y seca mientras que en el suelo, el glifosato y sus sales no son volátiles en suelos ni en agua, no se degradan fotoquímicamente y son estables en el aire. La toxicidad del glifosato aumenta junto con el incremento del pH. La absorción es el proceso principal que determina el destino del glifosato en el suelo, ya que controla la disponibilidad para la degradación biológica, para la absorción por parte de la planta y para la movilidad a través del suelo (Duke y col., 2012). En el agua el glifosato se absorbe en sólidos suspendidos y sedimentos según el rango de Koc. No obstante, el glifosato se absorbe fuertemente en el suelo, con constantes de adsorción varias veces mayor que la de otros herbicidas, siendo por ejemplo, 100 veces mayor que la del herbicida 2,4-D, lo que dificulta la degradación del glifosato por parte de los microorganismos y causa su acumulación por largo tiempo (Farenhorst y col., 2008). El glifosato presenta una persistencia de 2–197 días de vida media del suelo (NTP, 1992). La acción bacteriana es la principal fuente de degradación de este compuesto a su metabolito el ácido aminometil

fosfónico (AMPA) y dióxido de carbono. El AMPA también es tóxico por lo que se lo ha incluido en los programas de monitoreo de aguas superficiales y se detecta con el mismo método analítico que el glifosato (Meyer y col., 2009). Este metabolito tiene una mayor persistencia ambiental que el glifosato, 76–240 (Battaglin y col., 2005) y se adhiere fuertemente a las partículas del suelo pudiendo alcanzar las corrientes de agua por escorrentía lo que eleva el riesgo de contaminación de acuíferos subterráneos (Romero y col., 2011).

### **1.6. Anfibios anuros como especies bioindicadoras**

Los organismos que componen el ecosistema se encuentran estrechamente relacionados al ambiente que habitan, pudiendo ser estos, especies indicadoras de lo que sucede con los contaminantes dispersos en el medio (**Figura 6**). En ecotoxicología, se identifican y estudian algunas de estas especies y se las considera “especie bioindicadora” ya que debido a su sensibilidad, posición en una comunidad, la probabilidad de exposición, su distribución geográfica y ecológica, puede utilizarse como un indicador del estado de los recursos y la calidad del medio (Lower y Kendall, 1990). Las especies tienen requerimientos físicos, químicos, de relaciones con otras especies y de estructura del nicho ecológico y hábitat (Wilhm, 1975). Cada especie o población presentan por lo tanto, determinados límites de estas condiciones ambientales entre las cuales pueden sobrevivir (límites máximos), crecer (límites intermedios) y reproducirse (límites más estrechos). Se ha establecido que, cuantos más estrechos sean los límites de tolerancia para una especie o población, más eficiente será su utilidad como bioindicador ecológico. Por lo tanto, preferentemente se busca que estas especies sean abundantes, sensibles al cambio del medio de vida, fáciles y rápidas de identificar, bien conocidas y estudiadas en su ecología y ciclo biológico, y con poca movilidad (Wilhm, 1975). Teniendo en cuenta las características de los anfibios como su ciclo de vida bifásico, marcada permeabilidad en su piel, restringida área de acción o *home-range* y limitadas habilidades de dispersión, se los consideran buenos indicadores de la salud del ecosistema terrestre y acuático, siendo particularmente vulnerables a las perturbaciones o modificaciones del ecosistema (USEPA, 2002; Burlibaşa y Gavrilă, 2011). Más aún, este grupo de vertebrados son capaces de revelar las consecuencias ante la exposición a determinados elementos, mezclas o sustancias ajenas a su entorno, lo que se visualiza en cambios individuales en su nivel químico, fisiológico y de comportamiento, y que a su vez, compromete su supervivencia (Newman y col., 2007).

La evaluación del impacto de los contaminantes dispersos en el medio ambiente sobre la salud de los organismos y ecosistemas acuáticos es un gran desafío debido a la participación e interacción de múltiples factores estresantes del ecosistema y la complejidad del mismo (Adams y col., 2005; Hook y col., 2014). No obstante, las fases acuáticas del ciclo de vida de los anfibios son muy utilizadas como modelos experimentales para investigaciones ecotoxicológicas (Mann y col., 2009; Sparling y col., 2010; Salgado y col., 2016; Sansiñena y col., 2020) por su sensibilidad, homogeneidad, abundancia, desarrollo externo y otras características morfológicas y fisiológicas (McDiarmid y Altig, 1999; Greulich y Pflugmacher, 2003; Egea-Serrano y col., 2012).

### **1.6.1 Biomarcadores más usados para estudio de riesgo ecotoxicológico en anuros**

Un biomarcador se define como una variable bioquímica, fisiológica o anatómica determinable en un organismo, cuya detección y/o magnitud indica la presencia de uno o varios contaminantes (Rodríguez, 2006; **Figura 6**). De acuerdo a esta definición, los biomarcadores son indicadores de alerta temprana que tienen el potencial de detectar un efecto en el organismo evaluado antes que se produzcan daños a nivel poblacional, comunidad o ecosistema (Adams y col., 2005). Se emplean como herramientas que pueden utilizarse para definir la relación, si la hay, entre la exposición a xenobióticos y un efecto deletéreo (Mussalli-Galante y col., 2013). Su amplio uso en el campo de la ecotoxicología radica en la sensibilidad de estos para detectar una exposición y los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, permiten identificar a los individuos sensibles de una población, determinar las consecuencias biológicas de la exposición y definir las decisiones más apropiadas para intervenir desde diferentes ámbitos, tanto a nivel individual como ambiental.

Para indicar respuestas a nivel poblacional, se utilizan biomarcadores de los niveles más bajos de organización biológica, esto es a nivel celular y molecular (Kendall y col., 2005). Los biomarcadores moleculares y celulares, pueden poner en evidencia la ocurrencia de una exposición tóxica o de efectos adversos, o comportarse como indicadores de susceptibilidad de un individuo dado o una población ante una exposición (Carballo y Mudry, 2006).





**Figura 6.** Relación entre las especies bioindicadoras y los diversos niveles de organización biológica (modificado de Prat y col., 2009)

La selección de un biomarcador que evalúe y determine la naturaleza del impacto de los xenobióticos en un organismo expuesto se basa en los criterios importantes de especificidad, sensibilidad, relevancia, factibilidad, y variación interespecífica y estacional (Mudry y Greizerstein, 2006).

Se han desarrollado diferentes tipos biomarcadores que permiten evaluar el estado poblacional de los anfibios frente a distintas situaciones ambientales, los cuales al ser estimados a lo largo del tiempo pueden brindar información valiosa para la toma de decisiones en los programas de monitoreo biológico (USEPA, 2002; Sánchez-Hernández, 2003; Lajmanovich y col., 2010). Los principales biomarcadores empleados en anfibios son los biomarcadores de exposición, que indican la presencia de una sustancia exógena, su metabolito o el producto de una interacción de un agente xenobiótico con células o moléculas blanco, que puede ser medida en distintos compartimentos del organismo. Desde el punto de vista toxicológico y predictivo, estos biomarcadores son muy eficientes para la detección temprana. Cuanto mayor distancia exista entre el biomarcador de exposición y el efecto deletéreo, mayor será el margen con que se cuenta para intentar remediar o



revertir el potencial peligro que implica la presencia de tal o cual contaminante (Rodríguez, 2006).

A continuación, se describen los biomarcadores de efectos evaluados en esta tesis doctoral: biomarcadores enzimáticos; biomarcadores etológicos y biomarcadores hormonales.

#### **1.6.1.1. Biomarcadores enzimáticos**

La exposición potencial de plaguicidas en el medio ambiente puede estimarse por medio de monitorización ambiental, mientras que la exposición o absorción individual de estos y sus metabolitos pueden ser estimadas mediante monitorización biológica de fluidos y tejidos corporales empleando el análisis de muestras biológicas, como sangre y tejidos, entre otros. Una amplia variedad de contaminantes tienen la capacidad de alterar la actividad de diferentes enzimas endógenas, las cuales pueden ser utilizadas como biomarcadores de exposición. Los biomarcadores enzimáticos, también conocidos como metabólicos, indican cambios en la actividad normal de diferentes enzimas asociadas a las funciones de hidrolización y detoxificación de los contaminantes químicos (Mohammad y Garza Almanza, 2007). Las enzimas son moléculas orgánicas presentes en sangre o tejidos que actúan como catalizadores de reacciones químicas cuyas características principales son la alta especificidad y velocidad de reacción, generando cambios en el organismo (Grisham y col., 1999). Muchas enzimas presentan una elevada especificidad tisular, es decir, que el receptor específico para determinada enzima se encuentra sólo en determinado tipo de célula de determinado tejido u órgano y no en otro (Grisham y col., 1999; Vasseur y Cossu-Leguille, 2003). En efecto, dependiendo de la rapidez con la que se ven alteradas por la especificidad del tejido de origen (Vasseur y Cossu-Leguille, 2003), brindan información valiosa para poder predecir y prevenir efectos adversos ante la exposición a diferentes xenobióticos (Lionetto y col 2013; de Araujo y col., 2016; Leonzio y col., 2020). El análisis con biomarcadores enzimáticos se realiza mediante la combinación de una enzima específica con su sustrato (la sustancia que la enzima convierte) y monitorean el resultado.

Las alteraciones en la actividad enzimática pueden resultar en una disfunción de la fisiología normal de las células, con consecuencias diversas a corto y/o largo plazo dependiendo de la severidad del daño inducido (Angel y Angel, 2000). En los estudios de ecotoxicología, se han desarrollado varias técnicas bioquímicas que permiten determinar el nivel de incremento o inhibición de las enzimas asociadas a la detoxificación de agroquímicos, brindando mayor comprensión sobre los efectos adversos de los

agroquímicos sobre diferentes organismos vertebrados (Venturino y col., 2003; Venturino y Pechen de D'Angelo, 2005; Poletta y col., 2011; Lajmanovich y col., 2019; Taha y Mohammed, 2021; Molayemraftar y col., 2022).

Para determinar la valoración enzimática, se hace necesario considerar los siguientes aspectos:

a) Distribución de las enzimas: conocer la topología enzimática frente a un aumento de una enzima contribuye a saber qué correlación o significado biológico tiene.

b) Localización de las enzimas dentro de la célula: este punto se considera relevante para poder entender qué tipo de daño sufrió la célula. Por ejemplo, si se halla un incremento de enzimas citoplasmáticas, podría considerarse que tal alteración no es lo suficientemente severa, pero si además se incrementan los niveles de actividad de las enzimas mitocondriales de un tejido en particular, podríamos estar ante un foco necrótico que contribuye al pasaje de aquellas enzimas que solamente aparecen en sangre en casos de necrosis intracelular.

c) Conocer el tiempo de vida media de la enzima evaluada: este aspecto es requerido para poder interpretar los tiempos de desaparición de esas actividades enzimáticas alteradas. Por ejemplo, si el aumento plasmático de una enzima de vida media larga, lleva más tiempo la normalización de sus valores desde el momento de su entrada al plasma; en cambio, si se incrementan los valores de cierta enzima cuya vida media es corta, esta se normaliza más rápidamente.

A continuación se desarrollarán aquellas enzimas utilizadas en este trabajo como biomarcadores enzimáticos: acetilcolinesterasa (AChE) y glutatión-S-transferasa (GST).

#### **1.6.1.2. Acetilcolinesterasa**

Un grupo de enzimas de gran interés en estudios de ecotoxicología son las esterasas, cuya actividad consiste en catalizar la hidrólisis de ésteres fosfóricos, de fosfatos, carboxílicos y amidas. Particularmente, las colinesterasas (ChEs) son un grupo de hidrolasas pertenecientes a las B-esterasas, conocidas por su elevada susceptibilidad a la exposición de compuestos organofosforados (OP; Aldridge, 1953). Debido a esta propiedad, la inhibición de las ChEs se usa comúnmente como un índice de exposición a pesticidas en los programas de biomonitoreo (Walker, 2001; Sanchez-Hernandez y col., 2001). En vertebrados, las ChEs aparecen desde etapas muy tempranas del desarrollo

embrionario antes de la sinaptogénesis, lo cual sugiere que estas enzimas pueden tener diferentes funciones (Sánchez-Chávez y col., 2008). Las ChEs se encuentran clasificadas de acuerdo a sus características bioquímicas y fisiológicas en dos grupos principales: acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7) y butirilcolinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8), ambas codificadas por diferentes genes. La AChE es predominante en eritrocitos y terminaciones de nervios colinérgicos (Szelenyi y col., 1982; Sturm y col., 1999), en donde los niveles de BChE son menores, mientras que la BChE está presente principalmente en plasma, hígado, músculo liso y adipocitos (Lockridge y col., 1987; Walker y Thompson, 1991).

La AChE presenta funciones fisiológicas importantes, ya que participa en la regulación de la sinapsis colinérgicas del sistema nervioso, ganglios periféricos y de la placa terminal neuromuscular. Como integrante de la familia de las esterasas de serina, las AChE son capaces de hidrolizar ésteres de colina, tales como la acetilcolina (ACh), el principal neurotransmisor del sistema nervioso. La hidrólisis de ACh en acetato contribuye a regular la concentración de este neurotransmisor en la sinapsis neuronal. Debido a la importancia biológica que poseen, la AChE ha sido ampliamente utilizada en la evaluación de la exposición a plaguicidas. Se ha establecido que, la inhibición de esta enzima por plaguicidas con un mecanismo de acción anti-ChE podría originar una amplia gama de efectos críticos para los seres vivos (Sánchez-Chávez y col., 2008). Varios agentes químicos han demostrado tener un mecanismo de acción anti-ChE, entre ellos se pueden mencionar los OP, carbamatos y piretroides (Wheelock y col., 2008; Sánchez-Hernández, 2007), metales (Costa y col., 2007), detergentes (Nunes y col., 2005), hidrocarburos (Miyazawa y Yamafuji, 2005), productos farmacéuticos (Nunes y col., 2006; ), herbicidas como el 2,4D (Freitas y col., 2019; 2022) y formulaciones del herbicida glifosato (Lajmanovich y col., 2010; 2022; Pala y col., 2019; Bernal-Rey y col., 2020).

#### **1.6.1.3. Glutation-s-transferasas:**

Las glutacion-s-transferasas (GST, EC 2.5.1.18) son una familia multigénica de enzimas citosólicas que participan en la detoxificación celular al intervenir en la conjugación de metabolitos electrofílicos con el tripéptido glutatión para producir un metabolito conjugado soluble en agua. Esta familia de enzimas se evidenció por primera vez en 1960 por Booth y col., (en Barros y Braun, 1996) y se estableció que presenta una actividad enzimática que cataliza la conjugación con el glutatión (Ketterer y col., 1986). Estas enzimas tienen funciones biológicas importantes ya que intervienen en la detoxificación hepática, los principales mecanismos de detoxificación de sustancias que

comprenden dos fases denominadas Fase I y Fase II. En la primera fase se realiza la transformación de los xenobióticos a través de una oxidación que los solubiliza. En la segunda fase, esas moléculas solubilizadas se conjugan con otras moléculas hidrofílicas que favorecen su pasaje al torrente sanguíneo y por consiguiente su eliminación renal. Las actividades de la GST también contribuyen a detoxificar el organismo de los compuestos endógenos como los lípidos peroxidados (Dejador y col., 1998) mediante la actividad del glutatión peroxidasa contra los peróxidos orgánicos (ejemplo: los acil-hidroperóxidos de los ácidos grasos libres) (Shreve, 1979 en Ketterer, 1986), pero a diferencia de la glutatión peroxidasa (GSH-Px) las GST no reducen el peróxido de hidrógeno (Miyaura y col., 1988). Otra de las funciones de las GST es la unión no enzimática, en este sentido, pueden unirse a ciertas toxinas y funcionar como proteínas de transporte, actuar como stockaje de moléculas como la bilirrubina, los colorantes azufrados, algunos grupos hemo y hormonas como T3 y T4 (Hayes y col., 1983; Ketterer y col., 1986; Hayes y col., 2005), actuando también en la degradación de tirosina, entre otras funciones (Hayes y col. 2005). Debido a estas propiedades, anteriormente las GST se denominaron “ligandina” (Litwack y col., 1971). En vertebrados, las GST se encuentran en mayor medida en el hígado, el riñón, la mucosa intestinal y los eritrocitos, probablemente debido a que son los tejidos más expuestos a los radicales libres (Whalen y Boyer, 1998; Glisic y col., 2015).

Las altas concentraciones intracelulares de GST junto con su distribución celular específica les permiten funcionar como biomarcadores para localizar y monitorear lesiones en tipos de tejidos y células definidas. Ha sido comprobada la utilización de la actividad de GST como un biomarcador de muchos contaminantes diferentes como los OP, los carbamatos, el arsénico y herbicidas como el 2,4D y el glifosato (Yamano y Morita., 1995; Jokanovic, 2001; Lajmanovich y col., 2019; Freitas y col., 2022). Debido a que el estrés oxidativo es un componente importante en el mecanismo de toxicidad de varios compuestos OP, como el glifosato (Yang y col., 1996), varios trabajos realizados en anfibios sugieren que una disminución de la actividad enzimática de GST está asociado con el estrés oxidativo y la citotoxicidad de los xenobióticos prooxidantes (Hazarika y col., 2003; Lushchak y col., 2009).

### **1.6.2. Biomarcadores etológicos**

Los biomarcadores etológicos o comportamentales constituyen un grupo de indicadores subletales de especial interés en trabajos de evaluación ecotoxicología acuática, destacados por su sensibilidad (Eissa y col., 2006). El comportamiento es un rasgo esencial

de los organismos que juega un papel clave en los procesos de adaptación biológica, estableciendo un vínculo entre los organismos y el medio, es decir, entre el sistema nervioso y el ecosistema en el que habita (Little, 1990; 2002; Marentette y col., 2012; Hartmann y col., 2016; Sarasamma y col., 2020). Para la aplicación de este biomarcador, resulta relevante determinar en primer instancia el perfil de la actividad o nivel basal de los parámetros indicadores seleccionados para evaluar, y, en una etapa posterior, determinar y comparar los cambios ocurridos en ellos debido a las condiciones desafiantes en el medio estudiado (Eissa y col., 2006). En peces se han evaluado los parámetros natatorios “normales” en términos de su velocidad de natación (Trenti y col., 1999; Gómez y Ferriz, 2002); actividad natatoria y la ubicación espacial en condiciones de laboratorio (Eissa y col., 2003; 2005; Portruneli y col., 2021). En larvas de anfibios, la actividad natatoria relacionada de manera positiva con el tiempo destinado al forrajeo indica un mayor tiempo de alimentación conforme se incrementa la actividad natatoria (Semlitsch, 1993; Horat y Semlitsch, 1994). No obstante, la actividad natatoria relacionada de forma negativa con la tasa de depredación indicaría un menor tiempo de forrajeo de la larva (Relyea, 2002; 2003b; 2007), lo que para algunas especies conforma una estrategia fundamental para disminuir la tasa de depredación (Relyea, 2001a; 2003a). En este sentido, la disminución en el tiempo de alimentación por la presencia de depredadores podría impactar negativamente sobre el crecimiento y desarrollo de las larvas de anfibios (Skelly, 1992; Van Buskirk, 2000). Al alcanzar la metamorfosis, un tamaño corporal menor implicaría un mayor riesgo de mortalidad y un mayor tiempo para lograr la madurez reproductiva, la reducción del tamaño en el período reproductivo se asocia también a una disminución en el éxito de apareamientos y reducción de tamaño de puestas de huevos (Berven y Gill, 1983; Smith, 1987; Semlitsch y col., 1993; Altwegg y Reyer, 2003).

La ecotoxicología conductual es un área de estudio emergente que tiene como objetivo detectar y cuantificar los efectos de los estresores ambientales (físicos, químicos o biológicos) sobre las respuestas etológicas de los organismos (Broomhall, 2005; Denoël y col., 2010) antes de que se produzcan alteraciones sobre las funciones vitales y reproductivas de los organismos (Brunelli y col., 2009; 2010; Sievers y col., 2018; Freitas y col., 2019). Inicialmente se empleaban evaluaciones cualitativas del comportamiento, por ejemplo, observaciones de movimientos aberrantes en renacuajos expuestos (Sanzo y Hecnar, 2006; Collins y Russell, 2009), aunque actualmente se utilizan cada vez más los análisis cuantitativos (Bayley, 2002; Peltzer y col., 2013, 2019). En este sentido, se emplean herramientas computacionales, cuadrículas, cronómetros, observaciones directas o grabaciones de video para evaluar la performance y patrones comportamentales en cuanto a la actividad de movimiento (Laurila y col., 2006), velocidad (Chen y col., 2009), el uso

del espacio (Saglio y col., 2001) y agudezas olfatorias (Mandrillon y Saglio, 2007) en organismos bajo condiciones estresantes.

La importancia ecotoxicológica de las respuestas comportamentales de los organismos radica en la posibilidad de relacionar una multiplicidad de alteraciones fisiológicas con procesos ecológicos a través de cambios en el comportamiento individual (Amiard-Triquet, 2009; Ågerstrand y col., 2020; Mena y col., 2022). Los cambios en el comportamiento se han establecido como excelentes biomarcadores de detección precoz, ya que muchas de las respuestas comportamentales pueden manifestarse inmediatamente después de la exposición a un xenobiótico (Eissa y col., 2006; Saidani y col., 2019). La sensibilidad y rapidez con la que el comportamiento de un individuo o población pueden cambiar luego de la exposición y, la facilidad con la cual se pueden observar y medir de forma no invasiva ni destructiva, son características que contribuyen a utilizar los cambios etológicos como buenos biomarcadores (Ferrando y Andreu-Moliner, 1993; Scott y Sloman, 2004; Brodin, 2014; Li y col., 2020; Yang y col., 2021). Si bien los cambios comportamentales post-exposición aportan información valiosa sobre el mecanismo de acción de los químicos evaluados, se recomienda realizar estas determinaciones conjuntamente con otros biomarcadores de toxicidad ya establecidos (Scott y Sloman, 2004).

Debido a que la función fisiológica influye en los cambios de comportamiento, es probable que los efectos producidos por factores estresantes en la fisiología afecten el comportamiento de los organismos. Un estudio realizado en larvas de la *Rana temporaria* expuesta a concentraciones subletales del plaguicida organoclorado endosulfan, demostró la alteración de funciones esenciales como la alimentación, locomoción y la respiración (Denoël y col., 2012). Otras modificaciones halladas con un nivel mayor de complejidad luego de la exposición a agroquímicos formulados (Eissa y col., 2003) asocian las alteraciones etológicas respecto a la depredación (Bridges, 1999), relaciones sociales (Amiard-Triquet, 2009; Junges y col., 2012; Curi y col., 2022), dispersión (Cohn y MacPhail, 1996; Rohr y col., 2004), forrajeo (Lehman y Williams, 2010; Denoël y col., 2012) y la reproducción (Dingle y Holyoak, 2001; Marentette y col., 2012). Estas modificaciones podrían tener un impacto sobre los niveles de organización biológica mayores de comunidad y ecosistema (Dingle y Holyoak, 2001; García-de la Parra y col., 2006; Nørum y col., 2010; Morillo-Velarde y col., 2011).



### **1.6.3. Biomarcadores hormonales**

Las interacciones entre un organismo y el ambiente son procesadas internamente por el sistema neuroendócrino, de manera que, las glándulas endocrinas responden a los estímulos internos y externos mediante la producción de hormonas, que son mensajeros químicos secretados hacia el torrente sanguíneo por el cual circulan hasta llegar al órgano objetivo de su acción (Belfiore y LeRoith, 2018). Estos órganos presentan células superficiales que contienen receptores específicos que se acoplan a la hormona desencadenando o regulando el efecto deseado. Las hormonas son sustancias extraordinariamente eficaces en cantidades séricas muy pequeñas, cuyas concentraciones sólo se pueden medir con métodos analíticos sensibles, produciendo efectos en la estructura y función de una u otra parte del cuerpo (Ferreira, 2017). Las acciones hormonales varían ampliamente, pero pueden incluir la estimulación o inhibición del crecimiento, la inducción o supresión de la apoptosis, la activación o inhibición del sistema inmunitario, la regulación del metabolismo y la preparación para una nueva actividad o fase de la vida (Linkov y col., 2009).

Existe una amplia variedad de contaminantes que poseen la capacidad de perturbar el sistema hormonal de los organismos, definidos como disruptores endocrinos (DE). El estudio de los DE resulta de gran interés para la comunidad científica debido a que su presencia pone en riesgo la sanidad del ecosistema y a los potenciales efectos adversos sobre los organismos (Colborn y col., 1993; Deblonde y col., 2011). Los DE se definen como compuestos exógenos con la capacidad de alterar la homeostasis del sistema endocrino afectando la salud, la reproducción y el comportamiento de los organismos y de sus progenies (Zoeller y col., 2012). La OMS en su informe “*State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012*” (Bergman y col., 2013), sostiene que, los contaminantes más persistentes que actúan como DE, una vez liberados al medio ambiente pueden ser transportados por las corrientes de agua a lugares remotos, y muchos de ellos se pueden biomagnificar a través de las redes tróficas a niveles altos en los seres humanos y en otros grandes depredadores. Mientras que, los DE que poseen una vida media más corta en el medio ambiente, liberados regularmente a través de las depuradoras, la escorrentía agrícola y ganadera, se registran en altos niveles en las aguas potables y cuerpos de agua naturales.

El momento del ciclo de vida del organismo en el que se produce la exposición a los DE es importante definirlo en cada estudio, ya que las alteraciones de las funciones hormonales pueden producirse durante todas las etapas de desarrollo de los seres vivos: desarrollo embrionario, crecimiento, madurez reproductiva, vida adulta y avanzada. Varios estudios han observado una mayor peligrosidad en la exposición durante el

desarrollo embrionario, ya que en esta etapa se puede alterar el desarrollo de determinados órganos y vías de regulación, ocasionando efectos permanentes que pueden manifestarse en etapas posteriores de la vida (Lyche y col., 2011). Durante las etapas de desarrollo estos compuestos pueden tener efectos permanentes cuando la exposición tiene lugar durante el periodo en el que se está desarrollando un tejido específico y que se manifiesten luego de la metamorfosis; mientras que, en la etapa adulta su acción tiene lugar en el periodo de tiempo en el que se produce la exposición, disminuyendo los efectos cuando termina dicha exposición (Bergman y col., 2013).

Dada la participación en la regulación de la homeostasis en los organismos, la cuantificación de las hormonas séricas representa un valor diagnóstico esencial para la identificación de efectos de los DE producto de los factores de estrés ambiental de origen antropogénicos (contaminantes químicos) o naturales (hipoxia, salinidad) (Thibaut y Porte, 2004; Thomas y col., 2006). Los organismos acuáticos son uno de los principales afectados por estos disruptores en el medio ambiente, principalmente porque muchos de los compuestos con capacidad de DE que se utilizan en la agricultura pueden ser lixiviados durante la temporada de lluvias, alcanzando aguas superficiales y una diversidad de organismos no objetivos. Lo más preocupante es que estos compuestos afectan la salud de los organismos en concentraciones consideradas bajas a nivel ambiental, que no causan mortalidad directa de individuos, pero provocan una serie de consecuencias en el sistema endocrino tras prolongadas exposiciones, lo que conduce a una disminución de la respuesta inmunitaria, el metabolismo energético, la capacidad osmorreguladora y sistema reproductivo (Mnif y col., 2011). Algunos DE pueden interactuar con el sistema tiroideo, entre ellos el triclosan (Helbing y col., 2010), bifenilos policlorados (Gutleb y col., 2000), metoxicloro (Fort y col., 2004), el arsénico y el glifosato (Lajmanovich y col., 2019) entre otros (de Souza y col., 2017).

#### **1.6.3.1. Hormona cortisol como biomarcador hormonal en anfibios**

Las hormonas glucocorticoides (GC) han sido una de los principales biomarcadores fisiológicos más ampliamente utilizados para la evaluación de las condiciones individuales y poblacionales (Tarlow y Blumstein, 2007; Busch y Hayward, 2009; Hansen y col., 2016). Los GC tales como el cortisol y la corticosterona, son hormonas esteroides secretadas por el eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal/interrenal (HPA/I) de los vertebrados, que en anfibios es hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA), para regular el equilibrio energético, la homeostasis y el crecimiento a niveles basales (McEwen y Wingfield, 2003). Con elevada especificidad, los niveles de estas hormonas pueden elevarse para reforzar las acciones del sistema nervioso simpático sobre el aparato circulatorio y contribuir al aumento de los



niveles de glucosa en sangre ante una situación de emergencia preparando al individuo para la reacción defensiva (Spencer y col., 2001; Wingfield y Kitaysky, 2002), por lo que alteran el comportamiento y actúan sobre las compensaciones de la historia de vida para aumentar la aptitud física (Sapolsky y col., 2000; Breuner y col., 2008; Crespi y col., 2013). Los animales expuestos a perturbaciones crónicas suelen exhibir niveles basales de hormonas de estrés elevados, pero respuestas de estas amortiguadas a nuevos factores estresantes, pueden afectar negativamente los rasgos relacionados con la aptitud física (Romero, 2004; Rich y Romero, 2005). Por lo tanto, el uso de estas hormonas como biomarcador de estrés fisiológico es una herramienta de conservación de gran utilidad (Cooke y col., 2013; Madliger y col., 2016; Denver y col., 2021). En anfibios anuros, la corticosterona es el GC predominante (Macchi y Phillips, 1966), seguido del cortisol (Denver y col., 2021). La determinación de corticosterona en estos organismos ha sido ampliamente utilizada como biomarcador de estrés fisiológico frente a diferentes estresores ambientales, como la salinidad (Tornabene y col., 2021), acidez, presencia de depredadores y herbicidas a base de glifosato (Burraco y col., 2016; Gabor y col., 2019; Denver y col., 2021). El cortisol también es regularmente empleado como un biomarcador para evaluar el estado de salud de animales silvestres (Busch y Hayward 2009; Sheriff y col., 2011). Principalmente en renacuajos prometamórficos, las hormonas del estrés generan un aumento en el forrajeo y en la movilización de las reservas de energía, que a su vez puede acelerar el crecimiento y el desarrollo (Crespi y Denver 2004; Crespi y col., 2013). En ese contexto, la activación del eje HHA y la liberación de corticosterona y cortisol pueden ser de una importancia vital a la hora de evitar el ataque de predadores (Wingfield y col., 1997; Orchinik, 1998). Existe además una relación todavía no muy bien establecida entre las hormonas GC y las hormonas tiroideas como la tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) que regulan el desarrollo y metamorfosis en larvas de anuros (Hayes, 1997; Wells, 2007).

### **1.6.3.2. Hormona tiroidea como biomarcador hormonal en anfibios**

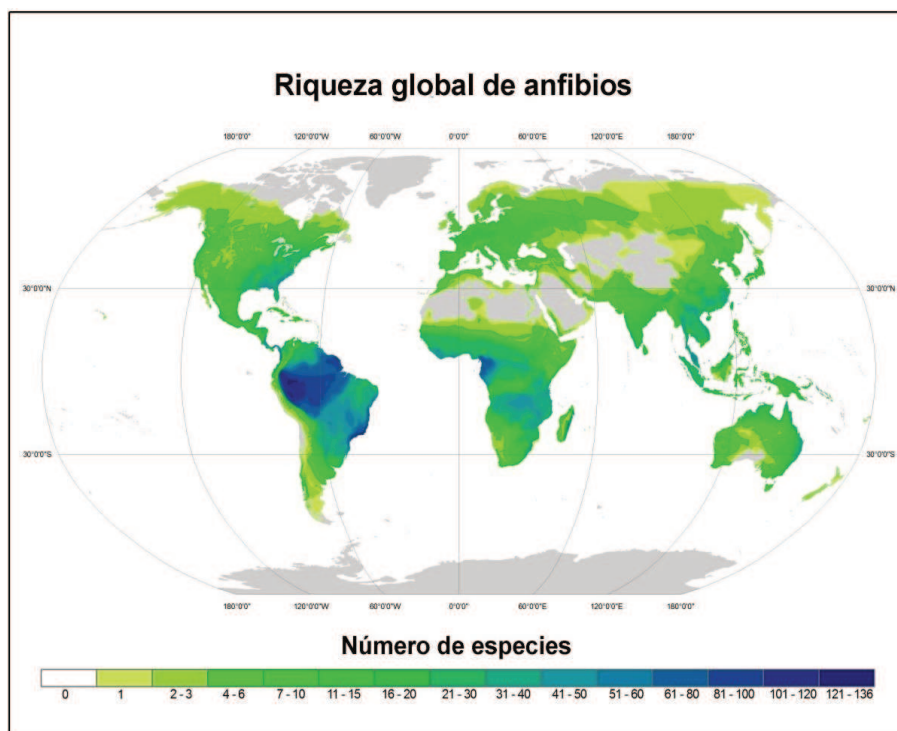
El impacto del estrés ambiental en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides es de especial preocupación para los anfibios, ya que su metamorfosis está regulada principalmente por las hormonas tiroideas (TH) (Denver y col., 2002; Furlow y Neff 2006; Tata, 2006). La metamorfosis en renacuajos se dispara cuando la TH es secretada en la glándula tiroides, y su concentración aumenta durante este período determinando la tasa de desarrollo (Shi, 2000; Brown y Cai 2007). Desde principios del siglo pasado se ha demostrado la función esencial de esta hormona, ya que desencadena procesos en distintos órganos y tejidos como la proliferación, muerte, diferenciación tisular o migración celular. Si bien no es la única hormona involucrada en este fenómeno, su ausencia impide que se continúe con el programa normal de desarrollo y que la metamorfosis se complete. En el desarrollo de los vertebrados en general, las TH son de particular importancia para el desarrollo normal del cerebro (Bernal, 2002; Anderson y col., 2003; Ahmed y col., 2008). La mayoría de sus acciones están mediadas por los receptores TH (TR), factores de transcripción nuclear que se unen a los elementos sensibles a TH (TRE) en la región promotora de una amplia variedad de genes. Para la mayoría de los genes sensibles a TH, los TR sin ligando reprimen la transcripción de genes, mientras que la unión a hormonas conduce a la activación de genes. Dado que el ligando principal de los TR es la triyodotironina (T3), la disponibilidad intracelular de T3 es un factor clave en la regulación de los procesos mediados por TH. La actividad de la glándula tiroides, que secreta predominantemente tiroxina (T4) y, en menor medida, T3, es un nivel en el que se controla la disponibilidad de T3. A nivel periférico, los transportadores de TH y las enzimas metabolizadoras de TH regulan los niveles de T3 intracelular de forma específica para cada tejido.

Se ha establecido que la presencia de depredadores (Relyea 2002; Capellán y Nicieza 2007), hacinamiento (Morey y Reznick 2001), riesgo de desecación (Gervasi y Foufopoulos 2008), escasez de alimento (Kupferberg, 1997) y temperatura (Smith-Gill y Berven 1979; Ruthsatz y col. 2018a) aumentan la producción de TH al activar el eje de estrés neuroendocrino. Evaluaciones realizadas en las larvas de anuros con altos niveles de TH han reportado mayores tasas metabólicas y de desarrollo y menores tasas de crecimiento (Rowe y col. 1998; Brown y Cai, 2007), resultando en períodos larvales más cortos, menor tamaño al inicio de la metamorfosis y mayor costo energético (Denver, 1998, 2009; Orlofske y Hopkins 2009). Más aún, durante las primeras etapas de la vida, la exposición a los disruptores de la tiroides puede afectar la capacidad de los renacuajos para responder adecuadamente al estrés generado por el aumento de la temperatura ambiente. Las etapas más tempranas de la vida podrían ser especialmente sensibles al doble

estrés que genera la presencia de disruptores tiroideos junto con otras variables incrementadas por el cambio climático global (temperatura, precipitación, salinidad, pH), ya que el sistema dependiente de la tiroides en los renacuajos aún no está completamente formado, pero es crucial para el desarrollo normal de las ranas adultas (Hooper y col., 2013). Dada la información valiosa que aportan las hormonas TH sobre los mecanismos *in vivo* que ocurren a lo largo de las etapas de desarrollo en los renacuajos (Lajmanovich y col., 2019) y que la alteración en su equilibrio provoca cambios estructurales y funcionales en los tejidos y la fisiología de los mismo (Fort y col., 2000; Tietge y col., 2005; Iwamuro y col., 2006; Miyata y Ose, 2012; Freitas y col., 2016; Ruthsatz y col., 2018), resulta de interés particular evaluar el efecto producido por la exposición al agente químico glifosato en presencia y ausencia de un depredador natural de los renacuajos.

### **1.7. Problemática de la anfibiafauna de la región asociada a los agroecosistemas**

Los anfibios son vertebrados tetrápodos ectotérmicos de la clase Amphibia con tres órdenes actuales que corresponden a Anura, Urodela y Apoda. La riqueza global de anfibios es de aproximadamente 8.000 especies, de las cuales casi el 90% son anuros. Los anfibios son un componente fundamental de la mayor parte de los ecosistemas terrestres y de agua dulce (**Figura 7**). Es un grupo muy abundante y diverso que cumple una amplia gama de funciones ecológicas siendo un eslabón fundamental en el flujo de materia y energía entre los ecosistemas acuáticos y terrestres, por lo que la pérdida o disminución de sus poblaciones silvestres afecta ampliamente a otros organismos de la biocenosis en particular y al ecosistema en general (Wyman, 1990; Blaustein y Wake, 1995; Lanno y col., 2005; McCallum, 2007; Collins, 2010; Blaustein y col., 2011; 2012; 2018).



**Figura 7.** Riqueza global de especies de anfibios (Lew, 2017).

Los anfibios anuros atraviesan las primeras semanas o meses de vida como larvas acuáticas mayormente herbívoras y ya siendo adultos, como carnívoros terrestres. En general, poseen una curva de supervivencia del tipo III (Deevy, 1947), con elevadas tasas de mortalidad durante el estado larval como consecuencia de diversos factores como desecación de los cuerpos de agua (Richardson, 2001, Davis y col., 2018), competencia (Brönmark y col., 1991), depredación (Úbeda y col., 2019) y contaminación (Marco y col., 2002; Vazquez y col., 2020; Sansiñena y col 2020). Sin embargo, las poblaciones de anfibios están disminuyendo a una tasa alarmante en todo el planeta con 35-148 especies ya extintas o posiblemente extintas y 2063-3630 amenazadas, lo que comprende alrededor de un 40% de las especies existentes y más de 200 veces mayor que la tasa de extinción de fondo (UICN, 2021). Dentro de las causas de esta disminución citadas con más frecuencia por la bibliografía especializada se señala a la pérdida de hábitat y a la contaminación (Blaustein y Blake, 1990; Stuart y col., 2004), sin embargo, muchas de las causas del declive global de los anfibios aún no son bien conocidas, y el tema es actualmente objeto de muchas investigaciones.

En nuestro país, el avance de la deforestación y agroecosistemas sobre la Región Pampeana, el Parque Chaqueño y montes nativos de la Región Chaqueña (Carrasco, 2012), ha provocado la transformación de ecosistemas naturales a agro-ecosistemas

artificiales con una fuerte reducción de la capacidad para realizar su propia regulación y disminución de las funciones y servicios ecosistémicos como consecuencia de la degradación natural por agroquímicos (Volante, 2014; Uddin, 2018). Asimismo, la elevada fragmentación de sus áreas destinadas al monocultivo de soja RR (Mónaco y col., 2020) conjuntamente con la pérdida de heterogeneidad ambiental marcó una significativa disminución de biodiversidad tanto local como regional (Viglizzo y col., 2003; Gavier-Pizarro y col., 2011; Macchi y col., 2020; Torres y col., 2021), contribuyendo al asentamiento de aquellas especies que logran ajustarse a la vida en parches agrícolas o mixtos (Dardanelli y col., 2006; Macchi y col., 2013; Nanni y Grau, 2017).

En la región centro-este de Santa Fe y centro-oeste de Entre Ríos, el avance agrícola-ganadero ha transformado además los ambientes del río Paraná Medio, donde la vegetación nativa se mantiene artificialmente en etapa herbácea o arbustiva a través de la siega o la quema con una disminución en su conectividad y cantidad de nichos ecológicos y afectando su estructura y capacidad de resiliencia (Peltzer y col., 2006). En este contexto de fragmentación de hábitat y degradación por agroquímicos, se ponen en evidencia los principales factores que podrían estar afectando la supervivencia de los anfibios anuros de la región. Particularmente en las áreas del valle de inundación del río Paraná Medio, son numerosos los trabajos que evaluaron el efecto de la fragmentación y la pérdida de hábitats sobre las poblaciones y comunidades de anuros (Attademo y col., 2005; Lajmanovich y Peltzer, 2001; Peltzer y Lajmanovich, 2001; 2004; 2007; Peltzer y col., 2003; 2005; 2006; 2008; Sanchez y col., 2009; 2011). Los reportes de estos estudios sobre la composición, diversidad y distribución de anuros en áreas mosaicos se encuentra asociada a la influencia de variables físico-químicas, biológicas y temporales del sitio como así también a la composición y estructura del paisaje. En cuanto a la diversidad de especies en el río Paraná Medio, al menos 34 especies de anfibios anuros habitan en las áreas riparias, cuyas familias principales son seis: Bufonidae, Leptodactylidae, Cycloramphidae, Ceratophryidae, Hylidae y Microhylidae (Bridarolli y di Tada, 1994; Lajmanovich, 2000; Peltzer y Lajmanovich, 2004; 2007; Ghirardi y Lopez, 2014).

Por su parte, trabajos realizados en los agroecosistemas sojeros de Entre Ríos y Santa Fe han reportado la capacidad de estas áreas para albergar una elevada dominancia de especies que poseen hábitos de vida particulares como ser especies terrestres y semi-acuáticas en relación a aquellas de hábitos arbóreos o acuáticos, las cuales poseen menor representación y equitatividad en esta región (Attademo y col., 2005; Peltzer y col., 2005; 2006). Estos estudios podrían estar sugiriendo que tales especies poseen la capacidad de ajustarse a los disturbios de fragmentación antrópica a través de distintas respuestas

ecológicas, etológicas y bioquímicas y volverse dominantes en sitios donde antes no lo eran (Lajmanovich y col., 2009; 2010; Burraco y col., 2017). Otros trabajos realizados en la misma región han detectado la presencia de residuos de plaguicidas clorados (Lajmanovich y col., 2002; 2005b), como así también individuos con malformaciones (Peltzer y col., 2001; Attademo y col., 2004; Peltzer y col., 2011) y con disgenesia testicular (Sanchez y col., 2009). Además, se ha demostrado la capacidad que tienen los AF utilizados frecuentemente en la región para producir disturbios en la homeostasis de numerosas especies de anuros nativos (Lajmanovich y col., 2003; 2005a, Cabagna y col., 2006, Peltzer y col., 2001; Attademo y col., 2004; Sanchez y col., 2009; Peltzer y col., 2011). Algunas formulaciones del herbicida glifosato han sido implicadas en la producción de modificaciones morfológicas aberrantes, alteraciones etológicas y respiratorias en larvas de *Scinax nasicus* (Lajmanovich y col., 2003). Los efectos genotóxicos de los insecticidas con formulaciones de endosulfán y cipermetrina sobre larvas de *Boana pulchella* (Lajmanovich y col., 2005a) y larvas de *Odontophrynus americanus* (Cabagna y col., 2006), respectivamente, dejan en evidencia la peligrosidad a nivel genético de estos compuestos sobre las primeras etapas del desarrollo de los anuros. Asimismo, existe creciente evidencia que relaciona al glifosato y sus formulaciones comerciales, con efectos endocrinos (Mnif y col., 2011; Thambirajah y col., 2019), enzimáticos (Lajmanovich y col., 2013), etológicos (Gabor y col., 2019) y morfológicos (Relyea, 2018) en anuros, aunque son escasos los trabajos que han buscado integrar los efectos etológicos y morfológicos con los procesos fisiológicos relacionados y el efecto del glifosato antes y después de la metamorfosis.

Varias especies de anfibios habitan en áreas abiertas comunes a la agricultura y el período reproductivo de muchas de ellas se restringe al verano cálido y lluvioso, que coincide con la mayor aplicación de plaguicidas en los cultivos (Lajmanovich y col., 2010; Moreira y col., 2012). Durante este período, donde las lluvias suelen ser intensas, se favorece la dispersión de los plaguicidas, los cuales tendrán mayor o menor movilidad de acuerdo a sus propiedades físico-químicas, alcanzando los cuerpos de agua por escorrentía (Romero y col., 2011). Determinaciones sobre sedimentos, partículas en suspensión y en cuerpos de agua superficiales, reportan la presencia de los insecticidas más ampliamente empleados en la región, como clorpirifos, cipermetrina y endosulfán (Jergentz y col., 2005; Peltzer y col., 2008) y de herbicidas como el glifosato (Peruzzo y col., 2008; Ronco y col., 2016) en concentraciones que exceden a las permitidas para de la vida silvestre y la fauna acuática (NGNCA, 2004a). En nuestra región, el herbicida glifosato se ha reportado en ambientes claves para la temporada de reproducción de los anfibios como en las charcas temporales y arroyos (Aparicio y col., 2013; Alonso y col., 2018; Lupi y col., 2019). La



gran expansión de la superficie cultivada en nuestro país y la consecuente intensificación de la producción mediante el uso de fertilizantes y pesticidas, ha conducido a una severa transformación gradual del paisaje, incluyendo la desaparición de muchos humedales donde los anuros viven y se reproducen, impactando directa e indirectamente sobre la herpetofauna regional. Asimismo, numerosas investigaciones alrededor del mundo demostraron los efectos negativos de diversa magnitud sobre el desarrollo normal de los anfibios anuros provocados por la exposición a AF, por citar algunos: McCoy y col., 2008; Rohr y col., 2008; Widder y Bidwell, 2008; Mann y col., 2009; Paganelli y col., 2010; Belden y col., 2010; Ezemonye y Tongo, 2010; Hayes y col., 2010; Webber y col., 2010; Relyea, 2012.

### **1.8. Rol ecológico de los anfibios anuros y la depredación como un factor de estrés ambiental**

La depredación juega una función clave en todos los ecosistemas debido a que regula la riqueza y abundancia de especies e involucra una transferencia de materia y energía entre seres vivos y los componentes abióticos del sistema. En términos generales, la depredación constituye una interacción directa y compleja entre dos o más especies, donde cada una de ellas puede influir sobre el crecimiento poblacional de la otra, y favorecer el establecimiento de nuevas coadaptaciones. Esta interacción (entre un depredador y su presa), a largo plazo contribuye a los procesos coevolutivos complejos que modifican la distribución espacial y temporal de los organismos y determinan la estructura y dinámica de las relaciones tróficas (Begon y col., 1996; Ferrari y col., 2010).

Los anfibios son altamente eficientes en la conversión de la energía ingerida en biomasa por lo que a menudo alcanzan altas densidades poblacionales y proporcionan una gran fuente de proteína para otros depredadores en niveles tróficos más altos (Burton y Likens, 1975; Pough 1980; 1983). Sin embargo, la estructura y distribución de abundancia de las comunidades de anuros está fuertemente influenciada por la depredación de individuos en estadio de huevos y larvas (Semlitsch y Gibbons, 1988; Azevedo-Ramos y col., 1999). En tales estadios, existe una variación espaciotemporal en el riesgo de depredación que puede deberse a cambios en la abundancia y riqueza de depredadores (Touchon y Vonesh, 2016). Los principales depredadores de larvas de anuros son peces, serpientes, tortugas, aves, otros anfibios anuros y urodelos y los insectos acuáticos (Wells, 2007). En principio, los peces al presentar una mayor capacidad natatoria y tácticas más eficientes de depredación, pueden considerarse como los organismos claves que regulan la

abundancia de anfibios en el ecosistema acuático en los que están presentes (Heyer y col., 1975; Hero y col., 1998; Orizaola Pereda., 2004). El riesgo de depredación está generado tanto por peces nativos como exóticos (Úbeda, 1998, Úbeda y Grigera, 2007), y en algunos casos, la depredación masiva ha provocado la completa extinción de las poblaciones (Kats y Ferrer, 2003; Kloskowski, 2009).

Los hábitos de vida y reproductivos de algunas especies de anfibios pueden asociarse a una estrategia para disminuir la depredación, por ejemplo, las especies que se reproducen en ambientes temporarios y semi-permanentes evitan la depredación por peces, aunque experimentan la depredación por una variedad de insectos acuáticos (Wilbur, 1997). Las larvas de coleópteros, nayades de odonatos y hemípteros son el principal grupo de insectos acuáticos que ocupan el rol de depredadores tope de larvas de anfibios en lagunas semi-permanentes, donde hay escasas de peces (Úbeda y col., 2019).

Asimismo, se han determinado varias adaptaciones inducidas por las larvas de anuros para evitar la depredación. Previo a la ovoposición, se ha documentado que hembras de varias especies, seleccionan los lugares de puesta de huevos en función de su percepción de la abundancia de depredadores en el medio acuático que habitan (Resetarits y Wilbur 1991; Touchon y Worley, 2015). Algunas especies poseen comportamientos complejos como ocultar los huevos, colocándolos sobre hojas de plantas acuáticas que luego de la ovoposición las pliegan y sellan alrededor de cada huevo o enterrándolos (Díaz-Paniagua 1989; 1992; 2005; Miaud, 1993). Pueden optar por cubrir los huevos con gelatinas compactas que los protegen de patógenos y pequeños depredadores (Gomez-Mestre y col., 2006; Porthault y col., 2007) o dotar a los huevos con sustancias tóxicas antidepredadores (Kats y col., 1988; Hanifin y col., 2003; Gunzburger y Travis, 2005). No obstante, durante la fase larvaria los anfibios generalmente no cuentan defensas o cuidado parental, por lo que han desarrollado sus propios mecanismos antidepredadores (Vazquez y col., 2017). Los embriones de algunas especies de anfibios anuros poseen la capacidad de percibir la presencia de depredadores y de reaccionar en consecuencia reduciendo considerablemente su tasa de actividad y así retrasar el momento de eclosión (Sih y Moore 1993; Anholt y col., 2000; Benard, 2004) o bien adelantarla (Gomez-Mestre y col., 2008; Warkentin, 2011) minimizando el riesgo de depredación. Si bien la estimulación del desarrollo en las larvas de anfibios por la presencia de depredadores favorece a una temprana metamorfosis disminuyendo el riesgo de depredación, muchas veces lo hacen a expensas de metamorfosear con un menor tamaño (Wilbur y Collins, 1973; Werner, 1986).



Estudios de etología han evidenciado casos en donde los depredadores de larvas de anuros inducen cambios en el comportamiento y fisiología de sus presas (Hero y col., 2001; Teplitsky y col., 2003; Barry y Syal, 2013; Burraco y col., 2013). En este sentido, la coexistencia parece estar asociada a ciertos mecanismos adoptados por parte de las larvas, donde estas reducen su tasa metabólica estándar (Barry y Syal, 2013), así como otros indicadores de actividad metabólica como la actividad de enzimas antioxidantes asociadas al catabolismo de lípidos (Burraco y col., 2013). Otro aspecto importante en las defensas inducidas por las larvas de anuros ante la presencia de depredadores son las alteraciones en el comportamiento (Skelly, 1994; Anholt y Werner, 1995; Richardson, 2001; Takahara y col., 2008, Curi y col., 2022) y la morfología que favorecen a su supervivencia (Smith y Van Buskirk 1995; Relyea, 2004; Van Buskirk, 2009; Velzaquez y col., 2017).

Las larvas son capaces de detectar señales químicas provenientes de sus depredadores, denominadas kairomonas (Ferrari y col., 2010). Cuando estas señales son detectadas por las larvas de anuros, algunas alteran su estructura morfológica con modificaciones a nivel del tamaño del cuerpo y cola y el peso entre otros (Gómez y Kehr, 2012; Kehr y Gómez, 2014). Además, muchas especies pueden tener variaciones en la pigmentación del cuerpo o de la cola (McCollum y Leimberger, 1997; Touchon y Warkentin, 2008; Gomez-Mestre y Diaz-Paniagu, 2011). La coloración críptica semejante a la del ambiente es otro recurso para algunas especies de renacuajos para pasar desapercibidos (Blair y Wassersug, 2000; Nomura y col., 2011; Polo-Cavia y col., 2017). Algunos estudios sugieren que los cambios morfológicos inducidos podrían influir sobre la capacidad natatoria de las larvas de anfibios, alcanzando una mayor velocidad de natación (Van Buskirk y McCollum 2000a; Wilson y col., 2005). Otros trabajos postulan que el cambio morfológico inducido debido a la presencia del depredador no estaría esencialmente vinculado con una natación eficiente (Van Buskirk y McCollum, 2000b) sino que estaría abocada a desviar el ataque del depredador hacia la cola, reduciendo así los daños en las partes vitales del cuerpo (Van Buskirk y col., 2004). Naturalmente, la posibilidad de supervivencia en las larvas y renacuajos depende de su capacidad para reconocer de manera precisa la presencia de depredadores a través de las señales o señales químicas que producen (Velzaquez y col., 2017). Se cree que las defensas inducidas surgieron y evolucionaron como una respuesta plástica adaptativa a la presencia de depredadores (Gotthard y col., 1995) con los que las larvas de anfibios han tenido una historia evolutiva de interacciones (Moore y col., 2004). En efecto, la introducción de depredadores invasores por el hombre en los medios acuáticos supone un grave riesgo para las presas de anfibios nativas, dado que éstas no logran activar las defensas innatas por no reconocer a las señales químicas, y por lo tanto, la especie introducida, como depredador

(Polo-Cavia y col., 2010; Gomez-Mestre y Diaz-Paniagua, 2011, Burraco y col., 2016). De la misma manera, la introducción de plantas exóticas (Burraco y col., 2018), la contaminación de los cuerpos de agua (Rohr y Crumrine, 2005; Relyea y Edwards, 2010; Polo-Cavia y col., 2016), pueden interferir en la interpretación de las señales químicas en las larvas de anuros ante la presencia de un depredador (Trotter y col., 2019). En efecto, no sólo la depredación modifica el equilibrio de las comunidades acuáticas, sino que, la presencia de contaminantes químicos de origen antrópico en la naturaleza también ejerce efectos indirectos sobre estas (Relyea, 2009).

### **1.8.1. La depredación en anfibios anuros en un contexto de contaminación**

Si bien son numerosas las investigaciones que evalúan el efecto de algunos contaminantes sobre algunas especies de forma individual, hasta el momento son escasos los estudios donde se evalúan interacciones ecológicas como la relación presa-depredador, el parasitismo o el mutualismo en un contexto de contaminación. Es por eso, que en las últimas décadas, existe una preocupación creciente sobre los efectos de interacción de ciertos factores de estrés, como la exposición a plaguicidas y la depredación en los ecosistemas acuáticos (Kerfoot y Sih, 1987; Liess y col., 2008; Puccinelli y col., 2011). En los anfibios, la contaminación y la depredación como factores de estrés pueden tener efectos indirectos que se manifiestan a nivel de comunidad (Relyea y col., 2005; Relyea, 2009). Estos efectos no se limitan en causar la muerte fisiológica de los organismos expuestos (Davidson, 2004; Fellers y col., 2004), sino que pueden impactar sobre su funcionamiento ecológico en un fenómeno definido como muerte ecológica (Scott y Sloman, 2004). Algunos de esos efectos indirectos en las larvas de anuros posterior a la exposición se asocian a cambios en el tiempo de metamorfosis (Boone y Bridges, 2003; Greulich y Pflugmacher, 2003; Rohr y col., 2004; Cauble y Wagner, 2005; Forson y Storfer, 2006; Boone, 2008), reducción en la alimentación (Widder y Bidwell, 2008), alteración de la actividad natatoria (Fordham y col., 2001; Punzo, 2005; Freitas y col., 2019), cambios en la relación con su depredador (Cooke, 1971; Jung y Jagoe, 1995; Relyea y Mills, 2001; Broomhall, 2004; Burgett y col., 2007), inhibición en la actividad enzimática (Venturino y Pechen de D'Angelo, 2005; Lajmanovich y col., 2009; 2011; Junges y col., 2010), alteración de parámetros bioquímicos (Barni y col., 2007; Cabagna-Zenklusen, 2012) y alteración en el material genético por la formación de micronúcleos (Lajmanovich y col., 2005a; Cabagna y col., 2006; Vera Candiotti y col., 2010; Bosch y col., 2011). En este sentido, cada vez son más los estudios que reportan efectos negativos de agroquímicos sobre el desarrollo normal de los anfibios anuros (McCoy y col., 2008; Rohr y col., 2008; Widder y Bidwell, 2008; Mann y col., 2009; Ezemonye y Tongo, 2010; Webber y col., 2010; Relyea, 2012; Freitas y col., 2019; 2022; Pelusso y col., 2021; da Silva Pinto y col., 2021; 2022. Particularmente, los estadios larvales son más susceptibles a los efectos de la exposición que los adultos, ya que poseen una elevada permeabilidad tegumentaria y a que su hábitat está estrictamente restringido a ambientes acuáticos (Semlitsch y col., 2000; Tejedo, 2003).

En cuanto a los estudios que evalúan la interacción entre exposición a plaguicidas y otro estresor ambiental, se ha reportado que el estrés causado por la escasa disponibilidad de alimentos o por una fuerte competencia, incrementa considerablemente la letalidad de

los contaminantes para las larvas de anfibios (Postma y col., 1994; Hanazato y Hirokawa, 2004; Beketov y Liess, 2005; Jones y col., 2011). De manera similar, se ha demostrado que en organismos expuestos a contaminantes con el estrés adicional de depredación, se produce una alteración de los parámetros hematológicos (Shutler y Marcogliese, 2011), disminución de la masa corporal (Relyea, 2012), generación de daño genotóxico en los anfibios (Giri y col., 2012) y un incremento en la toxicidad y letalidad de los pesticidas a los cuales se encuentran expuestos (Relyea y Mills, 2001; Relyea, 2003a; 2004; 2005; Campero y col., 2007). Se ha sugerido que este incremento de la letalidad, posiblemente esté asociada con la limitación de energía (Sokolova, 2013; Liess y col., 2016) y a que la exposición a pesticidas afectaría al reconocimiento de depredadores (Polo-Cavia y col., 2016) y a los mecanismos antipredatorios (Janssens y Stoks, 2012; Shuman-Goodier y Propper, 2016). Por ejemplo, algunos autores reportaron que concentraciones subletales de plaguicidas pueden afectar diferencialmente al depredador y a la presa, aumentando o reduciendo la intensidad de las tensiones naturales (Boone y Semlitsch, 2003, Junges y col., 2010) y consecuentemente, la composición de la comunidad ecológica (Reeves y col., 2010; Relyea y Edwards, 2010; Relyea, 2012). Naturalmente, efectos negativos en los depredadores producidos por químicos ambientales sería indirectamente positivo y beneficioso para la aptitud y dinámica de los anfibios (Boone y Semlitsch, 2003; Mills y Semlitsch, 2004; Relyea y col., 2005), siempre y cuando los efectos químicos directos sean subletales y mínimos para estos en comparación con los beneficios indirectos (Boone y Semlitsch, 2003). Dadas estas condiciones, se facilita el acceso a los recursos de alimentación para los renacuajos, lo que favorece su desarrollo, supervivencia y (Boone y Semlitsch, 2001; 2002; 2003; Bridges y Boone, 2003; Boone y col., 2004; Rohr y Crumrine, 2005; Boone y Bridges-Britton, 2006) y la metamorfosis (Boone y Semlitsch 2002). No obstante, tales eventos no parecerían ser del todo consistentes (Jansen y col., 2011; 2018). Un estudio reciente mostró que larvas de anfibios anuros expuestas al herbicida glifosato en realidad aumentó la defensa química antidepredadores (Bokony y col., 2017).

El glifosato es el agroquímico más utilizado a escala global y regional (representó alrededor del 62% del total de volumen de agroquímicos vendidos en 2014, CASAFE, 2014) y es frecuentemente hallado en los cuerpos de agua donde los anfibios se reproducen (Castro Berman y col., 2018; Lutri y col., 2019) lo que lo convierte en uno de los contaminantes de mayor interés para la ecotoxicología de anfibios. Considerando además los efectos de los AF previamente documentados sobre la población de los anfibios en la región centro-este de la provincia de Santa Fe, Argentina, que a su vez, alberga una gran diversidad de anuros, se proponen los siguientes objetivos e hipótesis:

## **2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **2.1. Objetivo general**

Determinar respuestas etológicas, morfológicas, enzimáticas y hormonales al stress en larvas de anuros del litoral mesopotámico argentino bajo la influencia de una formulación comercial de glifosato pre y post metamorfosis.

### **2.2. Objetivos particulares**

- 1) Caracterizar y comparar el comportamiento de tres especies de anfibios representativas del litoral fluvial en estudio en presencia y ausencia de depredadores.
- 2) Describir posibles respuestas morfológicas al stress a través de la morfometría geométrica.
- 3) Determinar los valores basales y de respuesta al stress de las hormonas cortisol, tiroxina y triyodotironina de las especies estudiadas pre y post metamorfosis.
- 4) Establecer los valores basales y de respuesta al stress de las enzimas acetilcolinesterasa y glutatión-s-transferasa de las especies estudiadas pre y post metamorfosis.
- 5) Evaluar los efectos del glifosato sobre el comportamiento de las larvas de anuros como posibles biomarcadores no destructivos de exposición al herbicida.
- 6) Determinar el/los biomarcador/es más adecuado/s según los distintos parámetros evaluados para las especies estudiadas.

### **2.3. Hipótesis**

Las respuestas etológicas, morfológicas, enzimáticas y hormonales al stress en larvas de anuros del litoral mesopotámico argentino son influenciadas pre y post metamorfosis por la exposición a la formulación comercial de glifosato.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudio y sitios de muestreo

Los sitios de muestreo para la obtención de presas y sus depredadores se encuentran ubicados en el centro-este de la provincia de Santa Fe, Argentina, que biogeográficamente es definida como región Neotropical. La provincia de Santa Fe, incluye en su superficie dos dominios y cuatro provincias fitogeográficas (Cabrera y Willink, 1973; Cabrera, 1994, Dinerstein y col., 1995):

- El Dominio Amazónico que incluye la Provincia Paranaense, representada por el Valle del Paraná en todo el margen este de la provincia de Santa Fe y oeste de la provincia de Entre Ríos
- El Dominio Chaqueño, que incluye a la Provincia Chaqueña en el norte, Provincia del Espinal en el centro y Provincia Pampeana en el sur

Por su parte, otros autores (Burkart y col., 1999) dividen a la provincia de Santa Fe en cinco ecorregiones: Pampas (al sur), Espinal (centro), Delta e Islas del Paraná al este), Chaco Seco (noroeste) y Chaco Húmedo (nordeste). En términos generales, el clima de la provincia de Santa Fe se caracteriza por poseer rasgos transicionales en sus condiciones térmicas y pluviométricas típicas tanto de los climas tropicales como de los templados con un gradiente de precipitaciones en sentido Este-Oeste (Biasatti y col., 2016). Al este, las precipitaciones anuales alcanzan los 800 mm y van disminuyendo hacia el oeste aunque en las regiones centro y el sur de la provincia las lluvias varían entre los 700 y los 900 mm (Biasatti y col., 2016).

Se trata de una región intensamente transformada por la actividad agrícola-ganadera, y los principales fragmentos de bosques riparios, pajonales y juncales generalmente ubicados en albardones, áreas deprimidas por la topografía de ésta área en períodos lluviosos varían en su grado de conectividad y antropización (Peltzer y col., 2006).

Los factores que determinan la diversidad de larvas anuros en cuerpos de agua de la llanura aluvial del río Paraná medio forman parte de una compleja red de relaciones que actúan conjuntamente y están fuertemente influenciadas no sólo por hábitat y limitación espacial, sino también por biología de las especies involucradas como su historia natural, sus rasgos reproductivos, los tipos funcionales y la distribución espacial (Peltzer y Lajmanovich, 2007). Los mismos autores citan un total de 34 especies de anuros

(Amphibia, Anura) para la ecorregión islas y deltas del Paraná, distribuida en seis familias Bufonidae, Leptodactylidae, Cycloramphidae, Ceratophryidae, Hylidae y Microhylidae.

El período completo de muestreo durante el cual se llevaron a cabo las actividades de campo desde el año 2016 al año 2020. Durante ese período, se realizaron inspecciones diurnas en ambientes acuáticos temporales, principalmente concentrados en la temporada reproductiva de anuros (primavera-verano), y en aquellas semanas con lluvias intensas. Las condiciones climáticas durante los cinco años de muestreo han sido heterogéneas y evidencian que en los últimos años, Argentina viene experimentando un aumento de temperaturas en casi todas las regiones con graves sequías especialmente en los periodos reproductivos 2018-2019 y 2020-2021 debido a la escasez de lluvias, lo cual produjo una notable disminución en la reproducción de anfibios y una reducción en la disponibilidad de depredadores (SMN, 2022).

Los cuerpos de agua seleccionados para la recolección de depredadores y presas, fueron seleccionados en áreas localizadas en el valle de inundación del río Paraná Medio, preferentemente con abundancia de especies de flora nativas y sin influencia directa de actividades agroindustriales (**Figura 8 A-F**):

- A. Cuerpos de agua temporales aledañas a Cayastá., ( $31^{\circ}10'10.84''S$  -  $60^{\circ}17'32.85''O$ )
- B. Laguna aledaña a ruta nacional N° 168 ( $31^{\circ}38'19,14''S$  -  $60^{\circ}39'47,1''O$ ), Cayastá, Santa Fe.
- C. Laguna origen pluvial ( $31^{\circ}33'23,4''S$  -  $60^{\circ}39'46,8''O$ ), La Guardia, Santa Fe.
- D. Parque Urquiza ( $31^{\circ}43'59''S$  -  $60^{\circ}31'7,3''O$ ), Paraná, Entre Ríos.
- E. Reserva Natural de Uso Múltiple Parque General San Martín ( $31^{\circ}40'29''S$  -  $60^{\circ}20'13''O$ ), Paraná, Entre Ríos.
- F. Parque del Sur ( $31^{\circ}39'51,7''S$  -  $60^{\circ}42'47,9''O$ ), Santa Fe, Santa Fe.



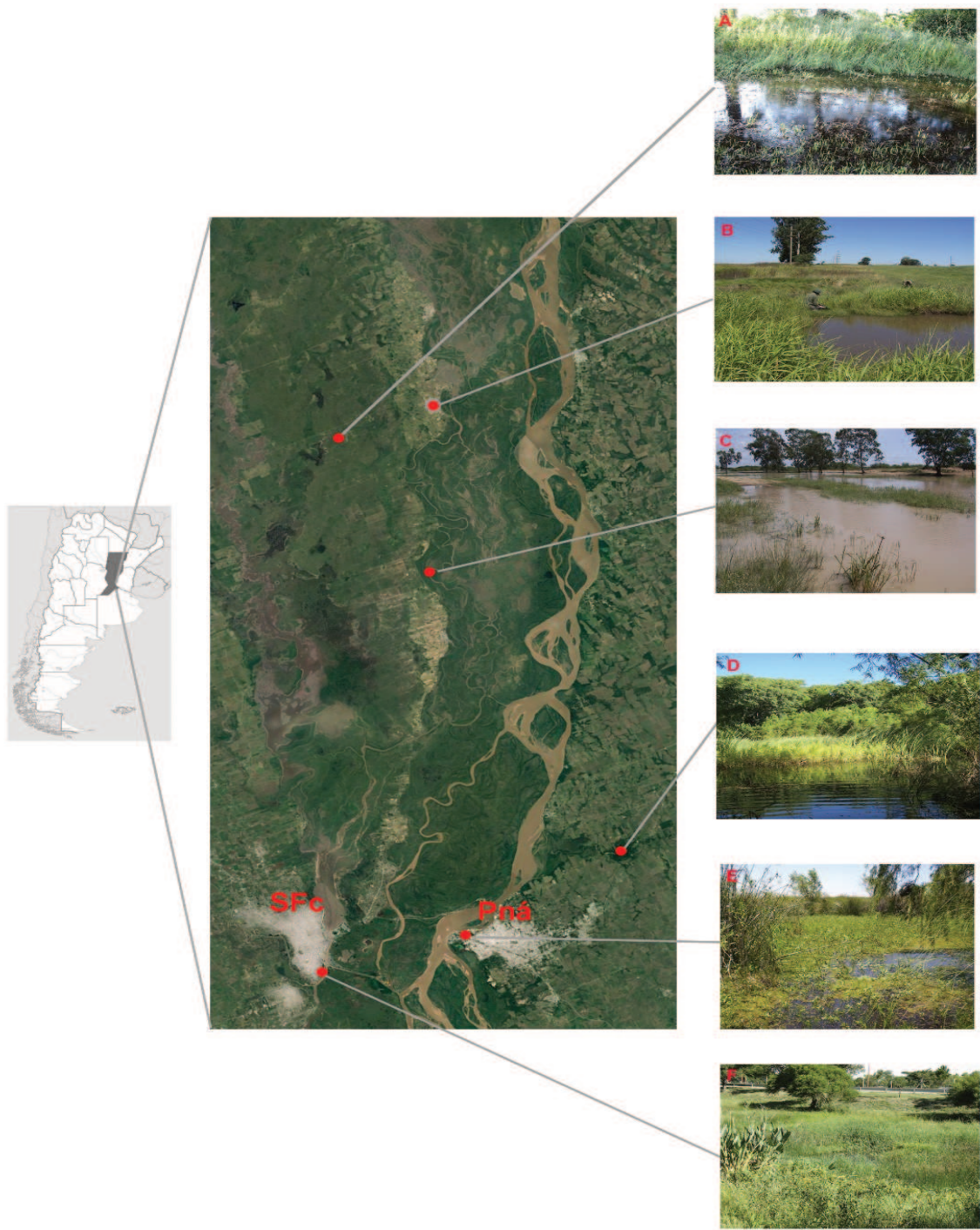
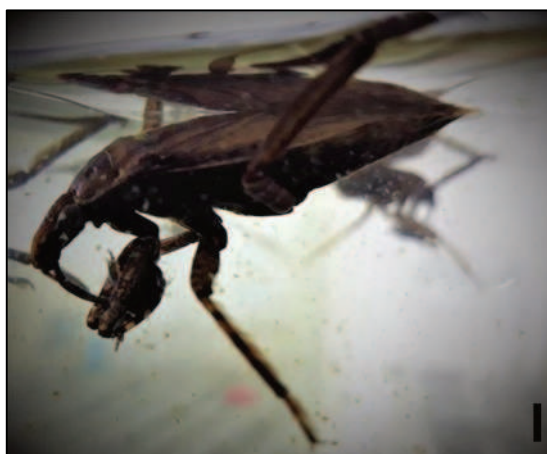


Figura 8. Área de estudio y sitios de colecta.

### 3.2. Selección y descripción de las especies

#### 3.2.1. Depredadores

*Belostoma elongatum* (Montandon, 1908) (Figura 9) pertenece a la familia Belostomatidae (belostomátidos) del orden Hemiptera del suborden Heteroptera; que agrupa las comúnmente llamadas chinches acuáticas. Esta especie presenta una distribución cosmopolita y se las encuentra principalmente en cuerpos de agua lénticos. La mayoría de las especies son relativamente grandes (1-12 cm) y zoofagas que depredan moluscos, crustáceos, peces y anfibios con una estrategia del tipo sit-and-wait (Menke, 1979). Estos hemípteros poseen un aparato suctopizador, que consta de un sistema de piezas con estiletes que clavan en los tejidos de la presa y que permite la inyección de saliva venenosa paralizante, la cual además posee enzimas pre digestivas facilitadoras de la absorción del alimento. Adicionalmente, estos depredadores poseen un primer par de patas raptoras ensanchadas en la base y muy afinado en el extremo con una terminación en forma de uña que actúan a modo de pinzas para la captura y manipulación del alimento. Las patas del segundo y tercer par son largas y aplanadas, con flecos de pelos que aumentan la propulsión al nadar y uñas que sirven para anclarse a la vegetación acuática. Generalmente, estos organismos se ubican debajo de la película superficial de agua, más o menos en contacto con la superficie, y suelen asomar sus sifones para respirar oxígeno atmosférico, aunque también pueden volar y caminar a nivel del suelo.



**Figura 9.** Dos individuos de *Belostoma elongatum* alimentándose de larvas de *Rhinella arenarum*. Barra= 1 cm

*B. elongatum* fue hallada frecuentemente en los ambientes muestreados durante el período de muestreos y ensayos, respondiendo exitosamente a las condiciones controladas de laboratorio. Asimismo, la relación depredador-presa fue corroborada en ensayos

preliminares (realizados en enero 2017) donde se confirmó que *B. elongatus* se alimenta de larvas de las especies de anuros incluidas en este trabajo y en diversos trabajos publicados anteriormente (Kehr y Schnack, 1991; Kehr y Gomez, 2009; Gomez y Kehr, 2011a; Gomez y Kehr, 2013).

### 3.2.2. Presas

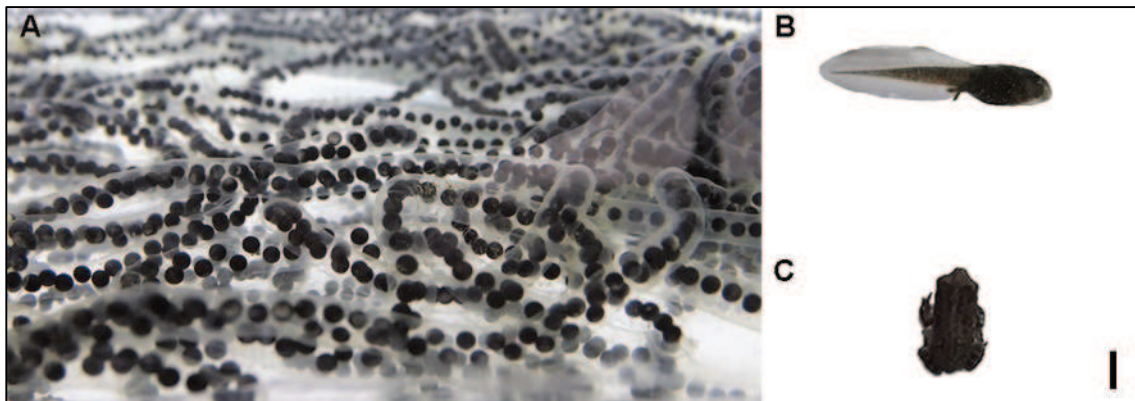
Se seleccionaron tres especies de anfibios anuros nativos en estadio larval como presas. Cada especie seleccionada pertenece a distintas familias y poseen una gran representatividad en la región (Lajmanovich, 2000; Peltzer y Lajmanovich, 2007). Las presas seleccionadas en fase larval, presentaban distinta coloración, comparando especies con probada capacidad de repulsión o palatabilidad a depredadores. A continuación, se describen las especies seleccionadas:

- *Rhinella arenarum*. Familia: Bufonidae
- *Physalaemus albonotatus*. Familia: Leptodactylidae; Subfamilia: Leiuperinae
- *Scinax nasicus*. Familia: Hylidae; Subfamilia: Hylinae

*R. arenarum* (Hensel, 1867). Nombre vulgar, “sapo común”.

Larvas: Fórmula bucal: 1, 1-1/3. Las larvas de esta especie son bentónicas, de coloración aposemática negruzca, con ojos en posición dorsal y con una aleta caudal medianamente desarrollada y suelen formar agregados larvales (Schmajuk y Segura, 1982; Kehr, 1994a; 1994b). Adultos: alcanzan un gran tamaño (80–120 mm), poseen una cabeza algo cóncava, ancha y robusta, con marcadas crestas cefálicas, ojos prominentes con pupila horizontal y tímpano visible y redondo. Además, poseen una cresta a lo largo del labio superior y glándulas paratiroides alargadas y subtriangulares que finalizan en una cadena ganglionar hacia los flancos. El dorso marrón-verdoso manchado y la zona ventral es blanquecina, poseen membranas interdigitales solo en los miembros posteriores y con desarrollo moderado. Estos sapos tienen hábitos terrestres con un *home-range* reducido y se distribuyen en ambientes diversos, presentan una dieta generalista, aunque con preferencia a insectos (hormigas, coleópteros y larvas de lepidópteros), isópodos terrestres, ácaros, lombrices y pequeños vertebrados (Lajmanovich, 1995; Attademo y col., 2007; Duré y col., 2009; de Oliveira y col., 2017). Esta especie presenta un patrón reproductivo explosivo tras fuertes lluvias de los meses agosto a marzo, aunque tienen un ciclo sexual potencialmente continuo. Se reproduce en ambientes temporales, permanentes y semipermanentes. Los huevos oscuros (4000-5000 por hembra) son puestos en cordones

gelatinosos transparentes o ristras (Figura 10) que se depositan en el fondo del cuerpo de agua (Cei, 1980).



**Figura 10.** Ristra de huevos en masa gelatinosa (A), larva (B) y juvenil (C) de *Rhinella arenarum*. Barra= 1 cm

*P. albonotatus* (Steindachner, 1864). Nombre vulgar, ranita llorona.

Larvas: Fórmula bucal: 1, 1-1/1-1, 2. De hábitos bentónicos, poseen un color marrón claro, con manchas oscuras dispersas y zona intestinal de tonos plateados. El cuerpo es de forma ovoidal siendo este más ancho que alto. El hocico es redondeado y las narinas están más cercanas a los ojos que al hocico. La cola posee la punta redondeada y abarca más de la mitad del largo del cuerpo (Kehr y col., 2004).

Adultos: de tamaño pequeño (~30 mm), en vista dorsal poseen un hocico acuminado, ojos en posición lateral y tímpano visible. El dorso es de color verde liso o parduzco grisáceo con manchas o líneas longitudinales oscuras y una franja marrón oscura desde el hocico hasta la ingle. Además, posee dos cadenas glandulares laterales claras, rodeadas de marrón, desde el ojo hasta la ingle. El vientre es blanquecino con manchas oscuras en garganta y tórax. En el labio superior poseen cuatro bandas verticales oscuras alternadas con bandas gris-blancuzco. Las extremidades presentan bandas marrones transversales y carecen de membranas interdigitales. Son de hábitos semiterrestres y son frecuentes en charcos. Su actividad se inicia en primavera pero se concentra en el verano y poseen una estrategia de forrajeo intermedia entre activa y pasiva. Las principales presas de esta especie son hormigas, coleópteros, colémbolos, isópodos, arañas, ortópteros y hemípteros acuáticos principalmente de la familia Gerridae (Peltzer y col., 2010). Esta especie se reproduce en cuerpos de aguas temporales o semipermanentes y presenta un período reproductivo entre los meses de septiembre a mayo, siguiendo un patrón explosivo tras lluvias abundantes. Los huevos son depositados en una masa de espuma que flota en la superficie del agua



formada por la secreción de sustancias albuminosas por parte de la hembra. Los machos cantan flotando en la superficie del agua abierta sobre zonas inundadas (Figura 11).

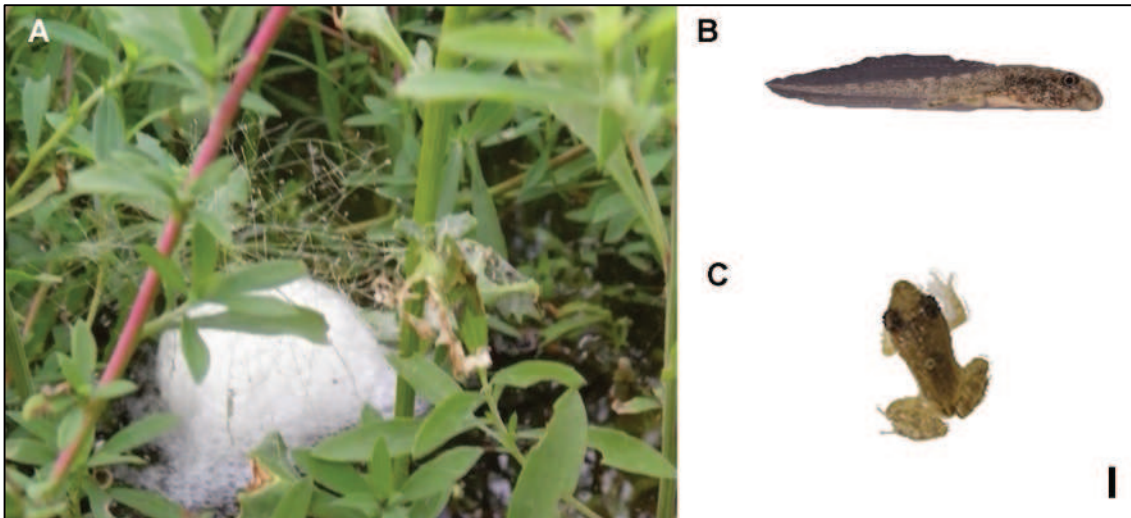


Figura 11. Nido de espuma (A), larva (B) y juvenil (C) de *Physalaemus albonotatus*.

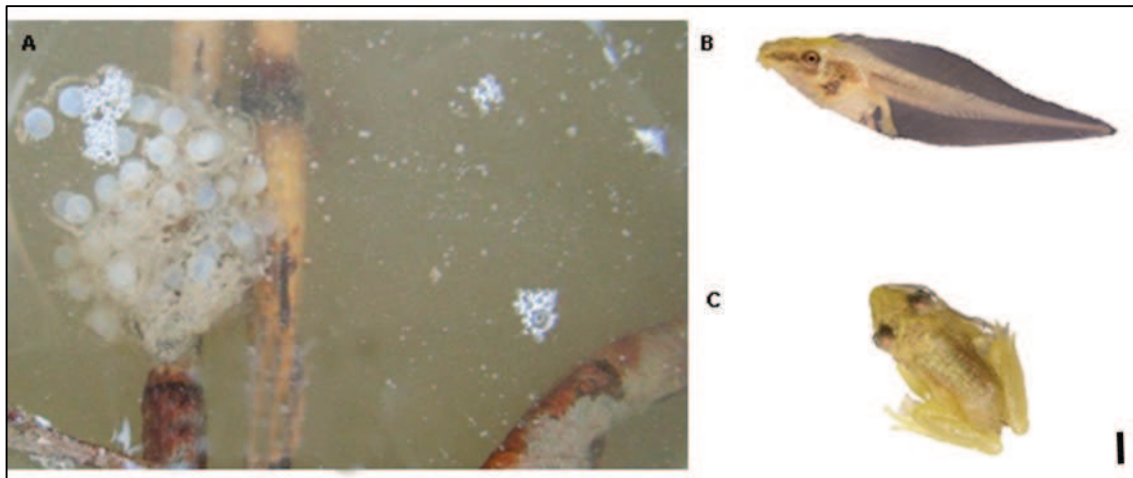
Barra= 1 cm

*S. nasicus* (Cope, 1862). Nombre vulgar, ranita trepadora hociuda.

Larva: Fórmula bucal: 2(2)/3. De hábitos nectónicos, posee un cuerpo algo más alto que ancho. En vista lateral, la forma del cuerpo es prácticamente triangular. Los ojos son laterales. Las narinas son dorsolaterales y están localizadas más cerca de los ojos que del hocico. Presentan una coloración amarronada, con una zona interorbital más oscura. En vista lateral el color es marrón. En una vista ventral, la zona del intestino es de color metálico mientras que la aleta caudal es transparente, con pequeñas manchas de melanina (Kehr y Duré, 1995).

Adultos: de tamaño mediano (27–35 mm) con hocico redondeado en vista dorsal y truncado en vista lateral. Ojos en posición lateral y tímpano circular y visible. Piel del dorso, garganta y tórax lisa, y el resto con granulaciones. Los dedos de extremidades superiores e inferiores terminados en discos adhesivos, algo truncados, y con membrana interdigital del miembro posterior desarrollado y con reborde cutáneo. El dorso es de color pardo a marrón oscuro o sepia con manchas claras o líneas diluidas y el vientre blanco o amarillento con tinte rosado cerca de las extremidades. Poseen además una mancha interescapular en forma de X. Esta especie habita praderas y humedales así como ambientes periurbanos y viviendas rurales. Activas casi todo el año y de hábitos arborícolas. Estas ranas tienen una dieta generalista, con una estrategia de captura al acecho con una

alimentación principalmente de dípteros, homópteros, coleópteros y arañas (Peltzer y Lajmanovich, 1999). Posee un patrón reproductivo continuo a lo largo de todo el año en ambientes acuáticos temporales y permanentes. Los huevos son puestos formando una



masa globosa flotante o adherida a objetos sumergidos (Figura 12). El ingreso de juveniles a la población es explosivo durante diciembre, pero se prolonga hasta el otoño.

**Figura 12.** Puesta (A), larva (B) y juvenil (C) *Scinax nasicus*. Barra= 1 cm

### 3.3.3. Recolección y acondicionamiento de depredadores y presas

Para la recolección de depredadores y presas se utilizó la técnica de muestreo activo con redes de mano a lo largo de transectas perimetrales iniciadas en puntos seleccionados al azar (Peltzer y col., 2004). Las redes con malla de 3 mm de apertura, con marco metálico en forma de letra D y manipulada mediante un mango de 1,20 m de longitud fueron arrastradas por los márgenes de las lagunas y charcos en zonas con y sin presencia de macrófitas, principalmente por Lemnáceas, *Azolla* sp., *Pistia stratiotes* y *Salvinia herzogii*.

Los depredadores y las presas fueron inmediatamente transportados *in vivo* al laboratorio en recipientes que contenían agua de la charca de origen y acondicionados en el Módulo Experimental de la Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (PICT 2015 N°470), en peceras de vidrio (37 cm de longitud, 20 cm de ancho y 25 cm de alto) con 10 L de agua declorinada bajo condiciones estándares de laboratorio (agua declorinada a  $25 \pm 2^\circ$  C, pH = 7, fotoperíodo 12/12 h luz/oscuridad). Los depredadores se colocaron en recipientes separados de los huevos y larvas de anfibios, que fueron agrupadas por especie y colocadas

en un mismo recipiente. Tanto la captura como el mantenimiento y los experimentos se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de la ASIH (2001) y el Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de anfibios de Argentina (Lips y col., 1999).

Por otra parte, la determinación taxonómica de *B. elongatum* fue realizada según Aristizábal-García (2017) mientras que para las larvas de anfibios, la determinación taxonómica y nomenclatural se llevó a cabo mediante el uso de claves específicas para anfibios (Ceí, 1980; 1987; Kehr y Williams, 1990; Lavilla y Ceí, 2001; Frost y col., 2006; Lavilla y col., 2010; Pyron y Wiens, 2011) y mediante la comparación con material de referencia preservado en la Colección Herpetológica del Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

Ninguna de las especies de anuros incluidas en este trabajo de tesis doctoral, se encuentra categorizada como amenazada a escala internacional (IUCN, 2004) ni a escala regional (Vaira y col., 2012). Las poblaciones de estas especies se distribuyen naturalmente en gran diversidad de ambientes como pastizales, bosques y humedales (Attademo y col., 2005; Peltzer y col., 2006; Peltzer y Lajmanovich, 2007; Duré y col., 2009; Lajmanovich y col., 2010). Sin embargo, la pérdida de hábitat, que incluye fundamentalmente la alteración de los ambientes boscosos, la conversión de áreas naturales en campos de agricultura o de pastoreo, la alteración de humedales y la consecuente contaminación por agroquímicos, productos farmacéuticos, materia orgánica de múltiples orígenes y el avance del urbanismo (Vaira y col., 2012; Peltzer y col. 2018), han llevado a estas especies a llevar a cabo su ciclo biológico y a reproducirse en lagunas agrícolas temporales producidas por las lluvias estacionales, donde se concentra una gran cantidad de agroquímicos utilizados para la fertilización y el control químico de plagas de los principales cultivos extensivos del área.











#### **3.3.4. Formulación seleccionada del herbicida glifosato**

Se evaluaron los efectos de la formulación comercial de glifosato Roundup® Controlmax (GLY) de la marca Monsanto, actualmente Bayer, por ser ecológicamente más relevante siendo que el i.a no se aplica masivamente sino en soluciones junto a coadyuvantes POEA, que pueden contribuir a su toxicidad en anuros (Relyea y Jones, 2009; Lajmanovich y col., 2010). Las soluciones de ensayo se prepararon teniendo en cuenta la concentración del i.a en el formulado y disolviendo concentraciones específicas de las respectivas en agua de red declorada.



### 3.3.5. Pictogramas de las especies de anfibios anuros y de los estresores evaluados

En el desarrollo de esta tesis doctoral se utilizaron los siguientes pictogramas para facilitar la comprensión de los gráficos (Figura 13):

<i>B. elongatum</i> (con) 	RoundUp (con) 	<i>R. arenarum</i> (larva) 	<i>P. albonotatus</i> (larva) 	<i>S. nasicus</i> (larva) 
<i>B. elongatum</i> (sin) 	RoundUp (sin) 	<i>R. arenarum</i> (juvenil) 	<i>P. albonotatus</i> (juvenil) 	<i>S. nasicus</i> (juvenil) 

**Figura 13.** Pictogramas de las especies de larvas y juveniles anuros: *Rhinella arenarum*, *Physalaemus albonotatus* y *Scinax nasicus*, y de los factores estresantes a las que fueron expuestas: *Belostoma elongatum* y la formulación comercial de glifosato Roundup® Controlmax.

### 3.4. Diseños experimentales

Se diseñaron cuatro experimentos de distinta duración: dos de toxicidad a corto plazo (EA1 y EA2; 24h y 5 min respectivamente) y dos de toxicidad a largo plazo (EC1 y EC2; ~40-60 días).

#### 3.4.1. Experimentos agudos a corto plazo

##### 3.4.1.1. Experimento agudo 1 (EA1): Bioensayo de toxicidad aguda de una formulación comercial de glifosato en larvas de *R. arenarum*

Los datos obtenidos mediante la realización de ensayos de toxicidad son fundamentales para establecer criterios que permitan la conservación de la estructura y funciones del ecosistema (Heugens y col., 2001, Jager y col., 2006). El término toxicidad se refiere a la propiedad fisiológica o biológica que determina la capacidad de una sustancia química para causar perjuicio o producir daños a un organismo vivo por medios no mecánicos cuando dicha sustancia entra en contacto con una superficie corporal (piel, ojos, mucosa del sistema digestivo o respiratorio) (OMS, 2019).

El primer paso de este trabajo consistió en realizar una prueba de toxicidad aguda de 24 h para estimar el rango de concentraciones de GLY que produce una respuesta observable y cuantificable en los organismos bajo condiciones controladas de laboratorio en términos de mortalidad (Rand y Petrocelli, 1985). El mismo se realizó con la especie *R. arenarum* por ser la especie con mayor fecundidad de las tres especies estudiadas (Cei, 1980) y de la que hubo mayor disponibilidad de larvas durante el período de realización de esta tesis. Se realizó por triplicado y bajo condiciones controladas de temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y fotoperíodo (12/12 h luz/oscuridad) en la Sala de Bioensayos del Laboratorio de Ecotoxicología de la ESS-FBCB-UNL y de acuerdo con las normas estandarizadas de USEPA (1975; 2002).

Se prepararon catorce concentraciones de GLY (10; 12,5; 15; 17,5; 20; 22,5; 25; 27,5; 30; 32,5; 35; 37,5; 40; 42,5 mg/L i.a.) matemáticamente relacionadas por un factor de dilución, y un control negativo (sin plaguicida). El rango de concentraciones analizadas fue determinado considerando la información obtenida a partir de ensayos preliminares. Por cada concentración, cinco larvas de anfibios en estadios 36-39 (Gosner, 1960) fueron colocadas aleatoriamente en frascos de vidrio (12,5 cm de diámetro y 13,5 cm de altura) conteniendo la solución de ensayo, siendo el volumen total el mismo en todas las unidades experimentales (1 L). La selección de estos estadios de desarrollo se fundamentó en la estabilidad de rasgos morfológicos y metabólicos clave, con algunas reservas respecto al desarrollo de las patas traseras (Gosner, 1960). En ningún caso se adicionó alimento durante el período de ensayo (USEPA, 1989; 2002). Se determinó la mortalidad fisiológica por la ausencia de respuesta al ser estimulados con una varilla de vidrio luego de las 24 h desde el inicio de la exposición.

#### **3.4.1.1.1. Análisis estadísticos (EA1)**

La sensibilidad de las larvas de *R. arenarum* al GLY se expresó como la concentración que produce la mortalidad del 50% de los individuos luego de 24 h de exposición ( $CL_{50}/24\text{h}$ ). Se expresa en miligramo (mg) del tóxico por kg de peso vivo y se informa la especie de estudio, el sexo, la vía de absorción, y el tiempo de exposición por relación existente entre el tiempo de exposición y la toxicidad (Eaton y Gilbert, 2008). Para la estimación de la  $CL_{50}$  y sus respectivos IC ( $\alpha = 0,05$ ), se realizó un análisis Probit con distribución de valor extremo más pequeño. Además, se determinaron la concentración mínima donde aún se observa efecto de mortalidad (LOEC, por sus siglas en inglés *Lower Observable Effect Concentration*) y la concentración donde el tóxico no produce la muerte de los organismos (NOEC, por sus siglas en inglés *No Observable Effect Concentration*).

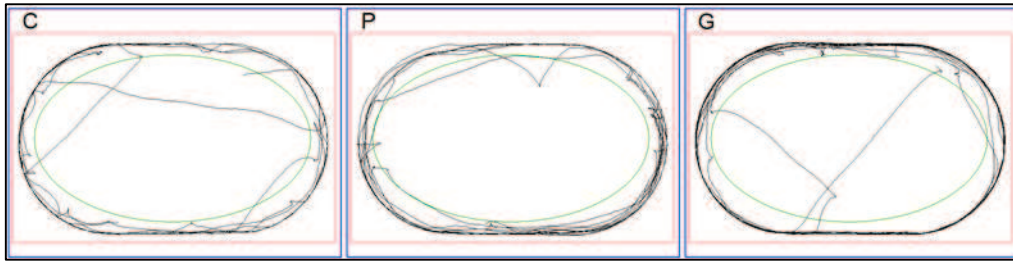
### 3.4.1.2. Experimento agudo 2 (EA2): Evaluación del comportamiento a corto plazo de larvas *R. arenarum*, *P. albonotatus* y *S. nasicus*, a señales del depredador *B. elongatum* y a una concentración ambientalmente relevante de glifosato

Con el objetivo de evaluar la respuesta de larvas de las especies *R. arenarum*, *P. albonotatus* y *S. nasicus* a señales del depredador *B. elongatum* y a una concentración ambientalmente relevante de GLY, se realizó un experimento de mediciones repetidas en cada especie de anuro. El experimento constó de tres tratamientos: control (C; 2 L de agua declorinada), depredador (D; agua declorinada con señales químicas de un individuo de *B. elongatum* en 2 L de agua durante 24 h) y GLY (G; solución de 1,5 mg/L GLY). Se colocó sucesiva y aleatoriamente con intervalos de 30 min un renacuajo de cada especie (n=10, 34-39 de Gosner) por recipiente ovalado de 47 cm x 29 cm y durante 5 minutos se registró el comportamiento de cada individuo en los tres tratamientos con una cámara Motic® de 10MP ubicada en la parte superior (Figura 14). Los videos generados luego de 1 min de aclimatación fueron analizados con el software de video-tracking Smart 3.0.03 (Panlab Harvard Apparatus®) que convierte la imagen de la silueta de los renacuajos en pixeles en una arena digitalizada y registra la posición de los individuos en el volumen de agua en momentos definidos (Figura 15) (Noldus y col., 2002) lo que permitió la determinación de las siguientes variables:

- Distancia Total Recorrida (DT, cm)
- Velocidad Máxima (Vmax, cm/s)
- Velocidad Media (Vmed, cm/s)
- Actividad Global (AG, m)



**Figura 14.** Set up para la grabación y análisis de estudios de comportamiento de larvas de anuros expuestas a señales de depredadores y de una concentración relevante de glifosato.



**Figura 15.** Videotracks representativos del comportamiento de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a C (agua dechlorinada), P (señales químicas de *Belostoma elongatum*.), G (1,5mg/L glifosato). En verde la zona interior (Zi), en rojo zona exterior (Ze), en negro recorrido del individuo.

#### **3.4.1.2.1. Análisis estadísticos EA2**

El efecto de la presencia de depredadores y del herbicida GLY sobre el comportamiento de las especies se evaluó a través de un ensayo de mediciones repetidas ANOVA con 10 individuos de estadios 35-39 (Gosner, 1960) por especie. En el caso de hallarse diferencias significativas se realizó un test post hoc de Bonferroni.


#### **3.4.2. Experimentos a largo plazo**

##### **3.4.2.1. Experimento crónico 1 (EC1): Evaluación del crecimiento y desarrollo de las larvas de *R. arenarum* expuestas a señales del depredador *B. elongatum* y a una concentración ambientalmente relevante de glifosato**

En larvas de anfibios, una de las respuestas al estrés es el aumento del forrajeo y de la movilización de las reservas de energía a través de la lipogénesis que, a su vez, puede acelerar crecimiento y desarrollo (Crespi y Denver 2004; 2005). En este contexto, se determinó la distribución de los estadios de desarrollo según Gosner (1960) de las larvas de *R. arenarum* al momento de la primer metamorfosis expuestos crónicamente y durante todo el desarrollo a un estresor natural (*B. elongatum*) y a uno de origen antrópico (GLY) en condiciones ecológicas realistas. La evaluación del crecimiento y desarrollo se llevó a cabo únicamente en esta especie por ser la más fecunda de las incluidas en este trabajo y de la cual se dispuso una cantidad adecuada de individuos desde estadio embrionario (Gosner 1-14). Este ensayo constó de un diseño factorial de exposición crónica 2 x 3 con una combinación de señales de depredadores: P: depredadores; PGL: depredadores + GLY 1,5 mg/L y PGH: depredadores + GLY 2,5 mg/L y de tres niveles de concentraciones ambientalmente relevantes de GLY: C: 0 mg/L; GL: 1,5 mg/L y GH: 2,5 mg/L. Para esto, se colocaron aleatoriamente 50 embriones en peceras rectangulares de 20 L (40x20x20 cm) a 25 °C de temperatura con un ciclo de 12:12 h luz/oscuridad. Cada tratamiento se

realizó por triplicado (n total=150) y la solución de las peceras se reemplazó una vez por semana con alimentación *ad libitum* de lechuga hervida. Asimismo, un individuo adulto de la especie depredadora *B. elongatum*, se colocó en un recipiente sumergido en un extremo del acuario que permitía la circulación de agua, pero no el paso de los individuos en los tratamientos P, PGL y PGH (Tabla 5). Las peceras se controlaron diariamente, extrayendo a los individuos próximos a metamorfosear y para colocarlos en recipientes circulares inclinados a modo de que los individuos puedan mantenerse en el agua o fuera de ella según lo requieran. Una vez reabsorbida la cola, se evaluaron tres variables de crecimiento en cada individuo: largo total (LT), peso y ancho de cabeza. El LT y el ancho de cabeza se midieron utilizando un calibre Vernier, mientras que el peso fue determinado con una balanza con una precisión de 0,01g.

**Tabla 5.** Diseño factorial de exposición crónica 2 x 3 con una combinación de señales de depredadores (*Belostoma elongatum*) y de dos concentraciones (1,5 mg/L y 2,5 mg/L) de GLY.

Tratamiento	C	GL	GH	P	PGL	PGH
				✓	✓	✓
1,5 mg/L GLY		✓			✓	
2,5 mg/L GLY			✓			✓

#### 3.4.2.1.1. Análisis estadístico EC1

Para comparar las distribuciones de estadios de desarrollo de Gosner entre los tratamientos C, GL, GH, P, PGL y PGH, se utilizaron el estadístico R del análisis de similitud (ANOSIM) seguido por un análisis del porcentaje de similitud (SIMPER) según Clarke (1993), el índice de Jaccarizado de Czekanowski y el método de *clustering* o clasificación UPGMA.

El estadístico R del ANOSIM está basado en la diferencia de los rangos medios entre grupos rB y dentro de los grupos rW. Así, R se define como:

$$R = 4(rB-rW) / [n(n-1)]$$

Donde n es el número total de tratamientos. El valor de R varía entre 0 y 1, donde el valor 0 indica una agrupación completamente aleatoria y los valores positivos de R indican que las diferencias entre grupos son mayores que dentro de los mismos. Se realizaron 9999 permutaciones y en el caso de encontrarse diferencias significativas se realizaron comparaciones entre pares de grupos.

El método SIMPER fue utilizado para determinar qué estadios fueron los principales responsables para una diferencia observada entre tratamientos en el caso de encontrarse diferencias significativas con ANOSIM (Clarke, 1993). Se utilizó la medida de similitud de Bray-Curtis para calcular la disimilitud promedio para todos los grupos y entre grupos o pares.

El índice de Jaccarizado de Czekanowski (Schubert y Telcs, 2014) es un índice de similitud que proporciona un valor porcentual único relacionado con la abundancia proporcional de estadios en común para ambas comunidades (Jongman y col., 1995).

La clasificación *Unweighted pair-group average* (UPGMA) se basa en la identificación de las parejas de grupos más similares y en el cálculo de la media de las distancias entre grupos o tratamientos según el método Bray-Curtis para construir un dendrograma de relaciones (Bray y Curtis, 1957).

Finalmente, para comparar los efectos principales e interacciones de los juveniles una vez reabsorbida la cola, se realizó un ANOVA de dos vías con la presencia/ausencia de PRED y tres concentraciones de GLY (con 2 y 3 niveles respectivamente) para evaluar diferencias en el LT, peso, el índice de condición corporal ( $BCI = \text{peso}/LT^3$ ) y ancho de cabeza. Se realizó un test post hoc de Tukey para encontrar diferencias entre tratamientos.

Los análisis ANOSIM, SIMPER y el árbol de relaciones UPGMA fueron calculados con el programa PAST (4.0) mientras que el índice de Czekanowski y el ANOVA de dos vías fueron calculados con el software SPSS (v.23).


#### **3.4.2.2. Experimento crónico 2 (EC2): Evaluación de los efectos de la exposición crónica a glifosato y a depredadores en variables morfométricas, enzimáticas y hormonales de larvas de *R. arenarum*, *P. albonotatus* y *S. nasicus***

En este experimento, se evaluaron los efectos de una exposición crónica a la formulación comercial del herbicida GLY (Roundup® Controlmax, GLY) empleando una concentración ambientalmente relevante sobre individuos de *R. arenarum*, *P. albonotatus*, y *S. nasicus* desde estadios embrionarios hasta la finalización de la metamorfosis, en presencia o ausencia del depredador *B. elongatum* (PRED). En este ensayo, la determinación de los marcadores morfométricos, enzimáticos y hormonales se realizaron en dos momentos distintos del desarrollo: en estadios prometamórficos de la fase larval y post-metamorfosis. Para evaluar los efectos principales de la exposición crónica al GLY, de los PRED y sus interacciones, se realizó un diseño de bloques aleatorizados con una



combinación factorial 2 x 2 de señales de presencia y ausencia de depredadores y del herbicida GLY (2,5 mg/L GLY) en las tres especies y en los dos estadios de desarrollo previamente mencionados. Para garantizar la cantidad de muestras requeridas en la determinación de los biomarcadores propuestos pre y post metamorfosis; en cada especie, se colocaron aleatoriamente y por cuatriplicado 20 embriones para el caso de *R. arenarum* y *P. albonotatus* y 20 larvas estadios 26-30 (Gosner, 1960) de *S. nasicus* por tratamiento (C, G, P y PG) en peceras rectangulares de 10 L a 25 °C de temperatura con un ciclo de 12:12 h luz/oscuridad (Tabla 6). De estos grupos iniciales, una proporción fue eutanizada en estadio larval para realizar la determinación de biomarcadores y morfología geométrica y otra fue criada hasta la etapa juvenil para realizar los análisis en etapa post metamórfica. La solución de las peceras fue reemplazada una vez por semana y se suministró lechuga hervida *ad libitum* como alimento para los renacuajos hasta que alcanzaron la metamorfosis. En los tratamientos P y PG, se incluyó además un individuo adulto de la especie depredadora *B. elongatum* en un recipiente sumergido en un extremo del acuario, lo que permitía la circulación de agua, pero no el paso de los individuos. La toma de imágenes para los análisis de morfometría geométrica y de muestras de tejido para la determinación de las enzimas AChE y GST; las hormonas CORT, T3 y T4 fueron extraídas de individuos en los estadios larvales 35-39 (Gosner, 1960) y luego de la absorción completa de la cola.

**Tabla 6.** Diseño factorial de exposición crónica 2 x 2 con una combinación de presencia/ausencia de señales de depredadores *Belostoma elongatum* y de 2,5 mg/L de glifosato.

Tratamiento	C	GH	P	PGH
			✓	✓
2,5 mg/L GLY		✓		✓

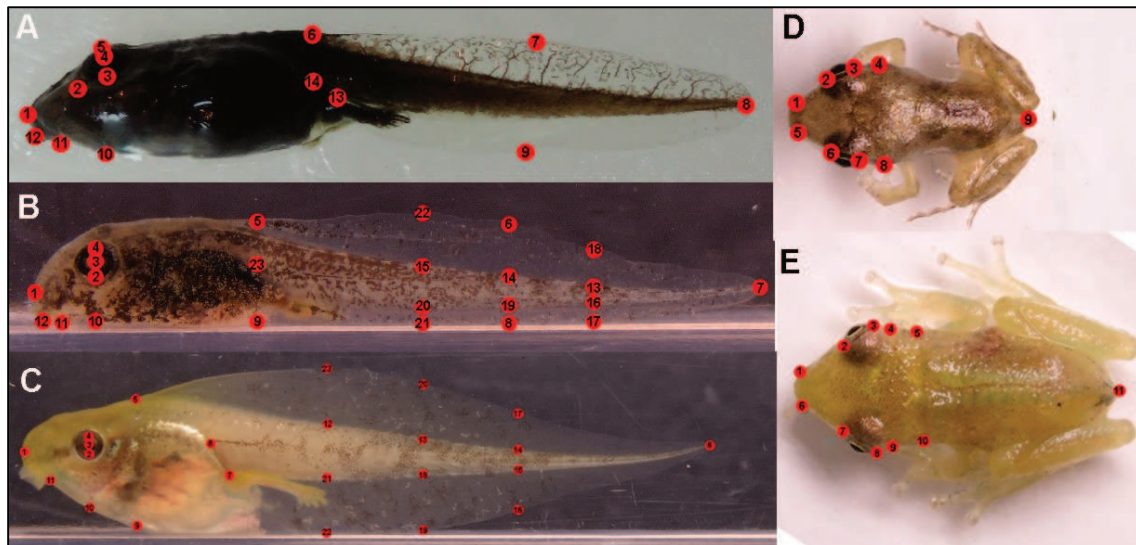
#### 3.4.2.2.1. Morfometría y tamaño corporal

Se utilizaron herramientas de morfometría geométrica para detectar cambios morfológicos como alteraciones en la aleta caudal, los músculos de la cola, en el tamaño relativo de la cola y el cuerpo inducidos por el stress (depredadores, glifosato o su interacción). Para esto, por cada tratamiento se tomaron fotografías digitales de individuos en estadios prometamórficos 35 a 39 (Gosner, 1960) e individuos juveniles una vez finalizada la metamorfosis y de la reabsorción de la cola. Se evaluaron larvas de *R. arenarum* (n=48), *P. albonotatus* (n=47) y de *S. nasicus* (n=41) y juveniles de *P. albonotatus* (n=28) y *S.*



*nasicus* (n=27). La morfometría geométrica de juveniles de *R. arenarum* no fue evaluada. Las imágenes de las larvas fueron tomadas en plano sagital mientras que las de los juveniles se tomaron en plano frontal. A continuación, se colocaron 14 puntos anatómicos o landmarks sobre las imágenes de los prometamórficos de *R. arenarum*, 23 en *P. albonotatus* y *S. nasicus*, 9 landmarks en los juveniles de *P. albonotatus* y 11 en los de *S. nasicus* (Figura 16 A-E) con el software tpsDig2 versión 2.31 (Rohlf, 2017).. Los landmarks corresponden a puntos anatómicos homólogos empleados para registrar las coordenadas que definen la posición de un carácter morfológico en el espacio y que caracterizan la forma y el tamaño de los renacuajos o juveniles (Ferland-Raymond y Murray, 2008). Posteriormente, con el objetivo de eliminar los efectos de escala, de orientación y de posición, se realizó un análisis de super-imposición generalizado de procrustes (GPA) (Rohlf y Slice, 1990; Bookstein, 1991) con el programa tpsRewl versión 1.69 (Rohlf, 2017). Con el mismo software, se extrajeron los valores de centroide (tamaño del centroide; TC) y se ejecutó un análisis de las deformaciones relativas o *relative warps*, el cual describe el cambio en la forma dentro de los diferentes grupos como deformaciones de los landmarks en relación a una configuración consenso de todos los especímenes utilizando el estadio de Gosner como covariable. El TC se calculó como la raíz cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado desde cada landmark hasta el centroide o centro geométrico. El tamaño del centroide es una métrica de tamaño útil porque es independiente de la forma (Zelditch y col., 2004). Además se testeó la existencia de alometría con una regresión multivariada utilizando el TC como variable independiente y las coordenadas de Procrustes como variable dependiente. Se realizó una corrección de tamaño teniendo en cuenta los residuos de regresión con el programa MorphoJ.

Finalmente, se realizó un análisis de variables canónicas (AVC) a partir de los residuos de la regresión lineal de las coordenadas de Procrustes y del TC, con el fin de observar las tendencias de variación y agrupamiento de los individuos con el programa MorphoJ (versión 1.06d). De esta manera, se evaluó la existencia de diferencias significativas entre grupos a partir de las distancias de Procrustes por la prueba de permutación con 10000 iteraciones. El AVC se utiliza para separar grupos previamente conocidos y proporciona una ordenación que maximiza la separación de las medias de los grupos en relación con la variación dentro de los grupos (Darlington y col., 1973). Adicionalmente, se midió la LT y se registró el peso corporal de cada individuo.



**Figura 16.** Número y ubicación de landmarks según estadio y especie de anuros. A. Larva *Rhinella arenarum*; B. Larva *Physalaemus albonotatus*; C. Larva *Scinax nasicus*; D. Juvenil *Physalaemus albonotatus*; E. Juvenil *Scinax nasicus*.

#### 3.4.2.2.2. Procesamiento de muestras

Para la preparación de las muestras, cada individuo (larvas estadio 35-39 de Gosner o juvenil) se homogeneizó en tubos eppendorf con 500  $\mu$ L de buffer 0,1% t-octilfenoxipolietoxietanol (tritón X-100) en 25 mM Tris (hidroximetil) aminometano clorhidrato (pH 8,0) en frío, utilizando un homogeneizador plástico para posteriormente realizar las determinaciones bioquímicas correspondientes. Posteriormente, se centrifugaron los homogenatos a 10.000 rpm durante 15 min. Por último, se descartó el pellet y el sobrenadante o extracto crudo se transfirió a un nuevo tubo eppendorf con su rotulación correspondiente. A su vez, sobre cada sobrenadante se calculó la concentración de proteínas totales (PT) presentes, mediante el método de Biuret (Kingsley, 1942) utilizando el kit colorimétrico (Proteínas Totales AA, Wiener lab®).

#### 3.4.2.2.3. Reactivos utilizados

La acetilcolina (AcSCh) y el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich® (Alemania). El glutatión reducido (GSH) y el 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) fueron suministrados por Acros-Organics® (EE.UU.). Los reactivos Tris, Tritón y  $\text{CaCl}_2$  fueron comprados en Biopack® (Argentina). Los kits utilizados para la determinación de hormonas fueron CORT (Cobas®, 11875116), T3 (Cobas®, 11731360) y T4 (Cobas®, 12017709).

#### **3.4.2.2.3.1. Enzimas**

Se evaluó la actividad de las dos enzimas que intervienen en distintos procesos metabólicos: AChE y GST. La actividad de la AChE se evaluó según el método Ellman y col., (1961) con algunas modificaciones para su utilización en especies silvestres (Sánchez-Hernández, 2003; Sánchez-Hernández y Moreno-Sánchez, 2002, Sánchez-Hernández y col., 1997, 2004a). La reacción para determinar su concentración consiste en un extracto crudo, 2 mM ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), 20 mM acetiltiocolina (AcSCh), 25 mM Tris-HCl y 1 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.6). La variación en la densidad óptica se registró con un espectrofotómetro JENWAY6405 UV-vis a 410 nm durante 1 min a 25° C y la actividad de la enzima AChE se expresó como nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de PT utilizando un coeficiente de extinción molar de 13,6x 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

Por otra parte, la actividad de la enzima GST se determinó por el método descrito por Habig y col., (1974) y adaptado por Habdous y col., (2003) para la GST. La reacción colorimétrica para su cuantificación se determinó mediante espectrofotómetro con una longitud de onda de 340nm en 100 mM de buffer Na-fosfato (pH 6.5), 2 mM 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) y 5 mM de glutatión reducido (GSH). La cinética se determinó por duplicado a 25°C y la actividad de la enzima GST se expresó en nmol min<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup> de plasma utilizando un coeficiente de extinción molar de 9.6 x 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### **3.4.2.2.3.2. Hormonas**

Las concentraciones de CORT, T3 y T4 se determinaron con un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA). La extracción de las muestras se realizó a partir del homogeneizado en buffer fosfato en un tubo eppendorf que luego se centrifugó a 14000 rpm, a 4 °C durante 20 min para separar el sobrenadante (Gomez-Mestre y col, 2013), el cual se reservó en ultra freezer a -70°C hasta el momento de la determinación de la concentración de CORT, T3 y T4 según las indicaciones del fabricante del kit en un analizador Modular Analytics E170 de Roche®. Las tres determinaciones hormonales se basan en el mismo principio por lo que se explica la determinación de la concentración de T4 a modo de ejemplo. La determinación se trata de un inmunoensayo competitivo en donde la T4 de la muestra y la T4 conjugada con biotina compiten por los sitios de unión de un anticuerpo específico anti T4 que se encuentra en cantidad conocida y que está marcado con Rutenio (Ru). Luego de cumplido el tiempo de incubación, la T4 libre de la muestra y la T4 conjugada con biotina se unen al anticuerpo marcado con Ru. Luego, en una segunda etapa, se agregan las micropartículas recubiertas de estreptavidina que se unirán a la biotina-T4. Posteriormente, el complejo T4 unido al anticuerpo marcado con

Ru y el complejo estreptavidina biotina-T4 unido al anticuerpo marcado con Ru se acerca a una fase sólida imantada. En este sistema sólo puede fijarse al imán el complejo anticuerpo marcado con Ru unido a T4-biotina-estreptavidina por las partículas magnéticas que tiene esta última por lo que los elementos no fijados se eliminan por lavado. Al aplicar una corriente eléctrica definida, el Ru genera una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide en un fotomultiplicador. Finalmente, la cantidad de T4 libre será inversamente proporcional a la cantidad de luz registrada, ya que, si el suero contiene poca T4 libre la cantidad de T4-biotina unida al anticuerpo será alta lo que deriva en mayor formación del complejo estreptavidina biotina ligado al anticuerpo marcado con Ru y, por ende, en una mayor producción de luz y viceversa.

#### **3.4.2.2.4. Análisis estadístico (EC2)**

A partir de los valores obtenidos mediante la morfometría geométrica, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el fin de obtener nuevas variables o PCA que describan la relación entre las variables analizadas. Además se realizó un ANOVA y un test post-hoc LSD (Least Significant Difference) para establecer la significación estadística de las diferencias observadas entre las submuestras de cada PCA.

Por otra parte, los efectos principales de los PRED, del herbicida GLY y de sus interacciones fueron determinados a través de un ANOVA dos vías (glifosato\*depredadores) considerando las variables dependientes LT, peso, BCI, AChE, GST, CORT, T3, T4. Para el análisis de LT, peso, BCI, AChE y GST en las larvas, se utilizó el estadio de Gosner como covariable. El análisis estadístico de los datos de todos los experimentos se realizó empleando el software SPSS 23 (IBM, Armonk, NY, USA).

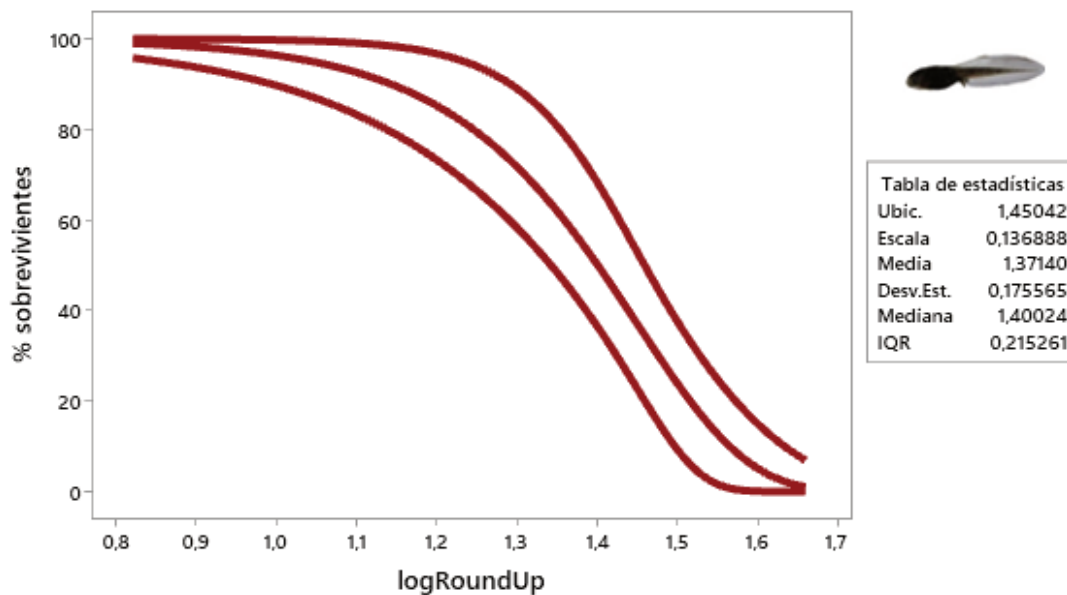
## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Experimentos a corto plazo**

#### **4.1.1. Experimento agudo 1 (EA1): Bioensayo de toxicidad aguda de una formulación comercial de glifosato en larvas de *R. arenarum***

Se realizó un test de toxicidad aguda de 24 h para larvas de la especie *R. arenarum* expuestas al formulado comercial de GLY Roundup® Controlmax. El  $CL_{50}/24h$  calculado

fue 25,13 mg/L (IC 95% = 20,85-28,31), mientras que la concentración NOEC fue de 12,5 mg/L y la LOEC de 15 mg/L no habiéndose registrado mortalidad en los tratamientos control (Figura 17).



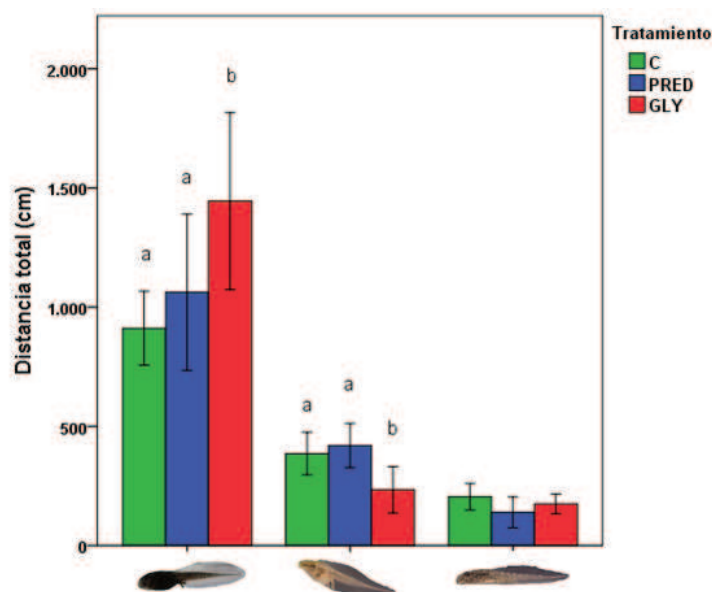
**Figura 17.** Curva de supervivencia y su respectivo intervalo de confianza (95%) de larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a distintas dosis del herbicida glifosato.

**4.1.2. Experimento agudo 2 (EA2): Evaluación del comportamiento a corto plazo de larvas *R. arenarum*, *P. albonotatus* y *S. nasicus* a señales del depredador *B. elongatum* y a una concentración ambientalmente relevante de glifosato**

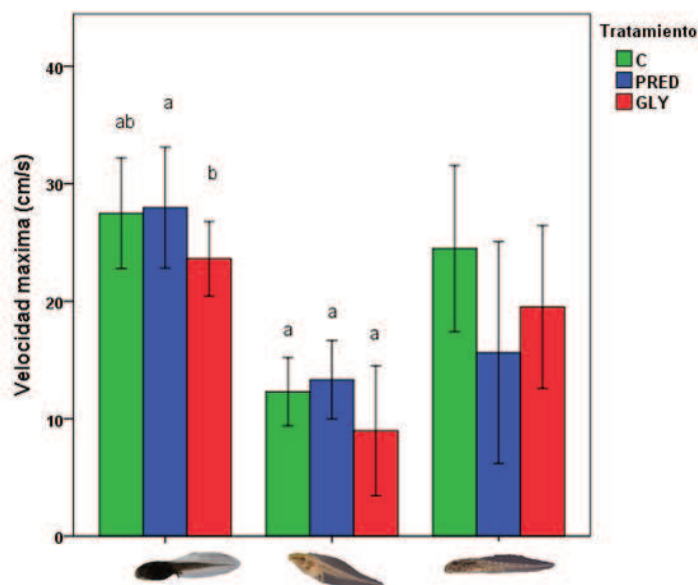
El ANOVA de medidas repetidas mostró que dos de las tres especies estudiadas mostraron variaciones significativas en al menos una variable etológica (Tabla 7, Figura 18-21). *R. arenarum* mostró diferencias significativas para las variables DTR, VMax y AG. *P. albonotatus* no mostró cambios en el comportamiento ( $p > 0,05$ ). *S. nasicus* presentó diferencias para las variables DTR, VMax, VMed y AG. Los tests *post hoc* de Bonferroni para *R. arenarum* determinaron un aumento para la variable DTR en presencia de GLY, disminución de la VMax por GLY y aumento de la AG por GLY. Los resultados de Bonferroni para *S. nasicus* mostraron respuestas opuestas a las de *R. arenarum* con una reducción de la DTR, la VMax, VMed y AG.

**Tabla 7.** Parámetros F y p del ANOVA de medidas repetidas para variables de comportamiento de larvas de *Rhinella arenarum*, *Scinax nasicus* y *Physalaemus albonotatus* del grupo control sin exposición y luego de ser expuestas a señales químicas de *Belostoma elongatum* y glifosato (1,5 mg/L). Los asteriscos marcan diferencias significativas entre tratamientos: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; n = 10.

Especie	DTR		VMax		VMed		AG	
	F	p	F	p	F	p	F	p
<i>R. arenarum</i>	8,16	0,001**	4,69	0,024*	1,24	0,313	12,74	0,003**
<i>P. albonotatus</i>	1,81	0,192	0,99	0,391	2,83	0,091	0,92	0,416
<i>S. nasicus</i>	9,66	0,001**	3,96	0,037*	5,91	0,011*	4,23	0,030*

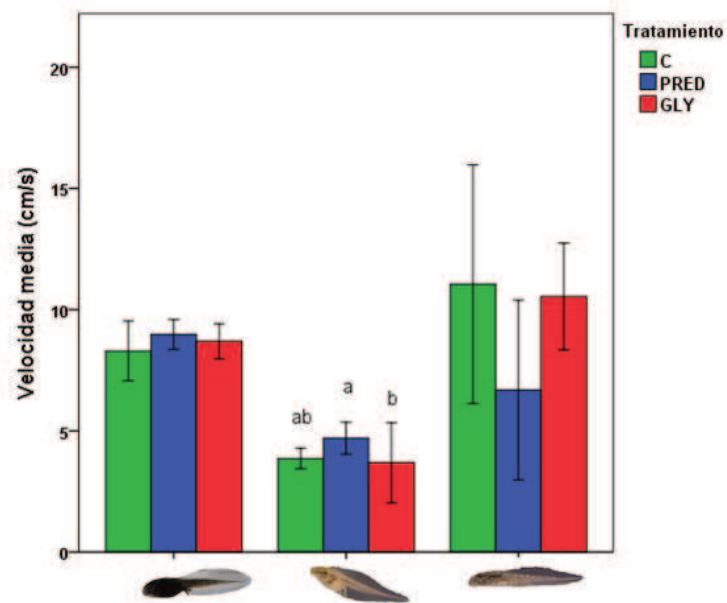


**Figura 18.** Media e intervalos de confianza de la Distancia Total Recorrida de larvas de *Rhinella arenarum* (izq.), *Scinax nasicus* (centro) y *Physalaemus albonotatus* (der.) en el grupo control sin exposición (C) y en tratamientos de exposición a señales químicas de *Belostoma elongatum* (PRED) y glifosato (GLY 1,5 mg/L). Las letras por encima de las barras representan diferencias estadísticamente significativas (*post hoc* de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

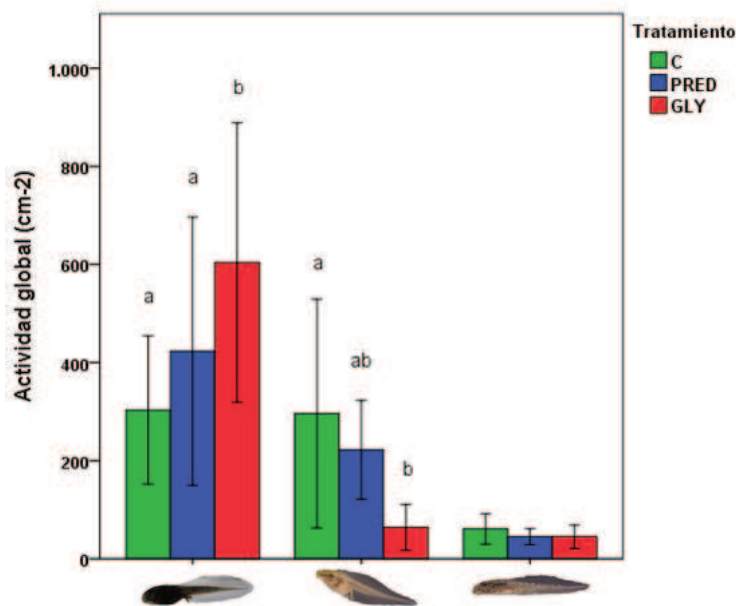


**Figura 19.** Media e intervalos de confianza de la Velocidad Máxima de larvas de *Rhinella arenarum* (izq.), *Scinax nasicus* (centro) y *Physalaemus albonotatus* (der.) en el grupo control sin exposición (C) y en tratamientos de exposición a señales químicas de *Belostoma elongatum* (PRED) y glifosato (GLY 1,5 mg/L). Las letras por encima de las barras representan diferencias estadísticamente significativas (*post hoc* de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).





**Figura 20.** Media e intervalos de confianza de la Velocidad Media de larvas de *Rhinella arenarum* (izq.), *Scinax nasicus* (centro) y *Physalaemus albonotatus* (der.) en el grupo control sin exposición (C) y en tratamientos de exposición a señales químicas de *Belostoma elongatum* (PRED) y glifosato (GLY 1,5 mg/L). Las letras por encima de las barras representan diferencias estadísticamente significativas (*post hoc* de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).



**Figura 21.** Media e intervalos de confianza de la Actividad Global de larvas de *Rhinella arenarum* (izq.), *Scinax nasicus* (centro) y *Physalaemus albonotatus* (der.) en el grupo control sin exposición (C) y en tratamientos de exposición a señales químicas de *Belostoma elongatum* (PRED) y glifosato (GLY 1,5 mg/L). Las letras por encima de las barras representan diferencias estadísticamente significativas (*post hoc* de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

## 4.2. Experimentos a largo plazo

### 4.2.1. Experimento crónico 1 (EC1): Evaluación del crecimiento y desarrollo de las larvas de *R. arenarum* expuestas a señales del depredador *B. elongatum* y a una concentración ambientalmente relevante de glifosato

Se evaluó la distribución de los estadios de desarrollo de las larvas de *R. arenarum* el día de la primera metamorfosis en cualquiera de los tratamientos. La misma ocurrió el día 39 de exposición en el tratamiento P, es decir, el tratamiento con señales de PRED y sin GLY. Asimismo, en el diagrama de cajas y el histograma de la distribución de frecuencias de estadios de Gosner (**Figura 22**) se observa una predominancia de estadios más avanzados en el tratamiento P respecto al resto de los tratamientos, en coincidencia con los valores de la mediana y la moda (Gosner =33; **Tabla 8**).

Además, se realizó un test estadístico multivariado ANOSIM para evaluar las diferencias de la distribución de estadios de desarrollo entre tratamientos que mostró diferencias significativas ( $R=1$ ;  $p=0,0002$ ) seguido de un SIMPER con una disimilitud promedio general de 27%. Tanto el análisis SIMPER, como el índice de similitud de Czekanowski indicaron que los grupos más similares entre sí fueron C y PGH mientras que los grupos con mayor disimilitud entre sí fueron el tratamiento P y el C con distintos grados de disimilitud entre el resto de los grupos (**Tabla 9**). En concordancia con estos análisis, el dendrograma UPGMA separó el grupo expuesto a PRED del resto de los tratamientos y además separa los tratamientos con GLY del control salvo por PGH respecto a la distribución de estadios de desarrollo (**Figura 23**).

**Tabla 8.** Mediana, moda, mínimo y máximo de estadios de desarrollo según Gosner en larvas de *Rhinella arenarum* en los diferentes tratamientos: 0 mg/L (C), glifosato 1,5 mg/L (GL), glifosato 2,5 mg/L (GH), predador (P), predador + glifosato 1,5 mg/L (PGL), predador + glifosato 2,5 mg/L (PGH) al momento de la primera metamorfosis.

<i>R. arenarum</i>	C	GL	GH	P	PGL	PGH
Mediana	28	30	30	33	30	28
Moda	28	28	29	33	28	28
Mínimo	26	26	26	26	26	25
Máximo	36	36	38	39	38	38

**Tabla 9.** Inverso del índice de proporciones de Czekanowski (arriba) y de porcentaje de disimilitud SIMPER (abajo) de los estadios de desarrollo según Gosner en larvas de *Rhinella arenarum* en los diferentes tratamientos: 0 mg/L (C), glifosato 1,5 mg/L (GL), glifosato 2,5 mg/L (GH), predador (P), predador + glifosato 1,5 mg/L (PGL), predador + glifosato 2,5 mg/L (PGH). Los valores están expresados en porcentaje. Mínimo y máximo de similitud de cada análisis resaltado en negrita.

	C	GL	GH	P	PGL	PGH
C		24	25	47	30	<b>11</b>
GL	24		13	32	25	24
GH	26	14		31	21	22
P	<b>46</b>	32	32		27	43
PGL	30	26	21	27		27
PGH	13	24	23	43	28	

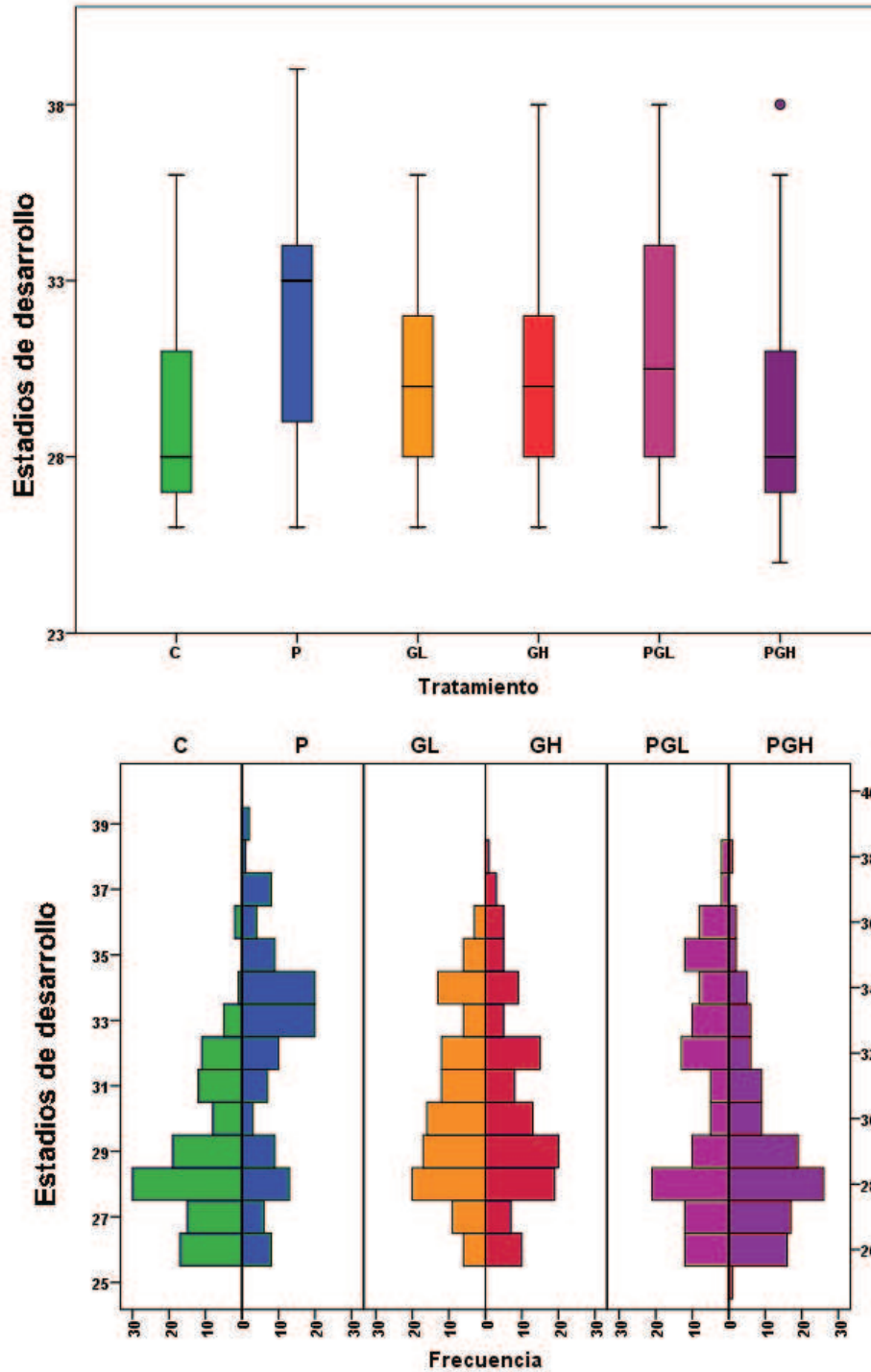
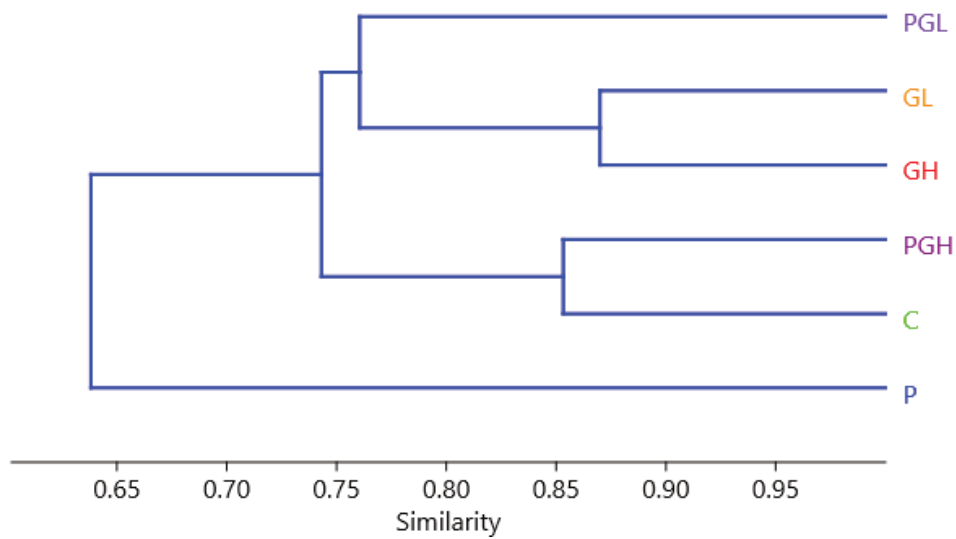



Figura 22. Diagrama de cajas (arriba) e histograma de los estadios de desarrollo según Gosner de larvas de *Rhinella arenarum* con una combinación factorial con ausencia/presencia de depredadores y de tres concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato: 0 mg/L (C), glifosato 1,5 mg/L (GL), glifosato 2,5 mg/L (GH), predador (P), predador + glifosato 1,5 mg/L (PGL), predador + glifosato 2,5 mg/L (PGH).

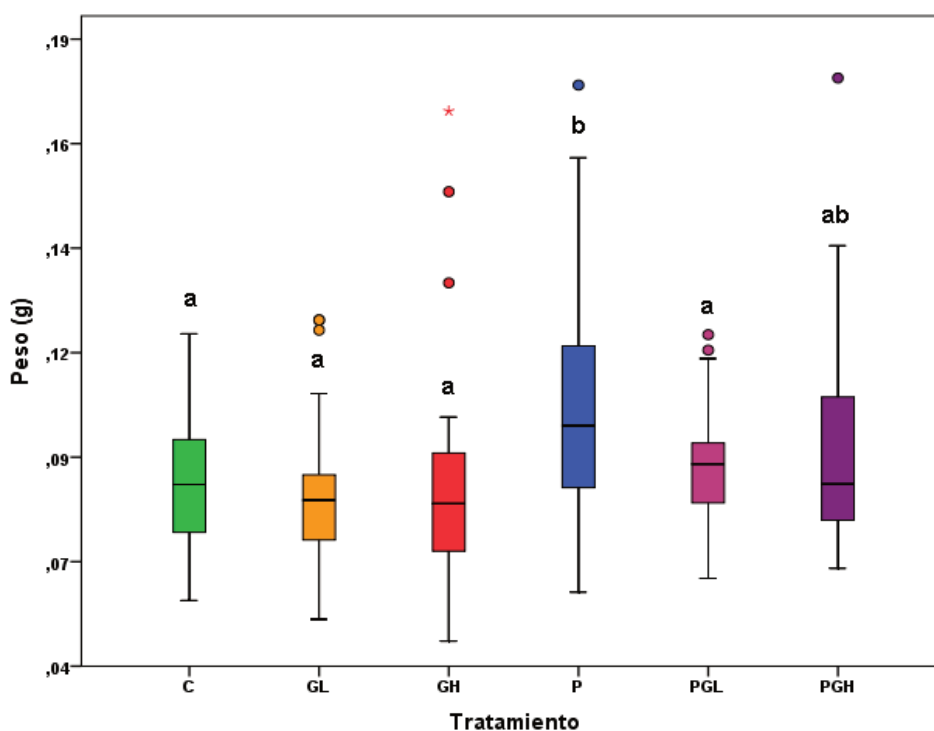


**Figura 23.** Dendrograma de similitud según Bray-Curtis de los estadios de desarrollo según Gosner en larvas de *Rhinella arenarum* con una combinación factorial con presencia/ausencia de depredadores y de tres concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato: 0 mg/L (C), glifosato 1,5 mg/L (GL), glifosato 2,5 mg/L (GH), predador (P), predador + glifosato 1,5 mg/L (PGL), predador + glifosato 2,5 mg/L (PGH).

Una vez reabsorbida la cola y finalizada la metamorfosis se analizó la existencia de diferencias en las variables de crecimiento peso, largo total, ancho de cabeza y BCI entre tratamientos a través de un ANOVA de dos vías con dos niveles para el factor PRED (ausencia/presencia) y tres niveles para el factor GLY (0 mg/L; 1,5 mg/L y 2,5 mg/L; **Tabla 10**). Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en la variable peso luego de la exposición a PRED y GLY **Figura 24 y 25**). De manera similar, se encontraron diferencias significativas para el LT luego de la exposición a PRED, GLY e interacciones ( $F=4,018$ ;  $p=0,019$ ) entre factores (**Figura 26 y 27**). La variable ancho de cabeza también mostró diferencias significativas luego de la exposición a PRED ( $F=28,656$ ;  $p=0,0001$ ), GLY ( $F=5,717$ ;  $p=0,004$ ) e interacciones ( $F=4,923$ ;  $p=0,008$ ; **Figura 28 y 29**). Además se detectaron interacciones para la variable BCI ( $F=3,28$ ;  $p=0,039$ ; **Figura 30 y 31**).

**Tabla 10.** Valores de significancia del análisis de varianza de las variables largo total (LT), peso, ancho de cabeza y BCI de juveniles de *Rhinella arenarum* expuestas a depredadores (PRED) y glifosato (GLY 0; 1,5 y 2,5 mg/L). Valores significativos ( $p < 0,05$ ) resaltados en negrita.

<i>R. arenarum</i>		Peso (g)		Largo total (mm)		Ancho de cabeza (mm)		BCI	
		F	p	F	p	F	p	F	p
	PRED	18,36	0,0001*	16,615	0,0001*	28,656	0,0001*	0,287	0,593
	GLY	3,68	0,026*	4,657	0,01*	5,717	0,004*	1,032	0,358
	PRED*GLY	1,609	0,202	4,018	0,019*	4,923	0,008*	3,28	0,039*



**Figura 24.** Gráfico de cajas del peso de juveniles de *Rhinella arenarum* con una combinación factorial con presencia/ausencia de depredadores y de tres concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato: 0 mg/L (C), glifosato 1,5 mg/L (GL), glifosato 2,5 mg/L (GH), predador (P), predador + glifosato 1,5 mg/L (PGL), predador + glifosato 2,5 mg/L (PGH). Letras distintas por encima de los bigotes representan diferencias estadísticamente significativas (post hoc de Tukey,  $p < 0,05$ ).

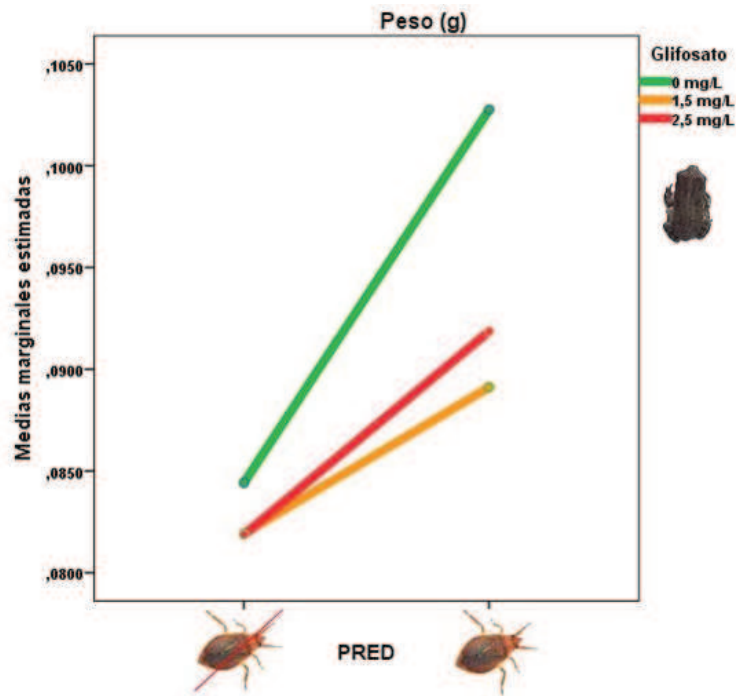


Figura 25. Gráfica de efectos principales del peso de juveniles de *Rhinella arenarum* de una combinación factorial con ausencia (izq.) presencia (der.) de depredadores y de tres concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato: 0 mg/L; 1,5 mg/L y 2,5mg/L.

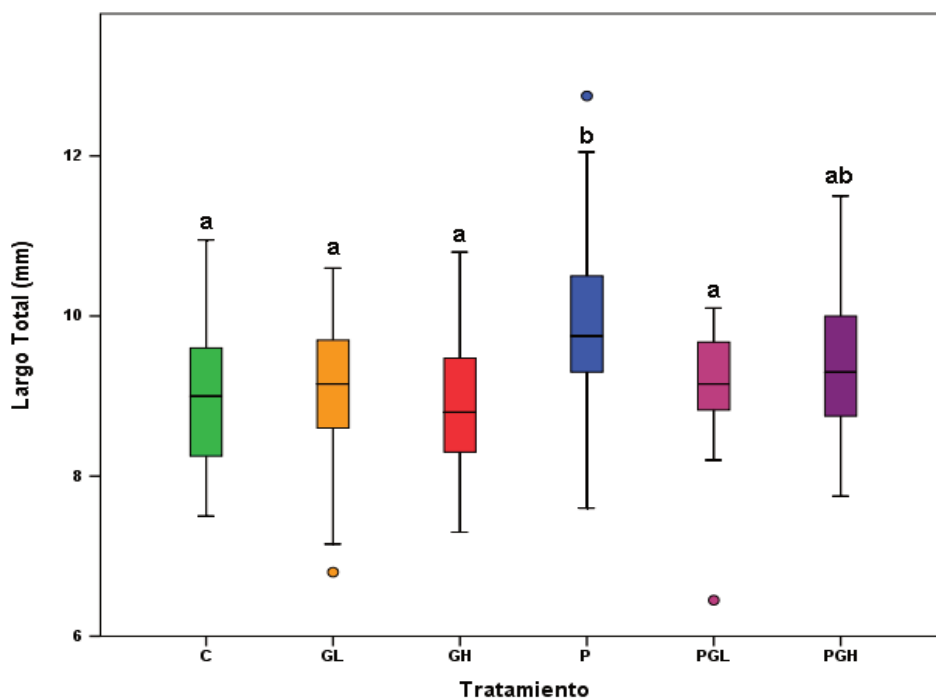


Figura 26. Gráfico de cajas del largo total de juveniles de *Rhinella arenarum* con una combinación factorial con ausencia/presencia de depredadores y de tres concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato: 0 mg/L (C), glifosato 1,5 mg/L (GL), glifosato 2,5 mg/L (GH), predador (P), predador + glifosato 1,5 mg/L (PGL), predador + glifosato 2,5 mg/L (PGH). Letras distintas por encima de los bigotes representan diferencias estadísticamente significativas (post hoc de Tukey,  $p < 0,05$ ).



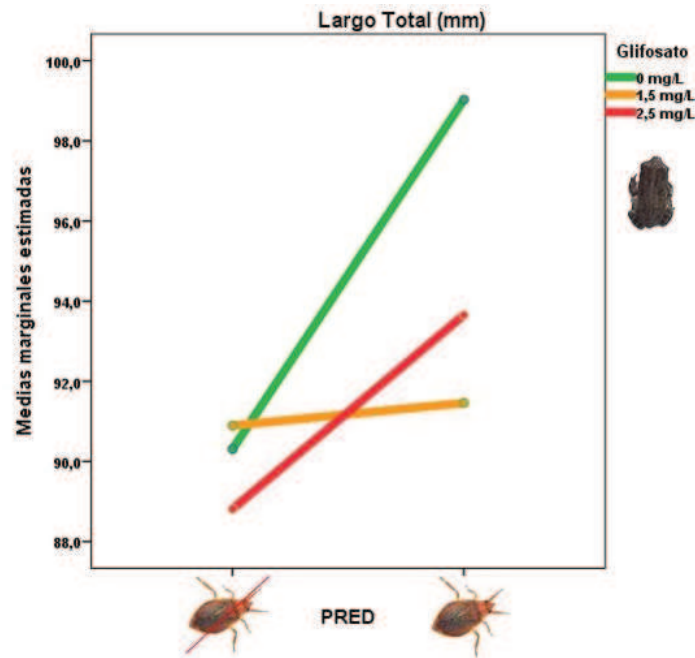


Figura 27. Gráfica de efectos principales e interacciones del largo total de juveniles de *Rhinella arenarum* de una combinación factorial con ausencia (izq.) presencia (der.) de depredadores y de tres concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato: 0 mg/L, 1,5 mg/L y 2,5 mg/L.

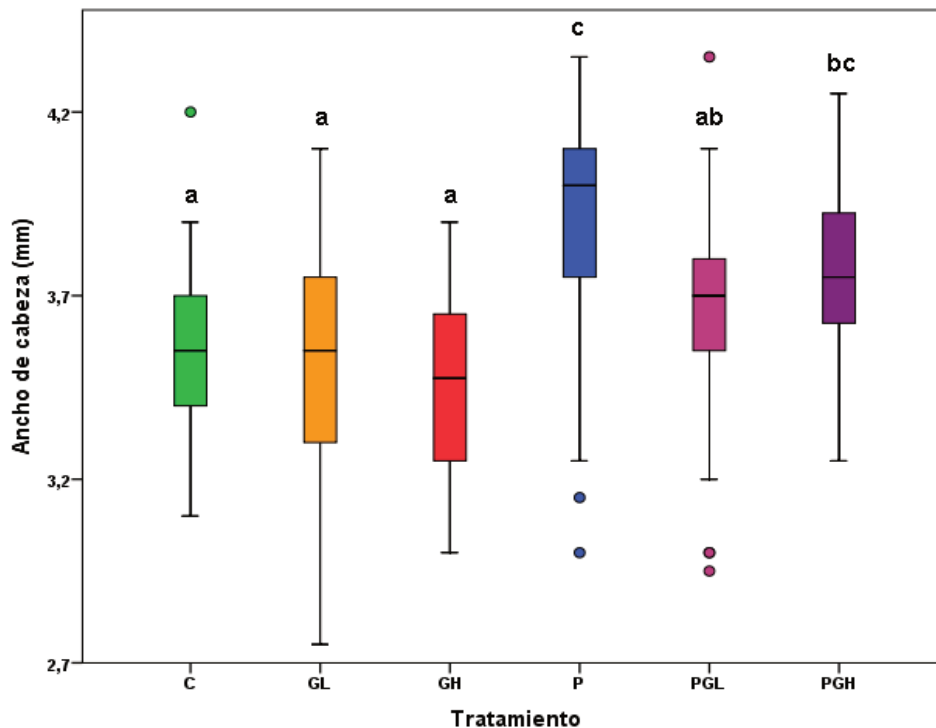


Figura 28. Gráfico de cajas del ancho de cabeza de juveniles de *Rhinella arenarum* con una combinación factorial con presencia/ausencia de depredadores y de tres concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato: 0 mg/L (C), glifosato 1,5 mg/L (GL), glifosato 2,5 mg/L (GH), predador (P), predador + glifosato 1,5 mg/L (PGL), predador + glifosato 2,5 mg/L (PGH). Letras distintas por encima de los bigotes representan diferencias estadísticamente significativas (post hoc de Tukey,  $p < 0,05$ ).

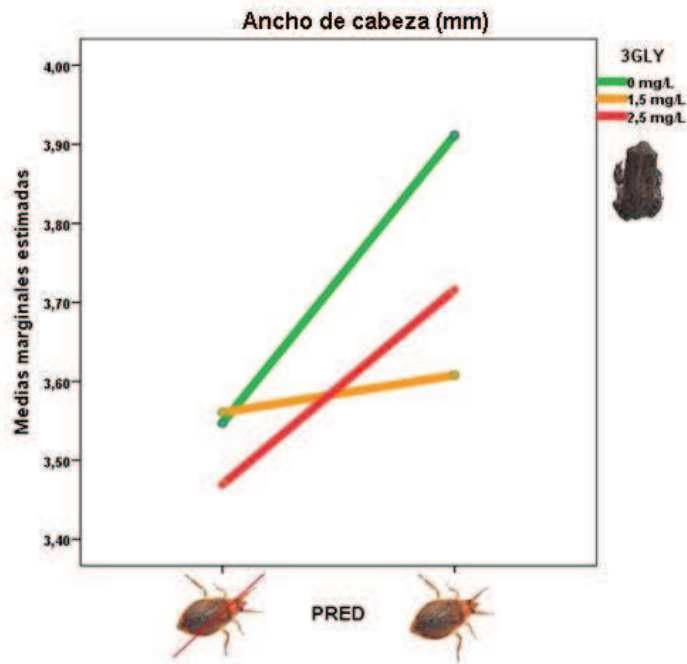


Figura 29. Gráfica de efectos principales e interacciones del ancho de cabeza de juveniles de *Rhinella arenarum* de una combinación factorial con ausencia (izq.) presencia (der.) de depredadores y de tres concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato (GLY): 0 mg/L; 1,5 mg/L y 2,5 mg/L.

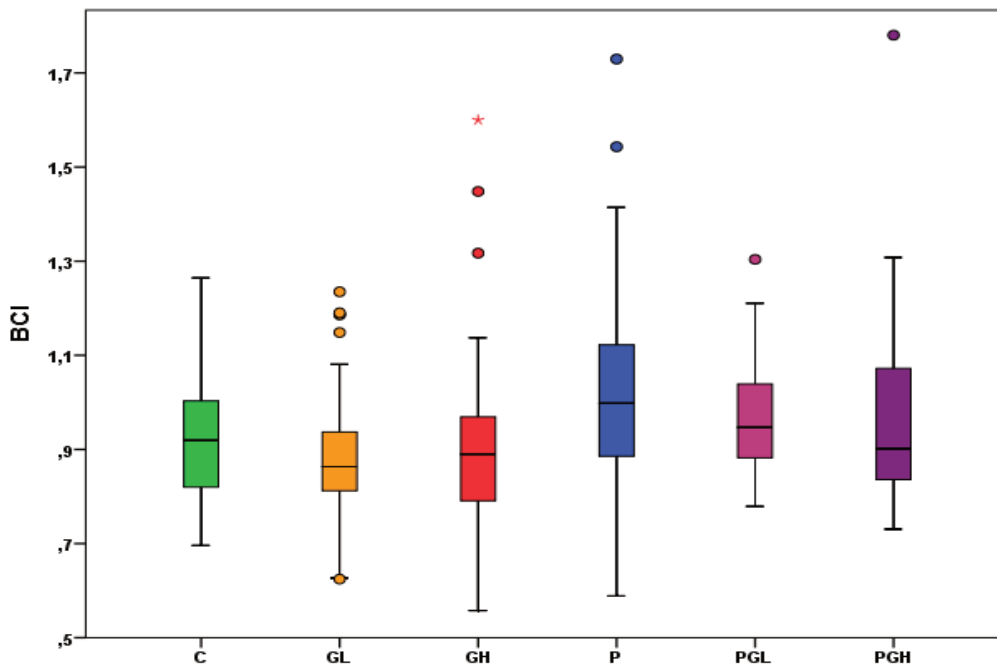
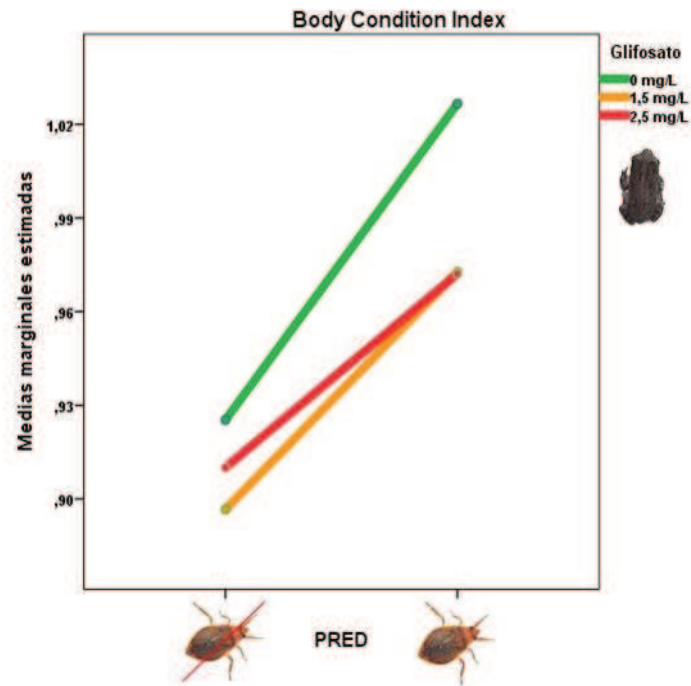


Figura 30. Gráfico de cajas del índice de condición corporal (BCI) de juveniles de *Rhinella arenarum* con una combinación factorial con presencia/ausencia de depredadores y de tres concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato: 0 mg/L (C), glifosato 1,5 mg/L (GL), glifosato 2,5 mg/L (GH), predador (P), predador + glifosato 1,5 mg/L (PGL), predador + glifosato 2,5 mg/L (PGH). Post hoc de Tukey,  $p > 0,05$ .





**Figura 31.** Gráfica de interacciones del índice de condición corporal (BCI) de juveniles de *Rhinella arenarum* de una combinación factorial con ausencia (izq.) presencia (der.) de depredadores y de tres concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato: 0 mg/L; 1,5 mg/L y 2,5 mg/L.

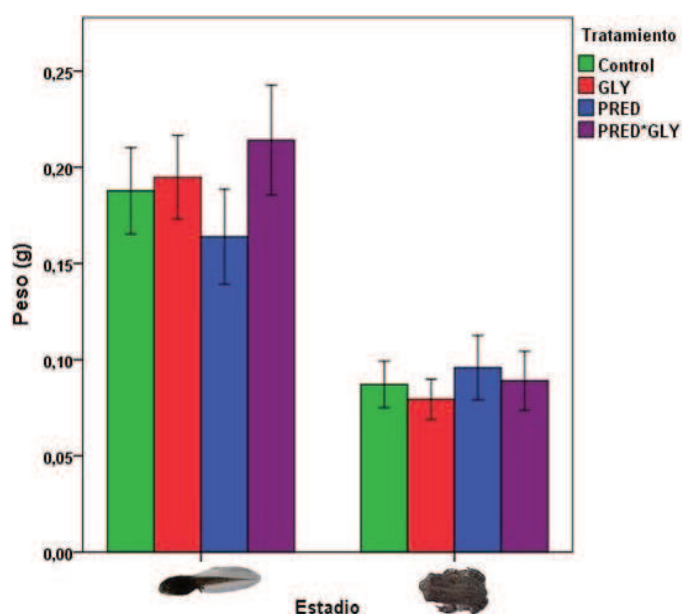
**4.2.2. Experimento crónico 2 (EC2): Evaluación de los efectos de la exposición crónica a glifosato y a depredadores en variables morfométricas, enzimáticas y hormonales de larvas de *R. arenarum*, *P. albonotatus* y *S. nasicus***

**4.2.2.1. Resultados de variables de morfometría clásica**

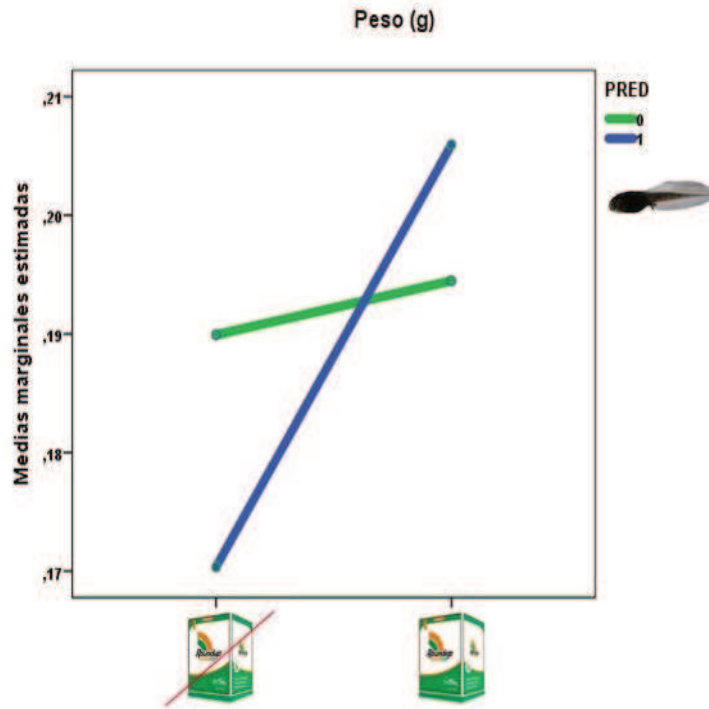
Los resultados obtenidos a partir de la evaluación del efecto de PRED y GLY sobre las variables de crecimiento peso y largo total en larvas y juveniles de *R. arenarum* se detallan en la **Tabla 11**. En larvas se observó un incremento significativo del peso ( $F=3,152$ ;  $p=0,035$ ; **Figura 32 y 33**) y del largo total ( $F=3,769$ ;  $p=0,046$ ; **Figura 34 y 35**) luego de la exposición a GLY respecto al control. No se registraron diferencias significativas en juveniles para ninguna de las variables analizadas.

**Tabla 11.** Valores de significancia del análisis de varianza de las variables peso y largo total (LT) de larvas y juveniles de *Rhinella arenarum* expuestas a 2,5 mg/L de glifosato (GLY) y depredadores (PRED). Valores significativos ( $p<0,05$ ) resaltados en negra y asterisco.

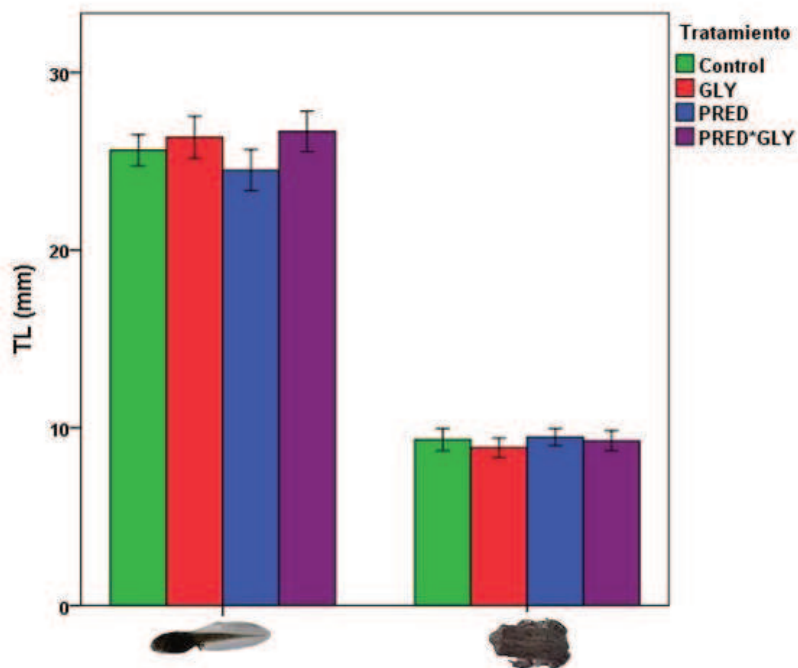
<i>R. arenarum</i>		Peso (g)		Largo Total (mm)	
		F	p	F	p
	Estadio de desarrollo	3,81	0,059	7,787	<b>0,008*</b>
	PRED	0,15	0,701	1,254	0,27
	GLY	3,152	<b>0,035*</b>	3,769	<b>0,046*</b>
	PRED * GLY	2,031	0,163	0,583	0,45
	PRED	2,247	0,143	1,193	0,282
	GLY	1,393	0,246	1,837	0,184
	PRED * GLY	0,005	0,941	0,256	0,616



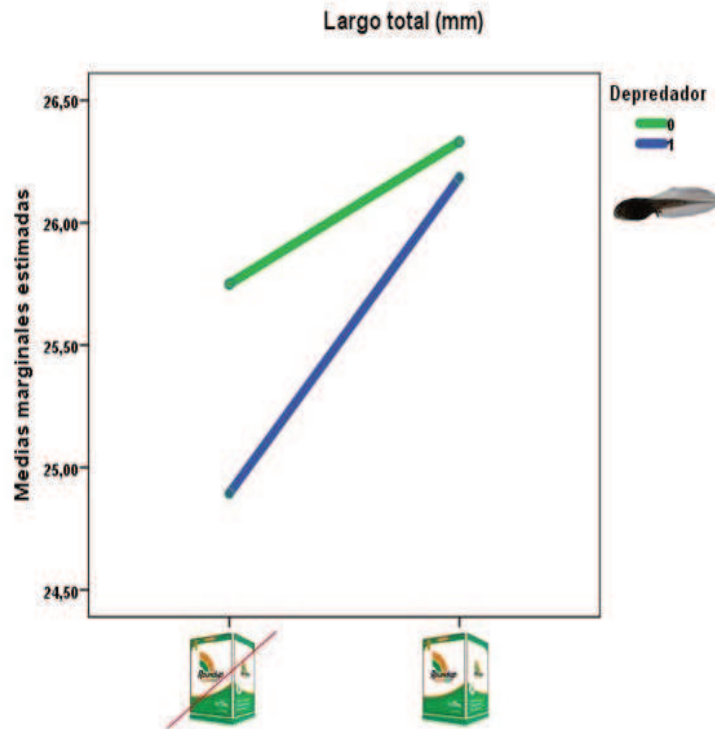
**Figura 32.** Media e intervalos de confianza del peso en larvas y juveniles de *Rhinella arenarum* sin exposición (Control), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\* GLY).



**Figura 33.** Gráfica de efectos principales del peso de larvas de *Rhinella arenarum* de una combinación factorial con ausencia (0) presencia (1) de depredadores y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato: 0 mg/L (izq.) y 2,5 mg/L (der.).



**Figura 34.** Media e intervalos de confianza del largo total (LT) en larvas y juveniles de *Rhinella arenarum* sin exposición (Control), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\*GLY).





**Figura 35.** Gráfica de efectos principales del largo total de larvas de *Rhinella arenarum* de una combinación factorial con ausencia (0) presencia (1) de depredadores y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato: 0 mg/L (izq.) y 2,5 mg/L (der.).

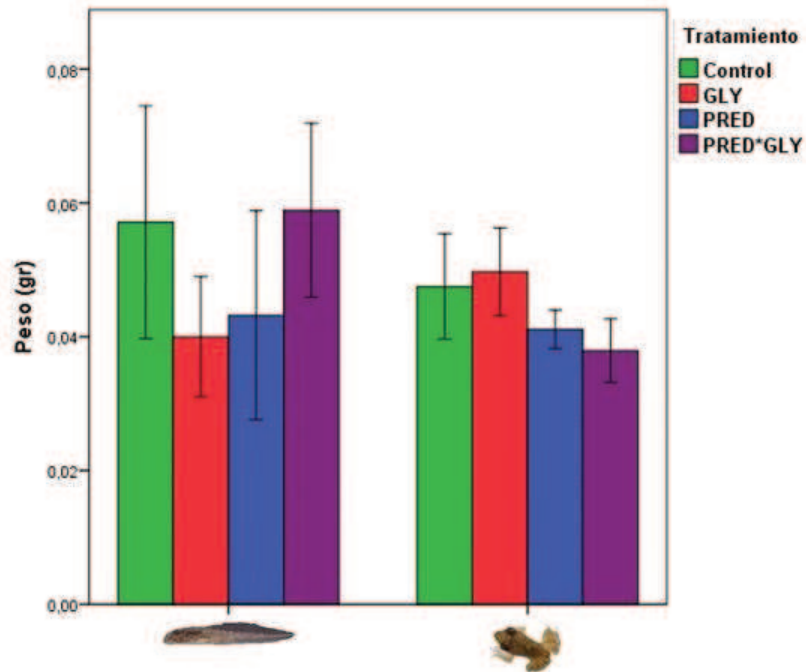
Se evaluaron los efectos de PRED y GLY sobre las variables de crecimiento peso y largo total en larvas y juveniles de *P. albonotatus* a través de un ANOVA de dos vías (Tabla 12). En larvas, los resultados obtenidos indican interacciones entre los factores PRED\*GLY en la variable peso ( $F= 5,005$ ;  $p=0,0323$ ; Figura 36 y 37). En juveniles se observó una disminución significativa en el peso luego de la exposición a PRED ( $F=12,524$ ;  $p=0,001$ ; Figura 36 y 38). No se registraron diferencias significativas de la variable LT en larvas ni en juveniles ( $p>0,05$ ; Figura 39).

**Tabla 12.** Valores de significancia del análisis de varianza de las variables peso y largo total (LT) de larvas y juveniles de *Physalaemus albonotatus* expuestas a 2,5 mg/L de glifosato (GLY) y depredadores (PRED). Valores significativos ( $p<0,05$ ) resaltados en negrita y asterisco.

<i>P. albonotatus</i>	Peso (g)		Largo Total (mm)	
	F	p	F	p



	Gosner	13,115	0,001*	22,544	0,0001*
	PRED	0,114	0,738	0,525	0,474
	GLY	1,623	0,211	2,74	0,107
	PRED * GLY	5,005	0,032*	0,546	0,465
	PRED	12,524	0,001*	0,723	0,401
	GLY	0,038	0,847	0,006	0,937
	PRED * GLY	1,103	0,301	0,222	0,641



**Figura 36.** Media e intervalos de confianza del peso en larvas y juveniles de *Physalaemus albonotatus* sin exposición (Control), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\* GLY).

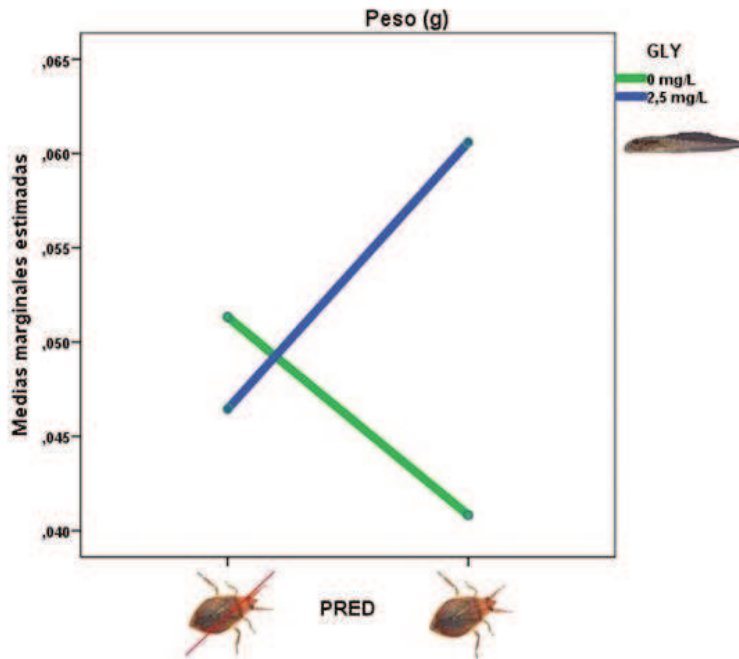


Figura 37. Gráfica de efectos principales e interacciones del peso de larvas de *Physalaemus albonotatus* de una combinación factorial con ausencia (izq.) presencia (der.) de depredadores (PRED) y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato (GLY): 0 mg/L y 2,5mg/L.

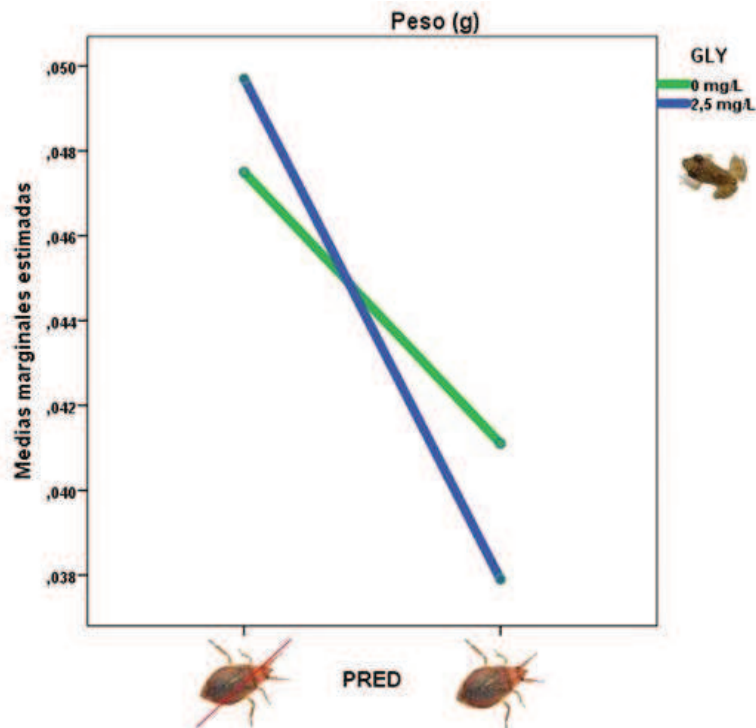
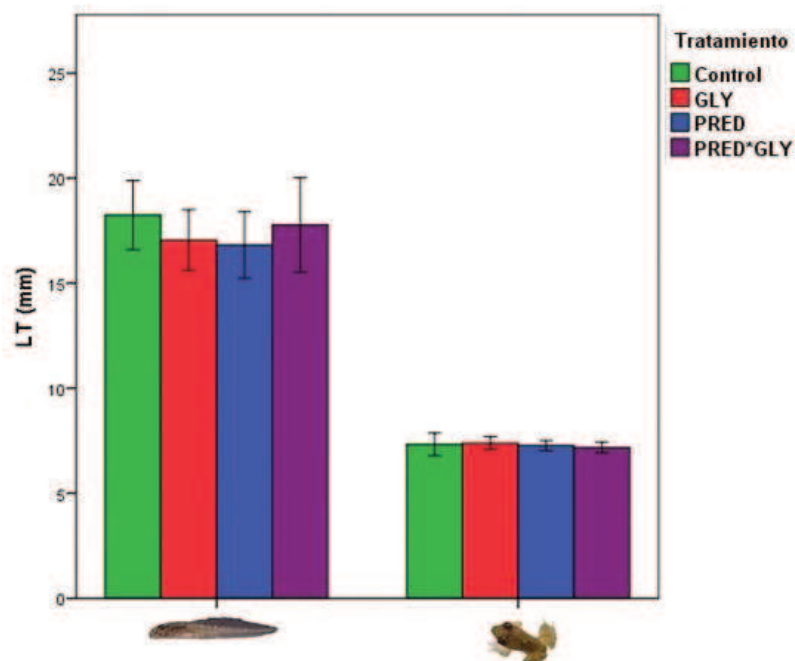



Figura 38. Gráfica de efectos principales del peso de juveniles de *Physalaemus albonotatus* de una combinación factorial con ausencia (izq.) presencia (der.) de depredadores y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato (GLI): 0 mg/L y 2,5mg/L.



**Figura 39.** Media e intervalos de confianza del largo total (LT) en larvas y juveniles de *Physalaemus albonotatus* sin exposición (Control), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\*GLY).

Se determinó el efecto de PRED y GLY sobre las variables de crecimiento peso (**Figura 40**) y largo total (**Figura 41**) en larvas y juveniles de *S. nasicus* a través de un ANOVA de dos vías (**Tabla 13**). Los resultados obtenidos demuestran un incremento significativo en la variable largo total en juveniles expuestos a GLY ( $F=5,301$ ;  $p=0,027$ ; **Figura 42**). No se registraron diferencias significativas en el peso y el LT de larvas ni el peso de juveniles ( $p>0,05$ ).

**Tabla 13.** Valores de significancia del análisis de varianza de las variables peso y largo total (LT) de larvas y juveniles de *Scinax nasicus* expuestas a 2,5 mg/L de glifosato (GLY) y depredadores (PRED). Valores significativos ( $p<0,05$ ) resaltados en negra y asterisco.

<i>S. nasicus</i>		Peso (g)		Largo Total (mm)		
		F	P	F	p	
	Gosner	6,556	<b>0,015*</b>	7,085	<b>0,012*</b>	
	PRED	0,856	0,361	0,021	0,886	
	GLY	0,639	0,429	1,82	0,186	
	PRED * GLY	2,951	0,095	0,977	0,33	
		PRED	0,925	0,342	0,128	0,723
		GLY	0,925	0,342	<b>5,301</b>	<b>0,027*</b>



PRED \* GLY                      0,748                      0,393                      0,286                      0,596

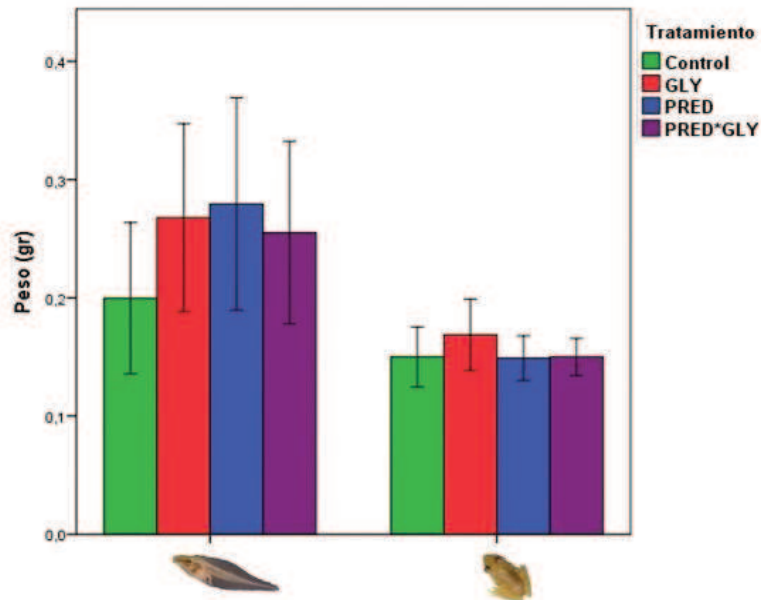


Figura 40. Media e intervalos de confianza del peso de larvas y juveniles de *Scinax nasicus* sin exposición (Control), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\* GLY).

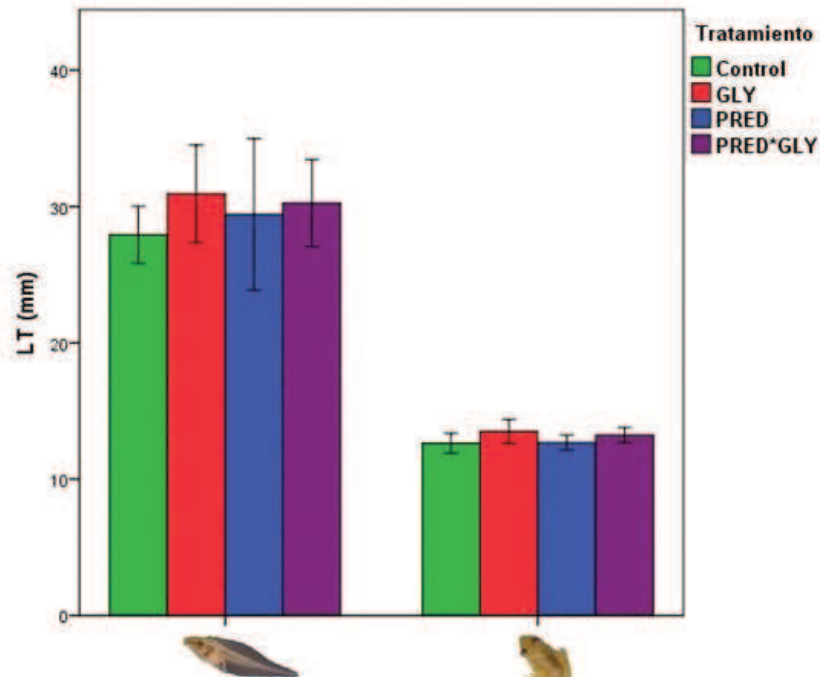
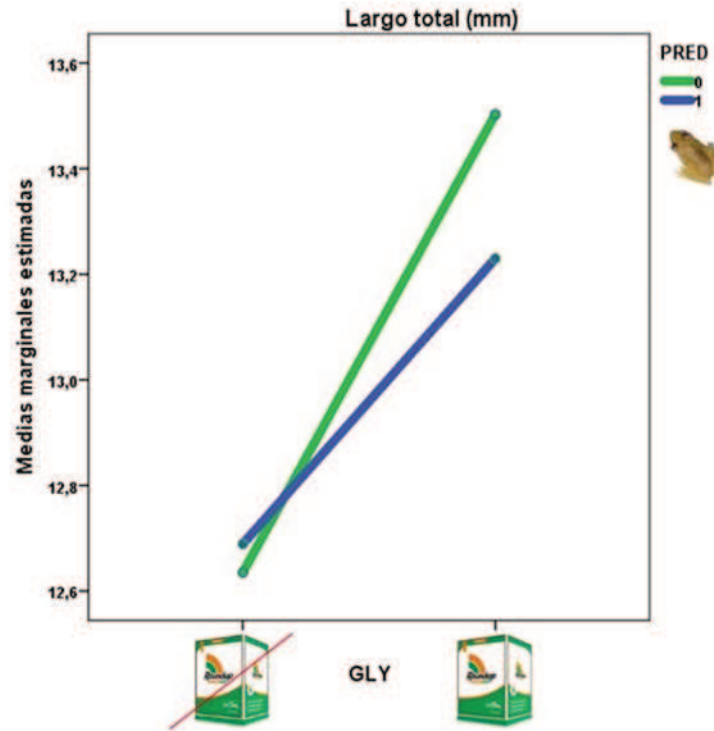


Figura 41. Media e intervalos de confianza del largo total (LT) en larvas y juveniles de *Scinax nasicus* sin exposición (Control), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\* GLY).








**Figura 42.** Gráfica de efectos principales del largo total de juveniles de *Scinax nasicus* de una combinación factorial con ausencia (0) presencia (1) de depredadores y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato (GLY): 0 mg/L (izq.) y 2,5 mg/L (der.).

#### 4.2.2.2. Resultados de variables de morfometría geométrica




Respecto a la variable tamaño de centroide, el Kruskal Wallis no mostró diferencias entre tratamientos en larvas de *R. arenarum* (KW=0,159; p=0,984); de *P. albonotatus* (KW=2,620; p=0,454); ni de *S. nasicus* (KW=1,595; p=0,661) ni en juveniles de *P. albonotatus* (KW=5,651; p=0,130) ni de *S. nasicus* (KW=1,595; p=0,661). Sin embargo, a través del AVC de las distancias de Procrustes sí se hallaron diferencias morfológicas significativas entre tratamientos en larvas de la especie *R. arenarum* (Tabla 14). Las diferencias en la morfología de larvas de *R. arenarum* se dieron entre los tratamientos control y GLY; control y PRED+GLY; GLY y PRED y PRED y PRED+GLY (Tabla 14, Figura 43).

Además, el AVC no halló diferencias significativas entre tratamientos en larvas y juveniles de las especies *P. albonotatus* y *S. nasicus* (Tabla 14, Figuras 44-47). En este contexto, el porcentaje de varianza canónica CV1 fue de 45% para larvas de *R. arenarum*, 60% para larvas de *P. albonotatus* y 75% para larvas de *S. nasicus*, mientras que fue de 56% y 41% para juveniles de *P. albonotatus* y de *S. nasicus* respectivamente (Tabla 15).


**Tabla 14.** Distancias de Procrustes de cuatro tratamientos en larvas y juveniles de *Rhinella arenarum*, *Physalaemus albonotatus* y *Scinax nasicus*. Valores de p significativos con asterisco y en negrita ( $p < 0,05$ :\*).

Especie	Tratamientos	Control	GLY	PRED
<i>R. arenarum</i> 	GLY	<b>0,0213*</b>		
	PRED	0,0159	<b>0,0247*</b>	
	PRED+GLY	<b>0,0242*</b>	0,0165	<b>0,026*</b>
<i>P. albonotatus</i> 	GLY	0,0095		
	PRED	0,0164	0,0144	
	PRED+GLY	0,022	0,0175	0,0136
<i>P. albonotatus</i> 	GLY	0,0358		
	PRED	0,012	0,0328	
	PRED+GLY	0,0372	0,0367	0,0341
<i>S. nasicus</i> 	GLY	0,0318		
	PRED	0,0356	0,0287	
	PRED+GLY	0,03	0,0374	0,0399
<i>S. nasicus</i> 	GLY	0,0279		
	PRED	0,0288	0,0328	
	PRED*GLY	0,0208	0,0164	0,0303

**Tabla 15.** Eigenvalues, porcentaje de varianza y porcentaje acumulado de varianza en larvas y juveniles de las especies *Rhinella arenarum*, *Physalaemus albonotatus* y *Scinax nasicus*.

Especie	CV n°	Eigenvalues	%Varianza	%Acumulativa
<i>R. arenarum</i> 	1	3,00	44,9	44,9
	2	2,33	34,8	79,7
	3	1,35	20,3	100
<i>P. albonotatus</i> 	1	20,54	60,1	60,1
	2	8,38	24,5	84,6
	3	5,27	15,4	100
<i>P. albonotatus</i> 	1	2,31	55,7	55,7
	2	1,30	31,2	86,9
	3	0,54	13,1	100



<i>S. nasicus</i>	1	94,40	75,2	75,2
	2	18,55	14,8	90,0
	3	12,54	10,0	100,0
<i>S. nasicus</i>	1	1,09	41,3	41,3
	2	0,73	27,9	69,3
	3	0,51	19,5	88,8

En larvas de *R. arenarum*, la CV1 correspondió a la separación de los grupos con y sin PRED caracterizada por desplazamientos hacia abajo de los LM7 y LM9 que corresponden a la cola y la reconfiguraciones de LM a nivel de la cabeza (Figura 44). La CV2 de larvas de *R. arenarum* separó a los tratamientos con y sin GLY según desplazamientos centrífugos en los LM7 y LM9 en la región caudal y otras reconfiguraciones a nivel de la región cefálica (Figura 44).

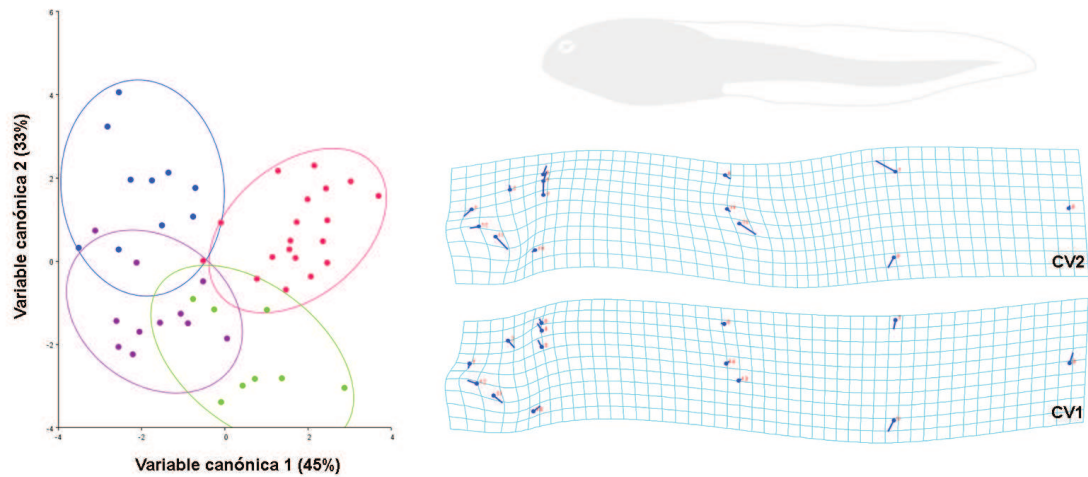
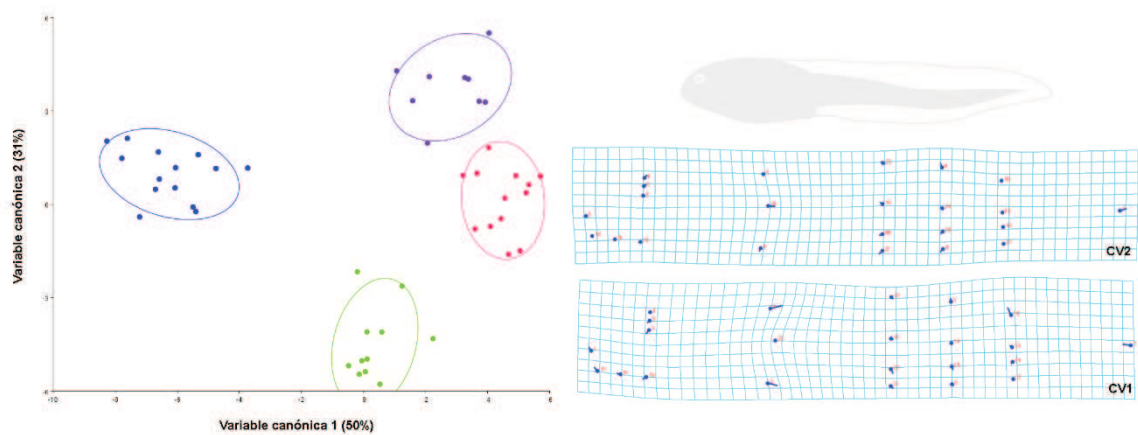


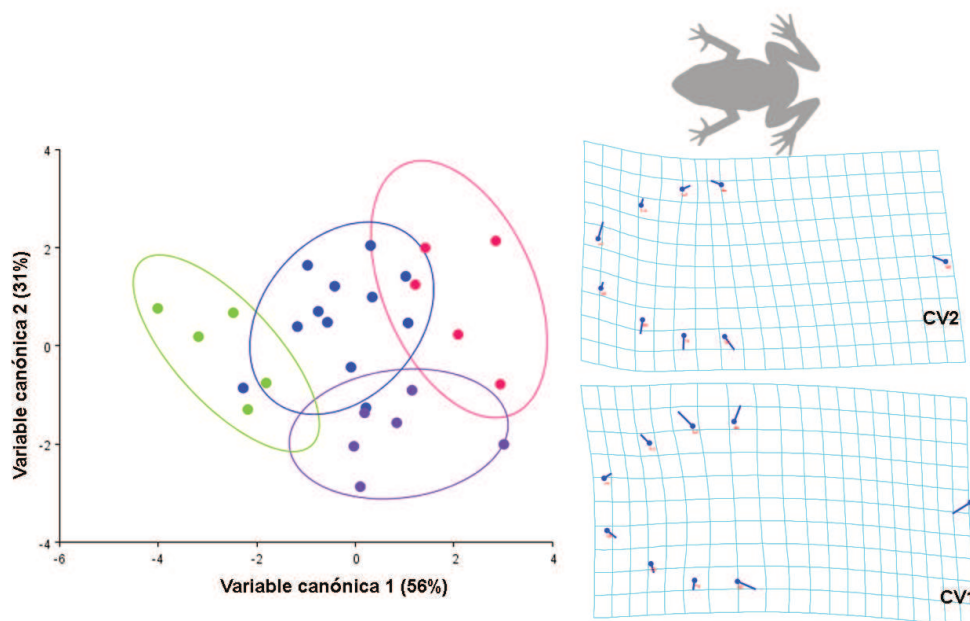
Figura 44. Análisis de variables canónicas basado en landmarks de larvas de *Rhinella arenarum* expuestos a cuatro tratamientos: control (verde), glifosato (rojo), glifosato+depredador (violeta), depredador (azul). Elipses de 90% de confianza.

En larvas de *P. albonotatus*, CV1 explicó las diferencias morfométricas entre tratamientos con un acortamiento del largo de la cola respecto al consenso LM7 y agrandamiento del cuerpo LM5 y ML9 (Figura 45). El CV2 diferenció los tratamientos en función de un alargamiento de la cola LM7 y de la parte media del cuerpo LM23 (Figura 45).



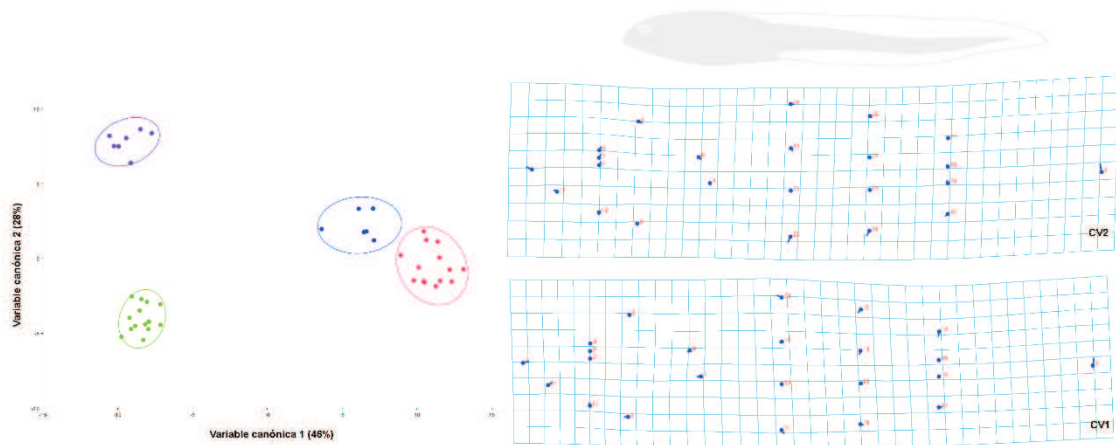
**Figura 45.** Análisis de variables canónicas de larvas de *Physalaemus albonotatus* expuestas a cuatro tratamientos: control (verde), glifosato (rojo), glifosato+depredador (violeta), depredador (azul). Elipses de 90% de confianza.

Los cambios morfométricos de juveniles de *P. albonotatus* según el CV1 y CV2 están conformados por una compresión anteroposterior LM1, LM5 y LM9 y un ensanchamiento en la región cefálica LM2-LM4 y LM6-LM8 (**Figura 45**).



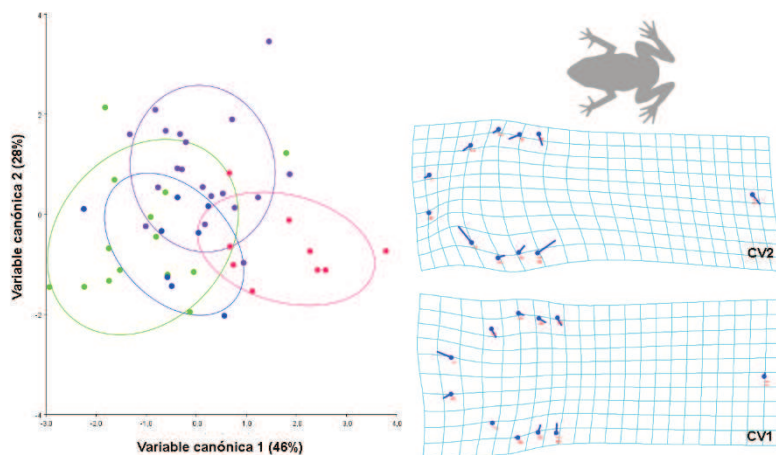
**Figura 45.** Análisis de variables canónicas de juveniles de *Physalaemus albonotatus* expuestas a cuatro tratamientos: control (verde), glifosato (rojo), glifosato+depredador (violeta), depredador (azul). Elipses de 90% de confianza.

En larvas de *S. nasicus*, CV1 explicó gran parte de las diferencias morfométricas entre tratamientos con ensanchamiento de la aleta caudal respecto al consenso LM29, LM33, y agrandamiento del cuerpo LM5 y ML9 (**Figura 46**). El CV2 diferenció los tratamientos en función de un alargamiento de la cola LM7 y de la parte media del cuerpo LM23 (**Figura 46**)



**Figura 46.** Análisis de variables canónicas de larvas de *Scinax nasicus* expuestas a cuatro tratamientos: control (verde), glifosato (rojo), glifosato+depredador (violeta), depredador (azul). Elipses de 90% de confianza.

Los cambios morfométricos de juveniles de *S. nasicus* según el CV1 corresponden a variaciones de alargamientos a nivel del hocico LM1 y LM6, y constreñimientos por detrás de la membrana timpánica LM4, LM5, LM9 y LM10 (**Figura 47**). La variante canónica CV2 muestra tendencias similares con reducción de la región cefálica LM2-LM5 y LM7-LM10 (**Figura 47**)





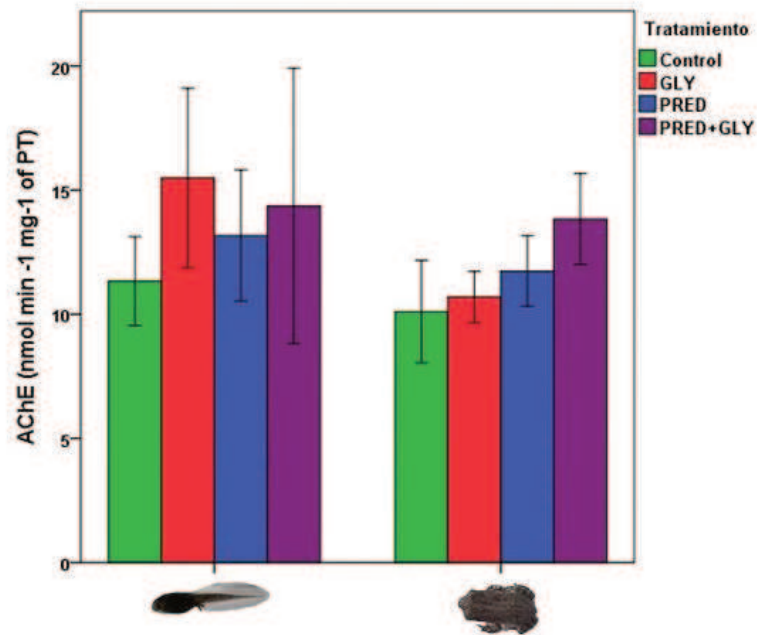
**Figura 47.** Análisis de variables canónicas de juveniles de *Scinax nasicus* expuestas a cuatro tratamientos: control (verde), glifosato (rojo), glifosato+depredador (violeta), depredador (azul). Elipses de 90% de confianza.

#### 4.2.2.3. Resultados variables enzimáticas

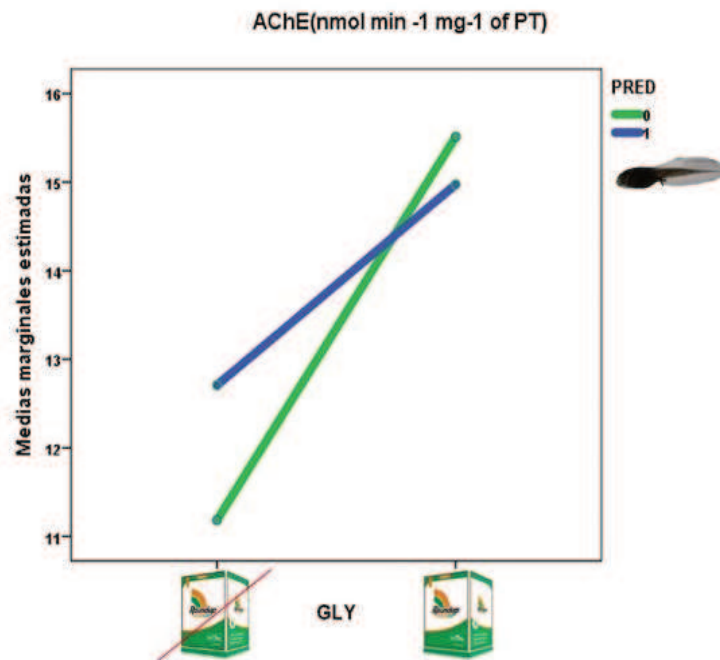
Se evaluaron los efectos de la exposición al predador *B. elongatum* (PRED) y al herbicida GLY sobre las concentraciones de acetilcolinesterasa y glutatión-s-transferasa (AChE y GST, respectivamente) en larvas y juveniles de *R. arenarum* mediante un ANOVA de dos vías (Tabla 16). En larvas, los resultados muestran un incremento significativo en la concentración de AChE luego de la exposición a GLY (F=3,498; p=0,04; Figura 48 y 49) y en juveniles posterior a la exposición a PRED (F=10,904; p=0,002; Figura 48 y 50) y al herbicida GLY (F=3,466; p=0,041; Figura 48 y 51). Los resultados obtenidos a partir de la determinación de GST posterior a la exposición de PRED y GLY no mostraron diferencias significativas en larvas ni en juveniles (p>0,05; Figura 52).

**Tabla 16.** Valores de significancia del análisis de varianza de las variables acetilcolinesterasa (AChE) y glutatión-s-transferasa (GST) de larvas y juveniles de *Rhinella arenarum* expuestas a 2,5 mg/L de glifosato (GLY) y depredadores (PRED). Valores significativos (p<0,05) resaltados en negrita y asterisco.

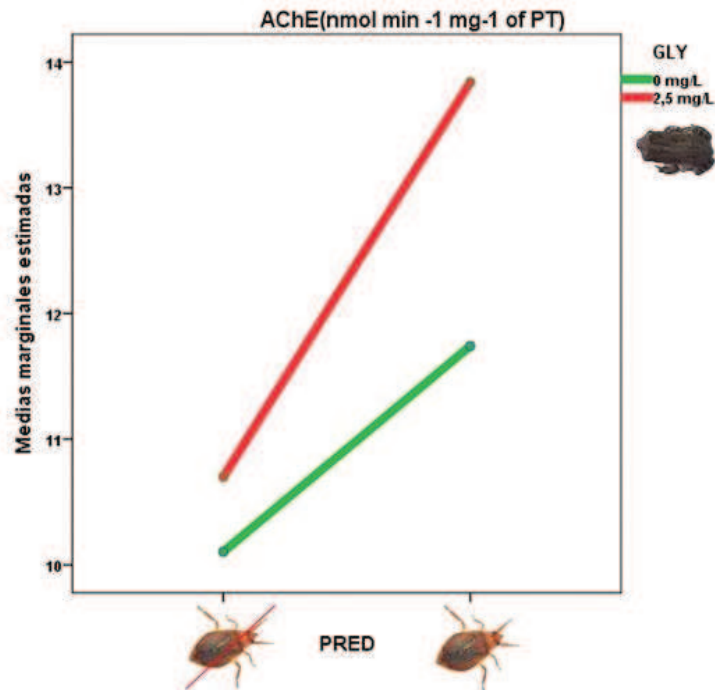
<i>R. arenarum</i>		AChE		GST	
		F	p	F	p
	Gosner	0,853	0,362	0,011	0,918
	PRED	0,091	0,765	1,369	0,25
	GLY	3,498	<b>0,04*</b>	2,362	0,133
	PRED * GLY	0,369	0,548	0,148	0,702
	PRED	10,904	<b>0,002*</b>	2,053	0,161
	GLY	3,466	<b>0,041*</b>	0,631	0,432
	PRED * GLY	1,08	0,306	0	0,988



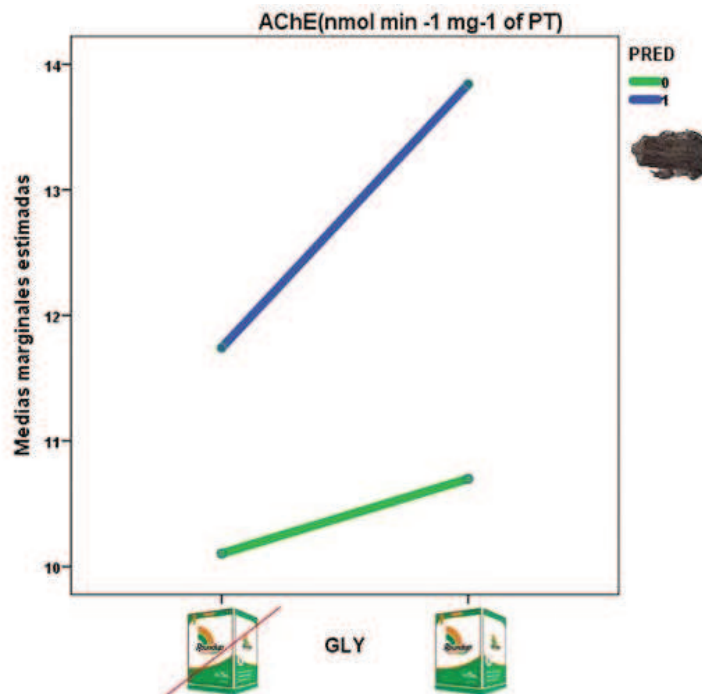
**Figura 48.** Media e intervalos de confianza de la concentración de acetilcolinesterasa (AChE) en larvas y juveniles de *Rhinella arenarum* sin exposición (Control), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\* GLY).



**Figura 49.** Gráfica de efectos principales en acetilcolinesterasa (AChE) en larvas de *Rhinella arenarum* de una combinación factorial con ausencia (0) presencia (1) de depredadores y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato (GLY): 0 mg/L (izq.) y 2,5 mg/L (der.).

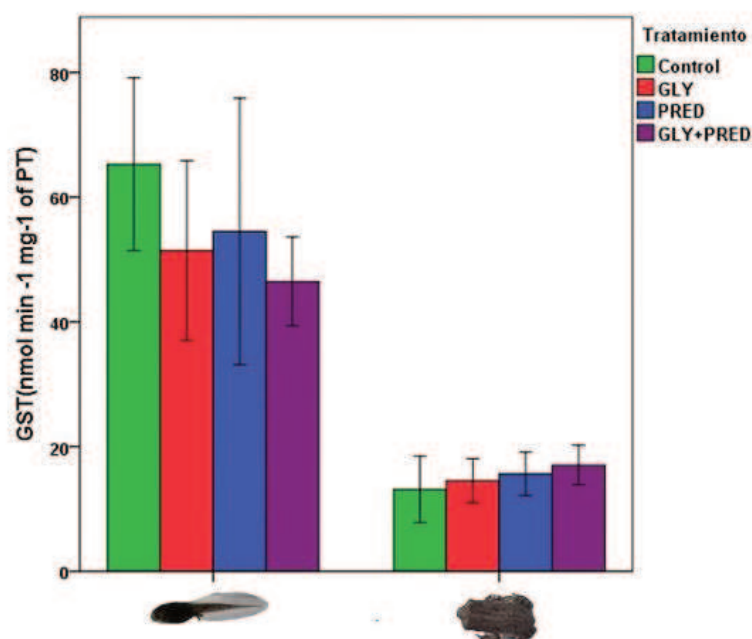


**Figura 50.** Gráfica de efectos principales en acetilcolinesterasa (AChE) en juveniles de *Rhinella arenarum* de una combinación factorial con ausencia (izq.) presencia (der.) de depredadores (PRED) y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato (GLY): 0 mg/L y 2,5 mg/L.



**Figura 51.** Gráfica de efectos principales en acetilcolinesterasa (AChE) en juveniles de *Rhinella arenarum* de una combinación factorial con ausencia (0) presencia (1) de depredadores (PRED) y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato (GLY): 0 mg/L (izq.) y 2,5 mg/L GLY (der.).






**Figura 52.** Media e intervalos de confianza de la concentración de glutatión-s-transferasa (GST) en larvas y juveniles de *Rhinella arenarum* sin exposición (Control), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\* GLY).

Se determinó el efecto de PRED y GLY sobre la concentración de AChE y GST en larvas y juveniles de *P. albonotatus* a través de un ANOVA de dos vías (Tabla 17). En larvas se observó un incremento significativo de la variable AChE luego de la exposición a PRED (F=3,263; p=0,049; Figura 53 y 54). De manera similar, en larvas también se registró un incremento significativo de GST luego de la exposición a PRED (F=12,72; p=0,001), al herbicida GLY (F=13,039; p=0,001), como así también se hallaron interacciones entre los factores evaluados PRED\*GLY (F=3,676, p=0,036; Figura 55 y 56). En adultos no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables evaluadas (p>0,05).

**Tabla 17.** Valores de significancia del análisis de varianza de las variables acetilcolinesterasa (AChE) y glutatión-s-transferasa (GST) de larvas y juveniles de *Physalaemus albonotatus* expuestas a 2,5 mg/L de glifosato (GLY) y depredadores (PRED). Valores significativos (p<0,05) resaltados en negrita y asterisco.

<i>P. albonotatus</i>	AChE		GST	
	F	p	F	p
Gosner	2,593	0,116	1,02	0,319
 PRED	3,263	<b>0,049*</b>	12,72	<b>0,001*</b>
GLY	1,17	0,287	13,039	<b>0,001*</b>
PRED * GLY	0,334	0,567	3,676	<b>0,036*</b>
PRED	0,789	0,38	0,33	0,569
GLY	1,609	0,213	0,003	0,957



PRED \* GLY      2,524      0,121      0,001      0,974

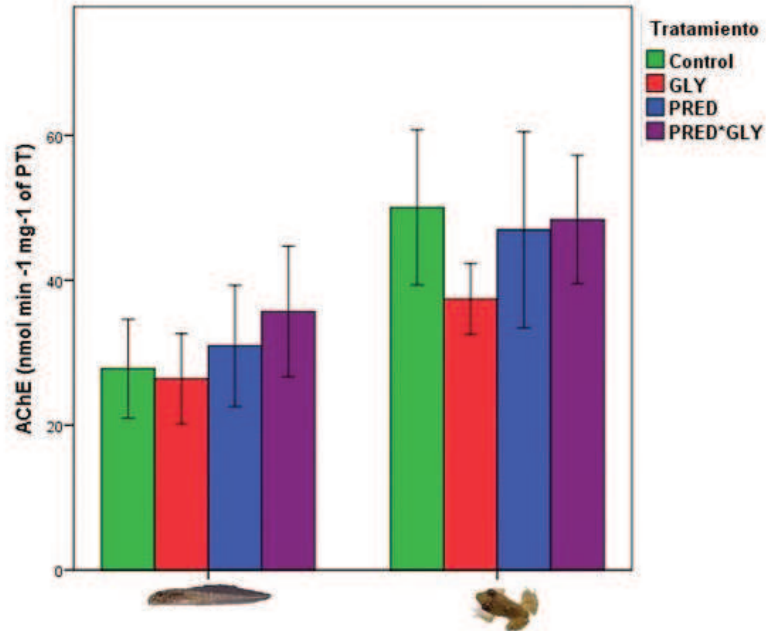


Figura 53. Media e intervalos de confianza de la concentración de acetilcolinesterasa (AChE) en larvas y juveniles de *Physalaemus albonotatus* sin exposición (Control), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\* GLY).

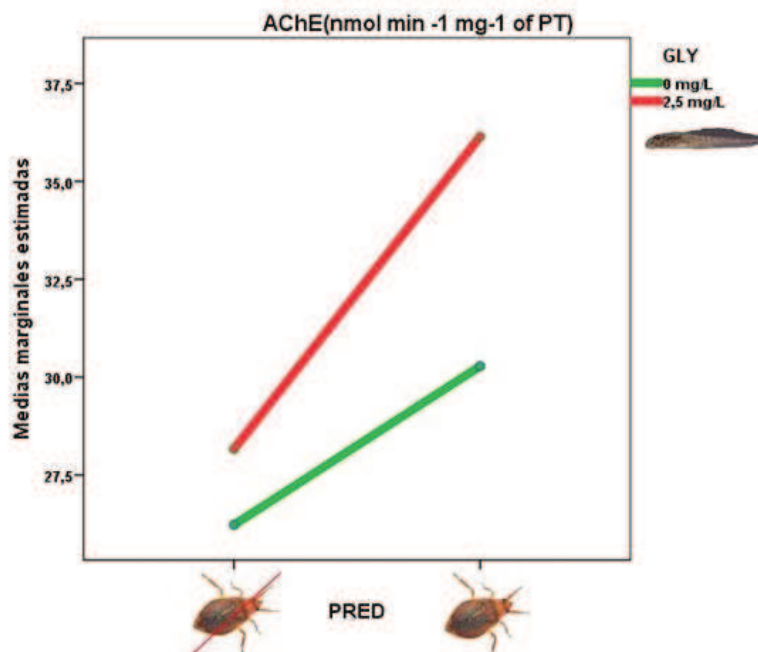
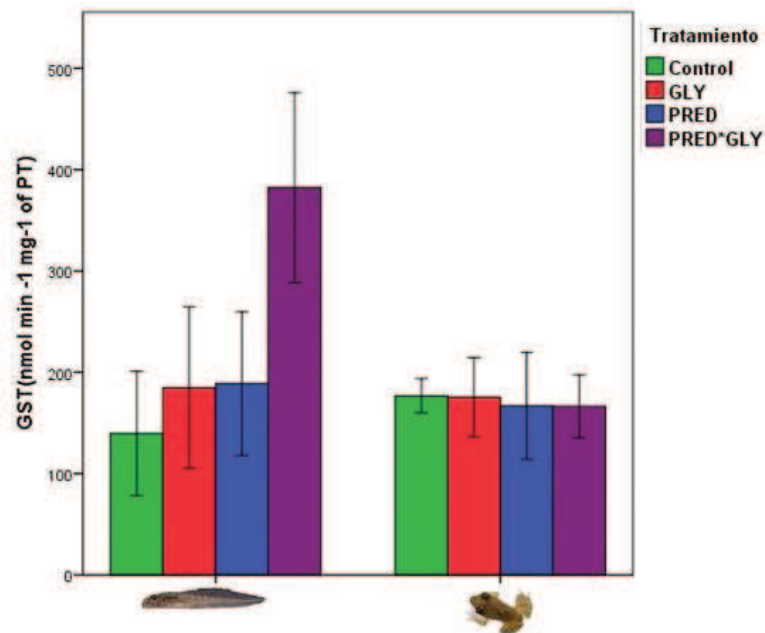
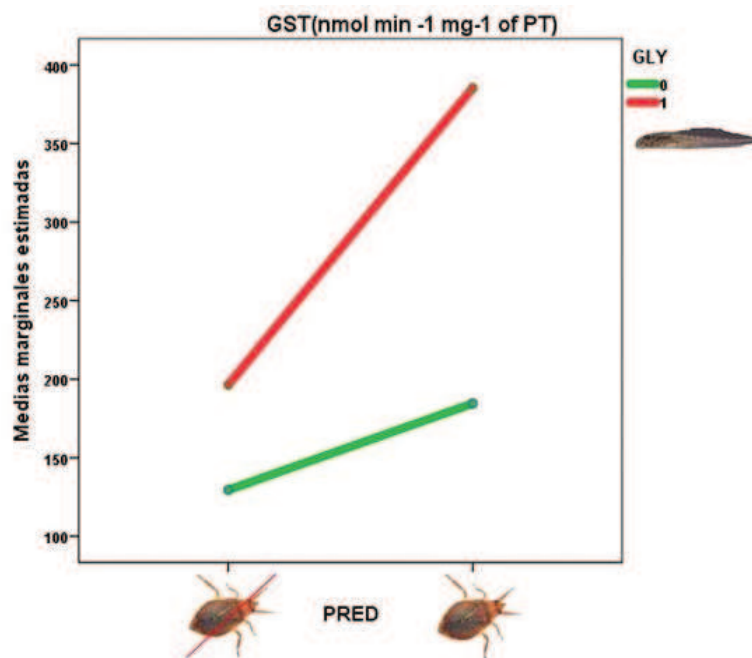


Figura 54. Gráfica de efectos principales en acetilcolinesterasa (AChE) en larvas de *Physalaemus albonotatus* de una combinación factorial con ausencia (izq.) presencia (der.)

de depredadores (PRED) y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato (GLY): 0 mg/L y 2,5 mg/L,





**Figura 55.** Media e intervalos de confianza de la concentración de glutatión-s-transferasa (GST) en larvas y juveniles de *Physalaemus albonotatus* sin exposición (Control), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\* GLY).

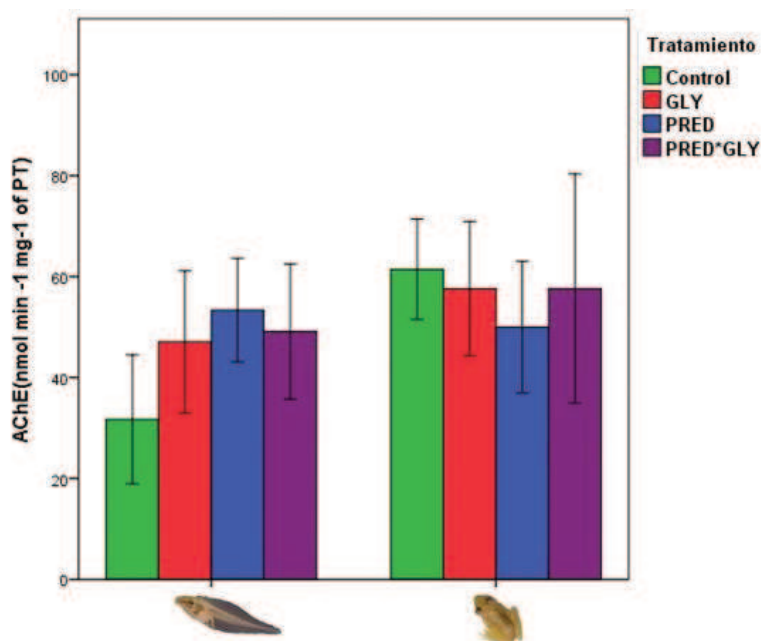


**Figura 56.** Efectos principales e interacciones en glutatión-s-transferasa (GST) en larvas de *Physalaemus albonotatus* de una combinación factorial con ausencia (izq.) presencia (der.) de depredadores (PRED) y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato (GLY): 0 mg/L y 2,5 mg/L.

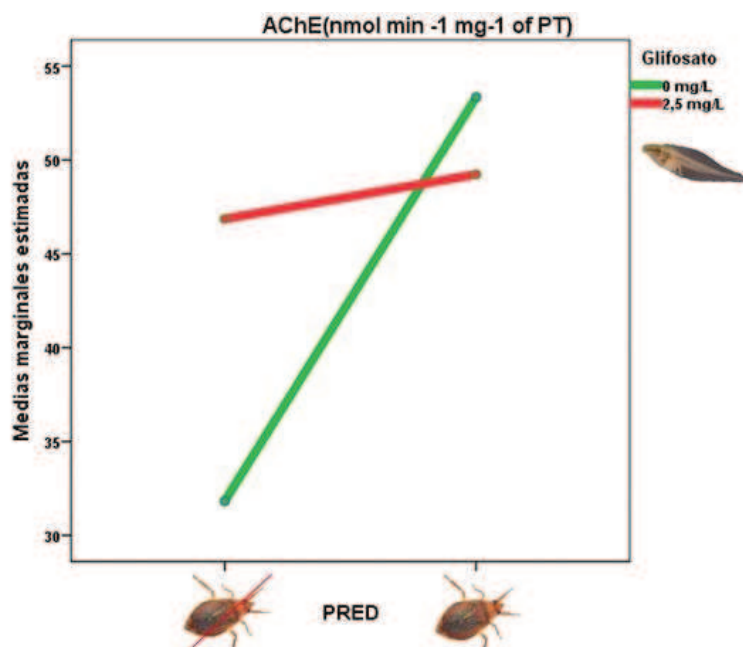
Los resultados obtenidos a partir de la determinación del efecto de la exposición a depredadores (PRED) y al herbicida glifosato (GLY) sobre variables de AChE y GST en larvas y juveniles de *S. nasicus* se detallan en la **Tabla 18**. En larvas se encontró un aumento significativo de la variable AChE luego de la exposición a PRED ( $F=4,397$ ;  $p=0,043$ ; **Figura 57 y 58**). En juveniles no se encontraron diferencias significativas en las variables AChE y GST por exposición a PRED o por GLY ( $p>0,05$ ; **Figura 57 y 59**). No obstante, los resultados de la evaluación de la concentración de GST muestran interacciones entre los factores PRED\*GLY en larvas ( $F=11,375$ ;  $p=0,002$ ; **Figura 59 y 60**) y en juveniles ( $F=4,663$ ;  $p=0,038$ ; **59 y 61**).

**Tabla 18.** Valores de significancia del análisis de varianza de las variables acetilcolinesterasa (AChE) y glutatión-s-transferasa (GST) de larvas y juveniles de *Scinax nasicus* expuestas a 2,5 mg/L de glifosato (GLY) y depredadores (PRED). Valores significativos ( $p<0,05$ ) resaltados en negrita y asterisco.

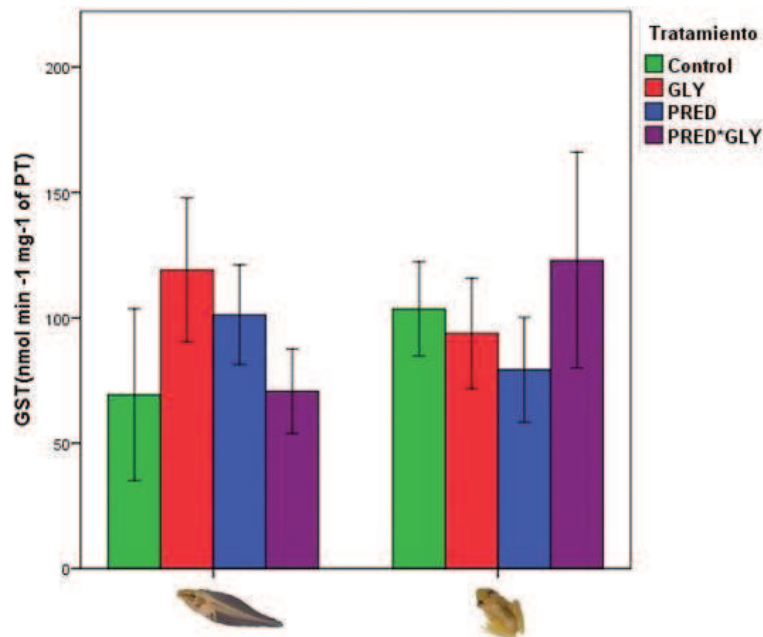
<i>S. nasicus</i>		AChE		GST	
		F	p	F	p
	Gosner	0,118	0,734	2,298	0,139
	PRED	4,397	<b>0,043*</b>	0,441	0,511
	GLY	0,918	0,345	0,621	0,436
	PRED * GLY	2,792	0,104	11,375	<b>0,002*</b>
	PRED	0,695	0,41	0,04	0,843
	GLY	0,077	0,783	1,877	0,179
	PRED * GLY	0,706	0,406	4,663	<b>0,038*</b>



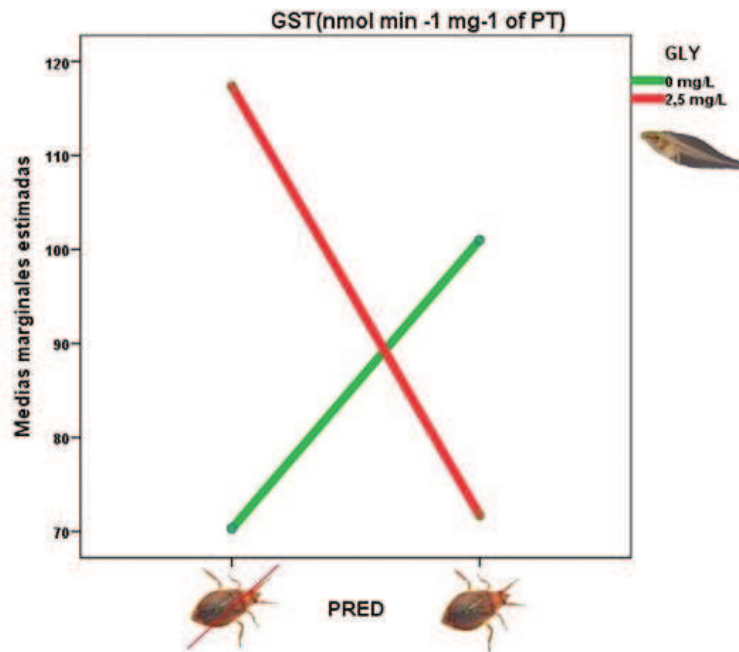
**Figura 57.** Media e intervalos de confianza de la concentración de acetilcolinesterasa (AChE) en larvas y juveniles de *Scinax nasicus* sin exposición (Control), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\* GLY).



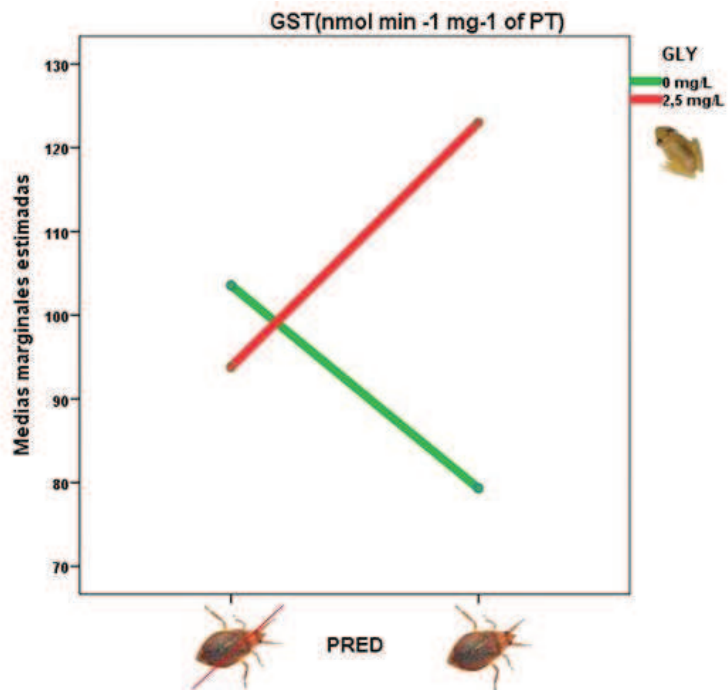
**Figura 58.** Efectos principales acetilcolinesterasa (AChE) en larvas de *Scinax nasicus* de una combinación factorial con ausencia (izq.) presencia (der.) de depredadores (PRED) y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato (GLY): 0 mg/L y 2,5 mg/L.



**Figura 59.** Media e intervalos de confianza de la concentración de glutatión-s-transferasa (GST) en larvas y juveniles de *Scinax nasicus* sin exposición (Control), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\* GLY).



**Figura 60.** Efectos principales e interacciones en glutatión-s-transferasa (GST) en larvas de *Scinax nasicus* de una combinación factorial con ausencia (izq.) presencia (der.) de depredadores (PRED) y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato (GLY): 0 mg/L y 2,5 mg/L.





**Figura 61.** Efectos principales e interacciones en glutatión-s-transferasa (GST) en juveniles de *Scinax nasicus* de una combinación factorial con ausencia (izq.) presencia (der.) de depredadores (PRED) y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato (GLY): 0 mg/L y 2,5 mg/L.

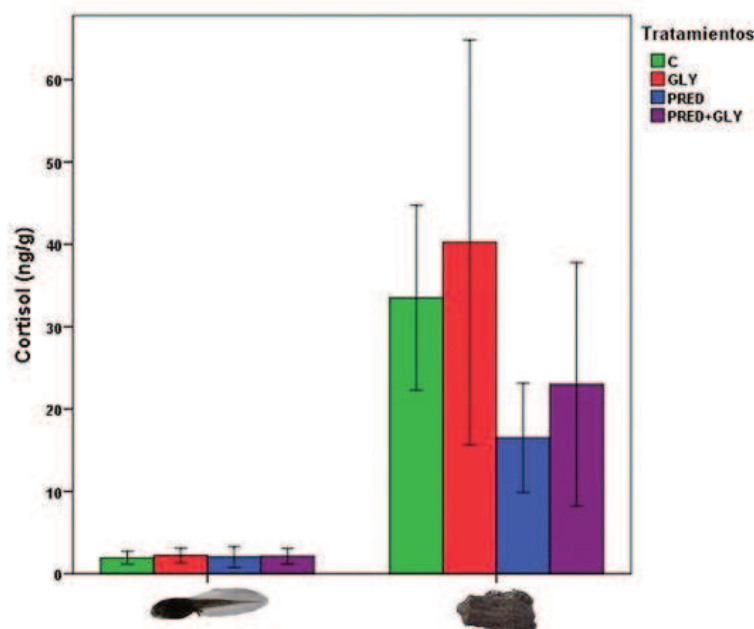


#### 4.2.2.4. Resultados variables hormonales

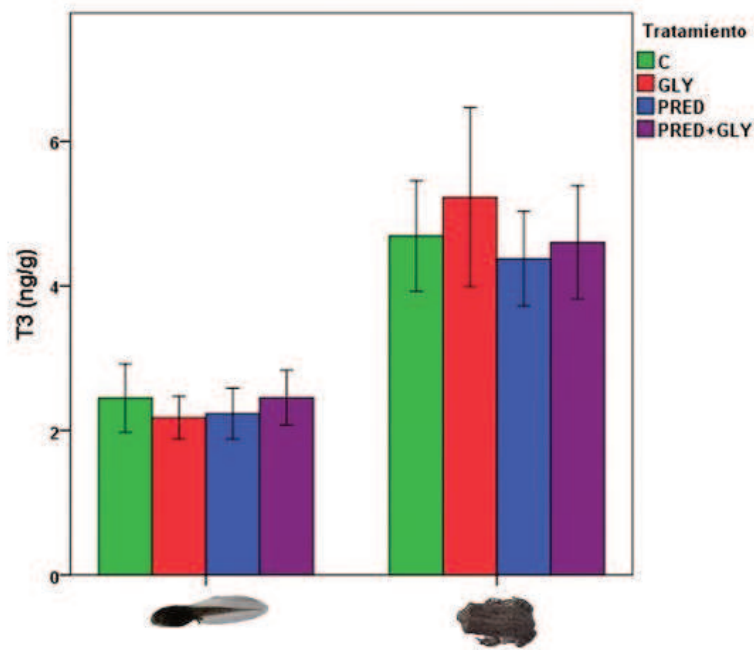
Se determinaron los efectos principales e interacciones de la exposición a PRED y GLY sobre la concentración de cortisol (CORT), triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) en larvas y juveniles de *R. arenarum* expuestas a 2,5 mg/L de GLI mediante un análisis de ANOVA de dos vías (Tabla 19). En larvas no se hallaron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas ( $p > 0,05$ ; Figura 62, 63 y 64). En adultos, los resultados obtenidos a partir de la evaluación de CORT mostraron una disminución significativa luego de la exposición a PRED ( $F=3,7$ ;  $p=0,045$ ; Figura 62 y 65).

**Tabla 19.** Valores de significancia del análisis de varianza de las variables cortisol (CORT), triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) en larvas y juveniles de *Rhinella arenarum* expuestas a 2,5 mg/L de glifosato (GLY) y depredadores (PRED). Valores significativos ( $p < 0,05$ ) resaltados en negrita y asterisco.

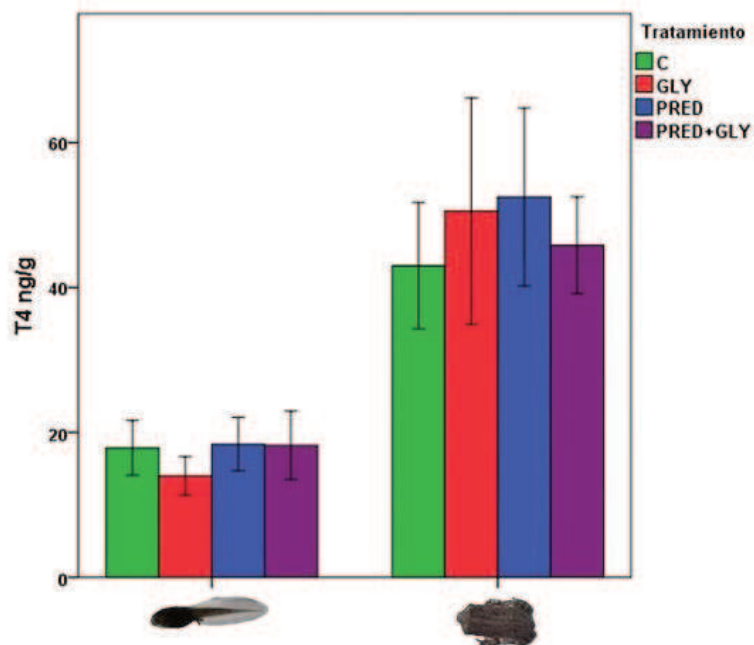
<i>R. arenarum</i>		CORT		T3		T4	
		F	p	F	p	F	p
	PRED	0,344	0,561	0,035	0,852	2,029	0,162
	GLY	0,245	0,623	2,088	0,156	1,235	0,273
	PRED * GLY	0,056	0,814	0,018	0,894	1,476	0,232
	PRED	3,7	0,045*	1,299	0,259	0,213	0,646
	GLY	0,016	0,899	0,144	0,706	1,859	0,178
	PRED * GLY	0,421	0,519	0,857	0,359	0,007	0,934



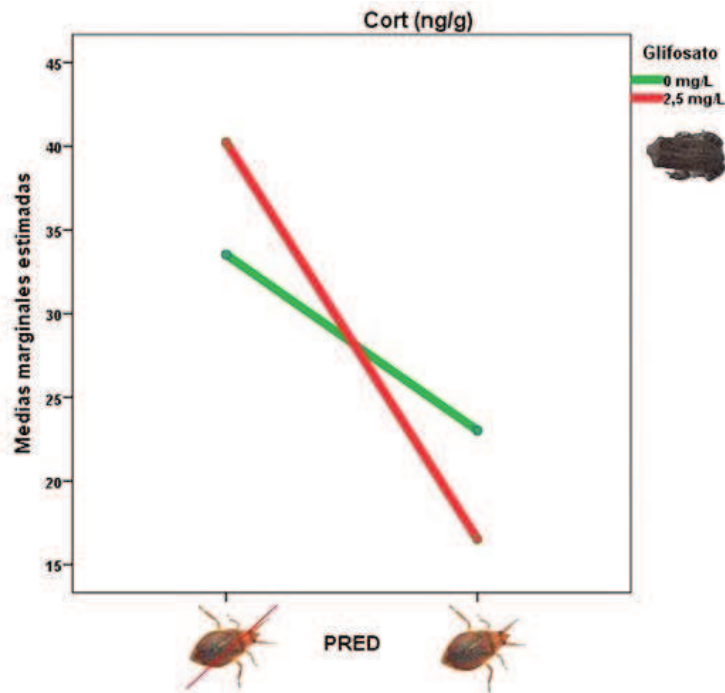
**Figura 62.** Media e intervalos de confianza de la concentración de cortisol en larvas y juveniles de *Rhinella arenarum* sin exposición (C), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\*GLY).



**Figura 63.** Media e intervalos de confianza de la concentración triyodotironina (T3) en larvas y juveniles de *Rhinella arenarum* sin exposición (C), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\* GLY).





**Figura 64.** Media e intervalos de confianza de la concentración tiroxina (T4) en larvas y juveniles de *Rhinella arenarum* sin exposición (C), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\* GLY).

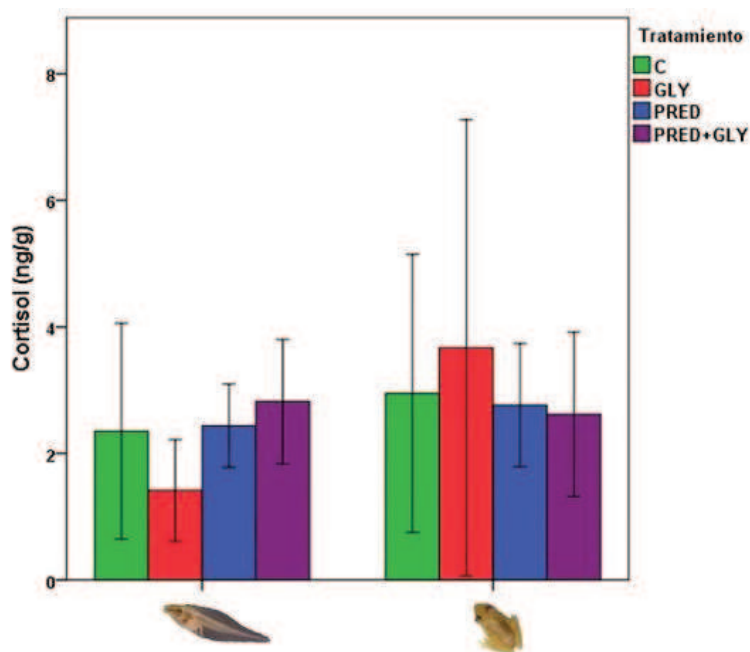


**Figura 65.** Efectos principales en la concentración de cortisol (Cort) en juveniles de *Rhinella arenarum* de una combinación factorial con ausencia (izq.) presencia (der.) de depredadores (PRED) y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato: 0 mg/L y 2,5 mg/L.

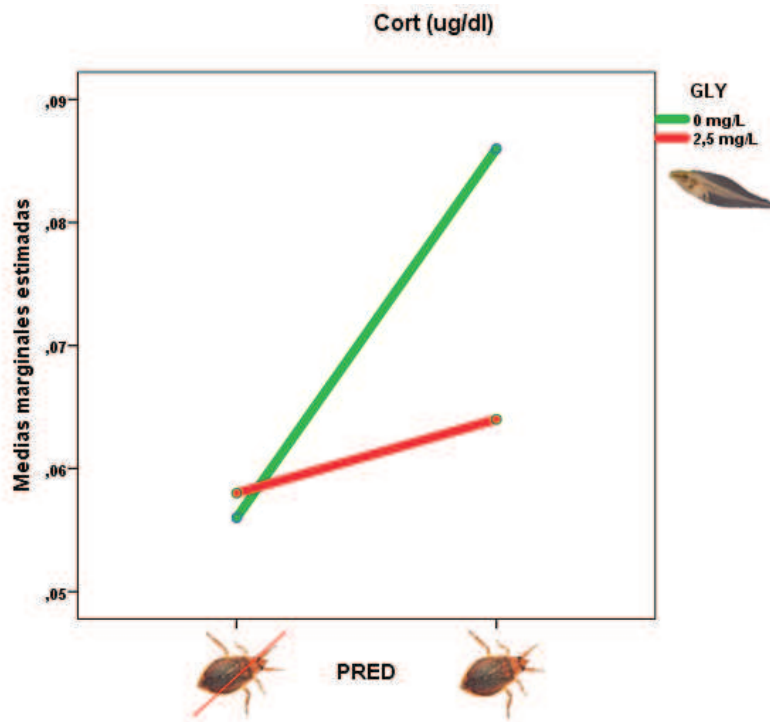
Se evaluaron los efectos de la exposición a PRED y GLY sobre variables de CORT, T3 y T4 en larvas y juveniles de *S. nasicus* expuestas a 2,5 mg/L de glifosato mediante un análisis ANOVA de dos vías (Tabla 20). En larvas, los resultados obtenidos sólo mostraron un incremento significativo en la variable CORT luego de la exposición a PRED ( $F=3,447$ ;  $p=0,042$ ; Figura 66 y 67). Los resultados de T3 en larvas mostraron interacciones entre los factores PRED\*GLY (Figura 68 y 69), mientras que en T4 se registró un incremento significativo de la concentración de T4 luego de la exposición a PRED ( $F=6,201$ ;  $p=0,024$ ; Figura 70 y 71). En juveniles, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en las variables CORT y T3 ( $P<0.05$ ; Figura 66 y 68). No obstante, en juveniles se observó un incremento significativo en la concentración de T4 luego de la exposición a GLY ( $F=3,828$ ;  $p=0,032$ ; Figura 72).

**Tabla 20.** Valores de significancia del análisis de varianza de las variables cortisol (CORT), triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) en larvas y juveniles de *Scinax nasicus* expuestas a 2,5 mg/L de glifosato (GLY) y depredadores (PRED). Valores significativos ( $p < 0,05$ ) resaltados en negrita y asterisco.

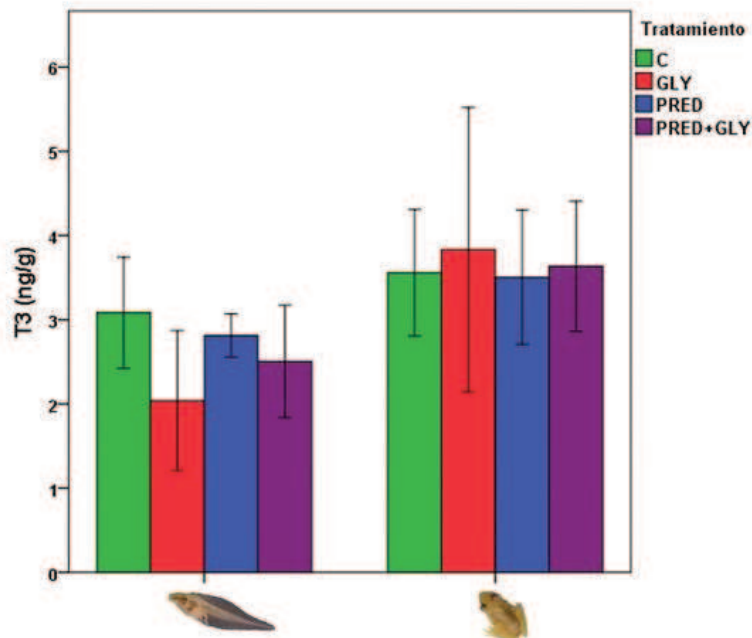
<i>S. nasicus</i>		CORT		T3		T4	
		F	p	F	p	F	p
	PRED	3,447	0,042*	0,181	0,676	6,201	0,024*
	GLY	2,708	0,119	2,539	0,131	2,376	0,143
	PRED * GLY	0,476	0,500	8,549	0,01*	0,987	0,335
	PRED	0,464	0,502	0,084	0,775	0,219	0,644
	GLY	0,229	0,637	0,027	0,871	3,828	0,032*
	PRED * GLY	0,102	0,753	0,214	0,648	0,06	0,808



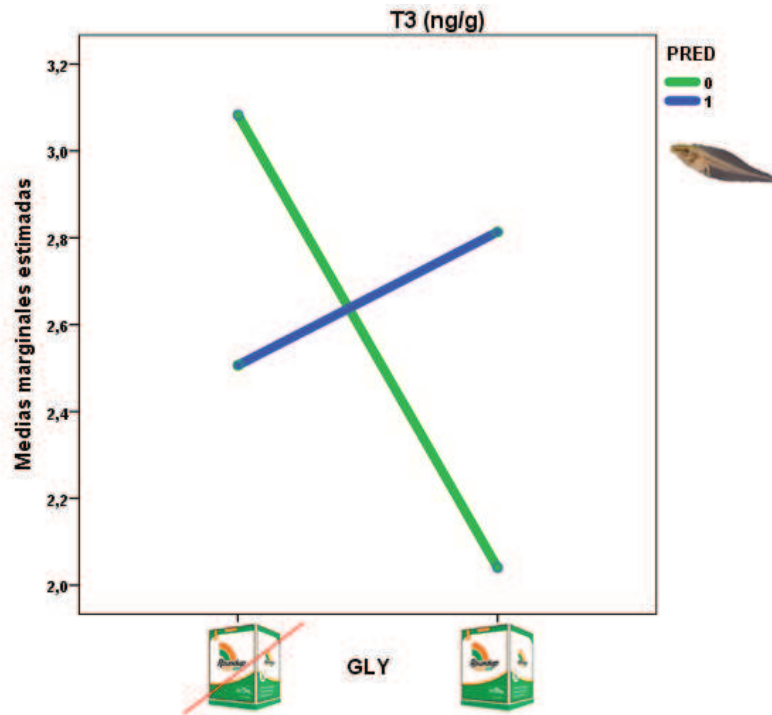
**Figura 66.** Media e intervalos de confianza de la concentración cortisol en larvas y juveniles de *Scinax nasicus* sin exposición (C), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\* GLY).



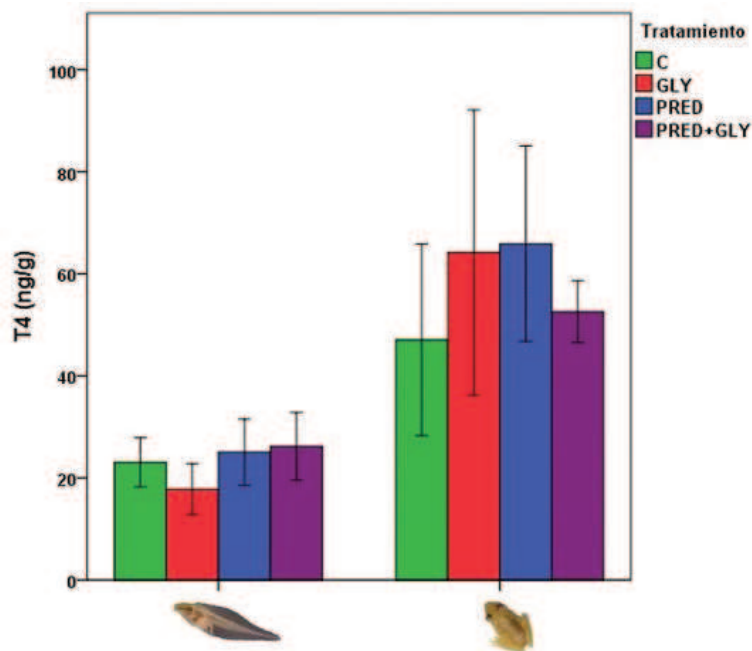
**Figura 67.** Gráfica de efectos principales en la concentración de cortisol (Cort) en juveniles de *Scinax nasicus* de una combinación factorial con ausencia (izq.) presencia (der.) de depredadores (PRED) y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato: 0 mg/L y 2,5 mg/L.



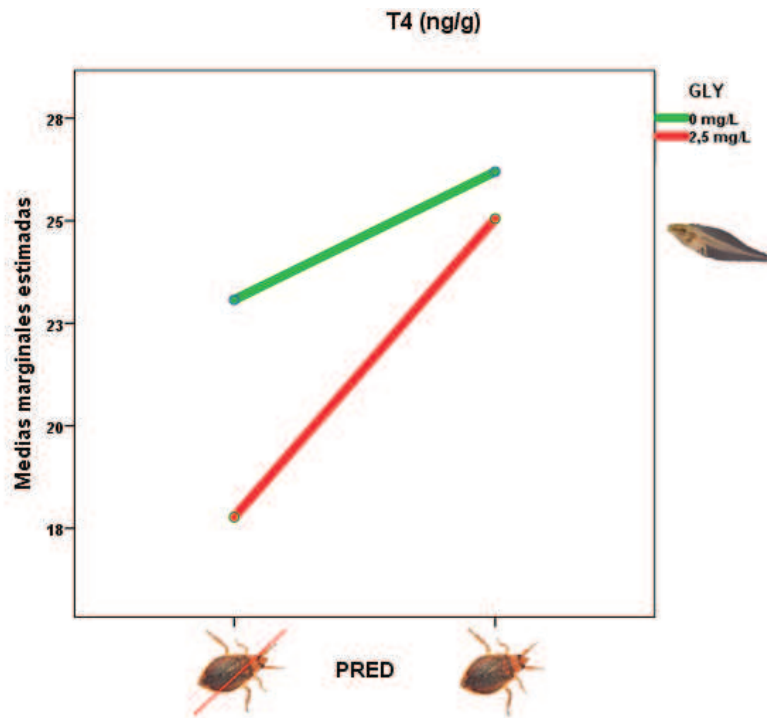
**Figura 68.** Media e intervalos de confianza de la concentración triyodotironina (T3) en larvas y juveniles de *Scinax nasicus* sin exposición (C), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\* GLY).



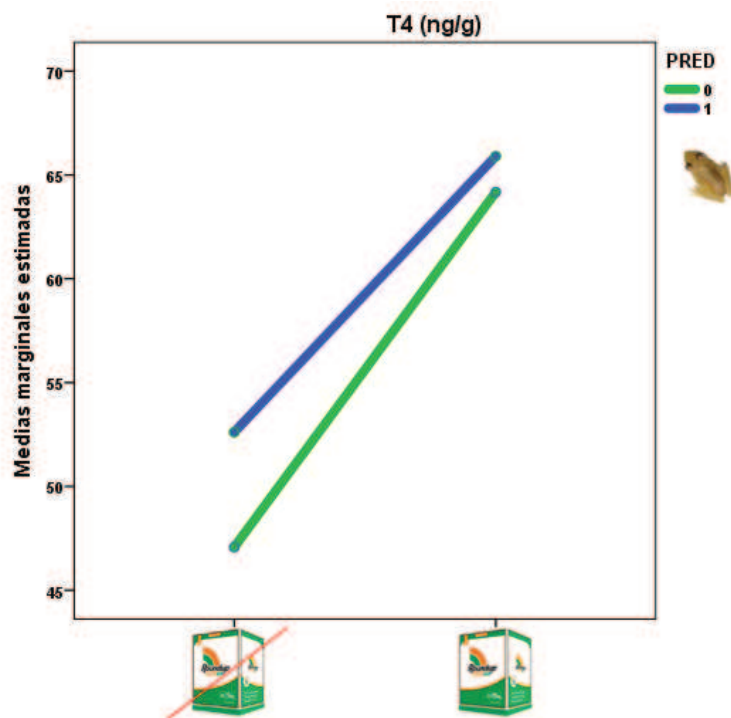
**Figura 69.** Gráfica de interacciones en la concentración de triyodotironina (T3) en larvas de *Scinax nasicus* de una combinación factorial con ausencia (0) presencia (1) de depredadores (PRED) y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato (GLY): 0 mg/L (izq.) y 2,5 mg/L (der.).



**Figura 70.** Media e intervalos de confianza de la concentración tiroxina (T4) en larvas y juveniles de *Scinax nasicus* sin exposición (C), expuestas a glifosato (GLY 2,5 mg/L) y depredadores (PRED) e interacción entre los factores glifosato\*depredadores (PRED\*GLY).



**Figura 71.** Gráfica de efectos principales en la concentración de triyodotironina (T4) en larvas de *Scinax nasicus* de una combinación factorial con ausencia (izq.) presencia (der.) de depredadores (PRED) y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato (GLY): 0 mg/L y 2,5 mg/L.



**Figura 72.** Gráfica de efectos principales en triyodotironina (T4) en juveniles de *Scinax nasicus* en una combinación factorial con ausencia (0) presencia (1) de depredadores (PRED) y de dos concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida glifosato: 0 mg/L (izq.) y 2,5 mg/L (der.).



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Experimento agudo 1 (EA1): Bioensayo de toxicidad aguda de una formulación comercial de glifosato en larvas de *R. arenarum*

Las poblaciones de anfibios están disminuyendo a una tasa alarmante en todo el planeta, las evaluaciones de estado de conservación reportan 35-148 especies ya extintas o posiblemente extintas y 2063-3630 amenazadas (UICN, 2021). Dentro de las causas de esta disminución citadas con más frecuencia por la bibliografía especializada, se señalan a los herbicidas y a otros contaminantes de origen antrópico. Uno de los herbicidas más utilizados en el mundo es el glifosato (GLY), el cual es considerado un agroquímico de baja toxicidad (Duke y Powles, 2008; FAO, 2022). Sin embargo, su uso también es muy controvertido por su posible impacto en organismos no objetivo.

En este trabajo, la  $CL_{50}/24h$  calculada para *R. arenarum* fue 25,13 mg/L GLY (IC 95% = 20,85-28,31), mientras que la concentración NOEC fue de 12,5 mg/L y la LOEC de 15 mg/L. En otros estudios a campo, empleando tasas de aplicación autorizadas de GLY, la concentración en un cuerpo de agua temporal pequeño como en el que típicamente se reproducen los anuros (5 cm de profundidad), el cálculo de la  $CL_{50}/24h$  fue de 21,1 mg/L GLY (Mann y Bidwell., 1999). Bajo este escenario, se podría inferir que una única aplicación de GLY tendría la capacidad de producir la mortalidad de prácticamente la mitad de los renacuajos de *R. arenarum* presentes en una charca ubicada en un agroecosistema, y que la  $CL_{50}/24h$  calculada para *R. arenarum* estaría un 40% por encima de la concentración más baja que genera mortalidad (15 mg/L GLY).

Los efectos agudos del GLY han sido evaluados en otras especies de ecosistemas acuáticos con distintos grados de respuesta. El  $CL_{50}/96h$  para el pez *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae) fue de 91,73 mg/L GLY (IC 95% = 86,80–98,00 mg/L GLY) (Carvalho y col., 2019), para *Jenynsia multidentata* el  $CL_{50}/96h$  fue de 19,02 mg/L (Hued y col., 2012) y algunos invertebrados como cladóceros (*Ceriodaphnia dubia*) y anfípodos bentónicos (*Hyaella azteca*) mostraron  $CL_{50}/24h$  de 6 y 3 mg/L GLY, 90 y 190 mg/L y 707 y 307 mg/L GLY según el AF utilizado (Tsui y Chu, 2003). La toxicidad del glifosato de grado técnico es de leve a muy levemente tóxico, con valores de  $CL_{50}$  informados superiores a 55 mg/L y un valor de NOEC de 21 días de 100 mg/L (Giesy y col., 2000). En la trucha aroiris (*Salmo gairdneri*), el  $CL_{50}/24h$  para GLY de grado técnico fue de 140 mg/L mientras que del formulado RR fue de 8,3 mg/L (Folmar y col., 1979). En el mismo trabajo (Folmar y col., 1979) se citan resultados similares para otras especies de peces

como *Pimpehales promelas*, *Ictalurus punctatus* y *Lepomis macrochirus* con CL<sub>50</sub>/24h de GLY RoundUp 40, 10 y 23 veces más tóxicos respectivamente que el CL<sub>50</sub>/24h de GLY de grado técnico.

En 4 especies de anuros de América del Norte, también se comparó la toxicidad de del GLY RoundUp a través del CL<sub>50</sub>/24h con un valor mínimo para *Rana clamitans* de 6,6 mg/L y un máximo de 18,1 mg/L para *Rana sylvatica* (Howe y col., 2004). Relyea y Jones., (2009) por su parte, evaluaron la formulación RoundUp en larvas de 13 especies de anfibios (anuros y caudados) con CL<sub>50</sub>/96h de 0,8 a 3,2 mg/L GLY. Relyea., (2004) encontró que el GLY en concentraciones de 1 y 2 mg/L y en combinación con otros plaguicidas generaba mortalidad y reducción del crecimiento en larvas de anuros. Asimismo, Lajmanovich y col., (2022) evaluaron la CL<sub>50</sub>/24h de GLY en una formulación comercial para *S. nasicus* 61,56 mg/L GLY (IC 95% = 55,66–73,36) y de la misma formulación en una mezcla con microplásticos que mostró mayor toxicidad 47,54 mg/L GLY (IC 95% = 35,77–63,17), aunque los efectos fueron más marcados al comparar una formulación comercial de glufosinato de amonio y la misma formulación con microplásticos (Lajmanovich y col., 2022).

Otros trabajos han evaluado diferentes formulaciones comerciales de GLY en *R. arenarum*. Soloneski y col., (2016) determinó que la CL<sub>50</sub>/24h para *R. arenarum* fue 89,44 mg/L (IC 95% = 82,68–96,36). Lajmanovich y col., (2013) calculó el CL<sub>50</sub>/48h de GLY para la especie 13,20 mg/L (IC 95% = 11,57–15,05), el NOEC fue de 10 mg/L y el LOEC de 20 mg/L y describió un aumento de al menos dos órdenes de magnitud de la toxicidad de GLY en mezclas con otros herbicidas como el bispiribac-sodio y picloram. La toxicidad de las formulaciones comerciales de GLY es muy variable, por lo que se complejizan las comparaciones entre trabajos. Lajmanovich y col., (2010) determinaron CL<sub>50</sub>/24h de 2,42 mg/L (2,19–2,65); 38,76 mg/L (34,98–42,54); 73,77 mg/L (64,23–83,31) y 77,52 mg/L (70,14–84,90) para cuatro formulaciones comerciales diferentes evaluadas en la especie *R. arenarum*. Estas diferencias en la toxicidad son atribuidas principalmente a los coadyuvantes (Bradberry y col., 2004), de las cuales generalmente se cuenta con poca información debido a que su composición química es considerada información comercial confidencial. Por esta razón, la clasificación de seguridad de las formulaciones se define exclusivamente por su i.a., pese a que los coadyuvantes pueden modificar su toxicidad (Milesi y col., 2021). La formulación de herbicida más utilizada y reconocida es la de Roundup (nombre comercial producido por Monsanto adquirida por Bayer en 2018). En esta formulación, el GLY se presenta como una sal de isopropilamina (IPA) junto con el surfactante polioxietilamina (POEA), que se agrega para mejorar la eficacia del herbicida

(Solomon y Thompson, 2003) y es al que se le atribuye gran parte de la toxicidad del compuesto (Howe y col., 2004).

## 5.2. Experimento agudo 2 (EA2): Evaluación del comportamiento a corto plazo de larvas *R. arenarum*, *P. albonotatus* y *S. nasicus*, a señales del depredador *B. elongatum* y a una concentración ambientalmente relevante de glifosato

Rodin Morch y col., (2011) recopilaron y describieron seis tipos de respuestas etológicas de larvas de anuros a PRED y sus señales: atracción, vivacidad, quiescencia, agregación, evitación e invariable. En este estudio, las larvas de las especies *R. arenarum* y *S. nasicus* modificaron su comportamiento por la presencia de GLY y/o señales de PRED mientras que el comportamiento de *P. albonotatus* permaneció invariable o inalterado (Figuras 18-21).

Las respuestas etológicas de una presa generalmente se correlacionan con el riesgo de depredación (Sih, 1987; Peckarsky, 1996; Relyea, 2001). En este trabajo, se observó que los renacuajos bentónicos de *P. albonotatus* no alteraron su actividad en presencia de señales de *B. elongatum* (Figuras 18-21); estos PRED presentan un bajo riesgo de depredación para los renacuajos de *P. albonotatus* por diversas razones, por ejemplo, debido a una baja eficiencia de captura por el reducido tamaño de presa siendo que de las tres especies estudiadas, *P. albonotatus* es la más pequeña (Relyea, 2001). Además, los belostómidos tienen una estrategia de depredación del tipo *sit-and-wait* y se ubican justo por debajo de la superficie del agua, lo que les permite esperar por su presa con escaso gasto de energía (Menke, 1979). En este escenario, debido al comportamiento característico de las larvas *P. albonotatus* (Figuras 18-21) de mantenerse en el estado de quietud en el fondo del cuerpo del agua, esta especie presenta una buena estrategia de supervivencia, ya que disminuye la probabilidad de encuentros entre PRED y presa (Anholt y Werner, 1996). Al igual que las larvas *P. albonotatus*, las larvas de *S. nasicus* no mostraron una alteración significativa de su comportamiento ante la presencia del PRED *B. elongatum* (Figuras 18-21), reacción que ha sido descrita como la más frecuente en especies solitarias como *S. nasicus* (Rödin Mörch y col., 2011). Contrariamente, Gomez y Kehr., (2013) informaron que larvas de *S. nasicus* expuestas a distintos depredadores alteraron su comportamiento de manera diferencial, disminuyendo la actividad en presencia de señales químicas del PRED *Moenkausia dichroura* y aumentándola en presencia de señales químicas de *B. elongatum*. Las discrepancias existentes entre los resultados antes mencionados y los de esta tesis pueden deberse a que en Gomez y Kehr., (2013), se evaluó el comportamiento en grupos de renacuajos y luego de 15 min de exposición, mientras que en esta tesis la evaluación del comportamiento se realizó individualmente y durante los primeros cinco minutos de interacción con las señales de PRED. Una vez percibido el riesgo de depredación, los renacuajos suelen reaccionar

cambiando el nivel de actividad de acuerdo con la relación entre la cantidad de señal depredadora y la densidad conespecífica (Van Buskirk y col., 2011; Gazzola y col., 2018). Sin embargo, muchas respuestas plásticas de los renacuajos dependen del tiempo de exposición al depredador como así también, de la intensidad de la señal generada por la abundancia de depredadores (Kehr y Gómez, 2009).

En las larvas de *R. arenarum* evaluadas en esta tesis, hubo un aumento en la  $V_{max}$  ante la presencia de PRED (**Figura 19**). Varios trabajos han documentado la capacidad de larvas de bufónidos en general y de *R. arenarum* en particular, de detectar y de modificar su comportamiento natatorio ante la presencia de depredadores (Jara y Perotti, 2002; 2009; Gunzburger y Travis, 2005). Este tipo de respuestas a los PRED por parte de las larvas de anuros se produce por la liberación de señales químicas o kairomonas por parte de los depredadores (Grasswitz y Jones, 2002). Rodin Morch y col., (2011), describieron que la reacción de huida o escape es la más frecuente en larvas de anuros de especies gregarias, como los bufónidos, expuestas a señales de alarma, reacciones similares a las observadas en larvas de *R. arenarum* en este trabajo de tesis. Esta reacción de huida se contrapone a la hipótesis respecto a que las larvas de bufónidos de *R. arenarum* no alterarían su comportamiento, ya que poseen la característica de ser tóxicas o poco palatables para sus depredadores (Regueira y col., 2015). No obstante, son numerosos los trabajos que dan cuenta de que las larvas de *R. arenarum* son depredadas por distintas especies de insectos y peces (Junges y col., 2012) además de que efectivamente han sido depredadas por *B. elongatum* en ensayos preliminares de los experimentos aquí expuestos.

Las respuestas etológicas son extremadamente complejas y dependen de numerosos factores. La actividad natatoria descrita para renacuajos de *P. albonotatus* no fue modificada en presencia de señales químicas de *M. dichroua* y *B. elongatum* (Gómez y col., 2019), de manera similar a lo observado en este estudio. No obstante, Gómez y col., (2019) registraron modificaciones etológicas en respuesta a la densidad conespecífica, lo que sugiere una mayor influencia de la competencia intraespecífica por el espacio y recursos tróficos que el riesgo de depredación (Kehr, 1987). En el mismo trabajo, Gómez y col., (2019) indicaron que la actividad de los renacuajos de *Rhinella diptycha* cambiaron su comportamiento, indicando una relación denso-dependiente en respuesta a señales de los depredadores y larvas conespecíficas, siendo mayor a altas densidades de renacuajos. Por el contrario, Curi y col., (2022) observaron un aumento de la actividad a bajas densidades de conespecíficos de *Rhinella dorbignyi* y una reducción de la actividad a altas densidades, lo que demuestra una marcada heterogeneidad de respuestas, incluso dentro de la misma familia. Otros autores, describen distintos tipos de respuesta de larvas de

anfibios anuros dependiendo del riesgo de depredación de diferentes depredadores. En larvas de *Rana catesbeiana* y *R. clamitans*, la exposición a larvas de odonatos *Anax* spp., reportó una gran reducción de la actividad natatoria; la presencia de peces *L. macrochirus* no mostró ninguna alteración, mientras que en presencia del pez *Umbra limi*, redujo moderadamente la actividad de las larvas de estos anuros (Relyea y Werner, 1999).

A diferencia de los trabajos antes mencionados, la mayor cantidad de cambios de comportamiento en el experimento EA2, se observaron luego de la exposición a una concentración ambientalmente relevante de GLY (1,5 mg/L). En términos ecológicos, cambios en la actividad de los renacuajos generan una potencial amenaza para su supervivencia, ya que incluso pequeños cambios, podrían reducir su capacidad para escapar de los depredadores (Araújo y Malafaia, 2020). En base a los resultados aquí presentados, el GLY provocó una reducción en la  $V_{max}$  en larvas de *R. arenarum* –la reacción contraria a la presencia de PRED- lo que indicaría una reducción de la capacidad de escape y un incremento del riesgo de depredación (Stauffer y Semlitsch 1993; Jung y Jagoe, 1995; Broomhall y Shine, 2003). Además de reducir la  $V_{max}$ , el GLY aumentó la DTR y la AG en *R. arenarum* expuestos, lo cual incrementa la probabilidad de encuentros aleatorios con depredadores y consecuentemente disminuiría la supervivencia (Chuang y col., 2019; Ramamonjisoa y col., 2019). En un experimento realizado en renacuajos de *Hyla versicolor* expuestos a señales de depredadores o al GLY en una formulación comercial, los resultados mostraron una mayor velocidad en la natación de los renacuajos expuestos respecto al grupo control sin exposición, aunque el incremento no superó al de las señales de PRED o de GLY evaluadas individualmente (Katzenberger y col., 2014). Resultados similares han sido encontrados en renacuajos de *Boana pulchella* luego de la exposición al herbicida glufosinato de amonio (Peltzer y col., 2013). En esta especie, se reportó que 15 mg/L de GLY aumentó la velocidad de natación y la DTR, encontrando, además, una correlación negativa entre la velocidad de natación y la actividad de la enzima BChE (Peltzer y col., 2013).

En el experimento EA2, *S. nasicus* disminuyó su actividad ante la exposición a GLY (Figuras 18, 20 y 21). Los renacuajos de esta especie son típicamente micrófagos (Vera Candiotti y col., 2004), por lo que una reducción de su actividad podría tener efectos en su capacidad de forrajeo y como consecuencia, en la nutrición, desarrollo y crecimiento (Semlitsch, 1993; Horat y Semlitsch, 1994; Semlitsch y col., 1995; Rist 1997; Broomhall y Shine, 2003; Denoël y col., 2013). Al mismo tiempo, la reducción de la actividad motora contribuye a incrementar el tiempo de permanencia de los renacuajos en charcas temporales que, tras la desecación de las mismas debido a factores ambientales, puede

impactar directamente sobre el fitness post metamorfosis en el caso de que sobrevivan (Berven y Gill, 1983; Smith, 1987). Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios de ecotoxicología en peces. Por ejemplo, Sánchez y col., (2021) detectaron una disminución en el rendimiento natatorio, en la tigmotaxia y en la consolidación de la memoria a largo plazo en el pez *Jenynsia multidentata* (Cyprinodontiformes) luego de la exposición a distintas formulaciones de GLY durante 96 h a una concentración inferior de 0,5 mg/L GLY.

Respecto a los resultados obtenidos de la DTR y AG de *R. arenarum* y AG de *S. nasicus*, se observó que la respuesta al GLY es similar a la respuesta frente al depredador, siendo mayormente significativa ante la exposición del herbicida (**Figuras 18 y 21**). En larvas de *Rana dalmatina* frente a diferentes formulaciones de GLY y PRED como las náyades de Odonata también se hallaron tendencias similares entre las respuestas, sugiriendo que la base los mecanismos fisiológicos o el valor adaptativo de los cambios de comportamiento en presencia de estos estresores podrían ser similares (Mikó y col., 2017). Es importante destacar que el GLY de grado técnico no es aplicado en el ambiente, por lo que podría deducirse que el impacto sobre la actividad motora de los renacuajos de anfibios anuros estaría mayormente asociado a los coadyuvantes agregados al p.a. En este sentido, no se han registrado alteraciones en la natación de renacuajos de *Leptodactylus latrans* pre y prometamórficos tras 96 h de exposición al principio activo del GLY (Bach y col., 2016).

Los renacuajos de *P. albonotatus* de esta tesis no alteraron su comportamiento tras la exposición a GLY (**Figuras 18 y 21**). No obstante, en otros trabajos publicados la especie respondió a los estímulos inducidos por otros químicos. Por ejemplo, Peltzer y col., (2019) notaron una disminución significativa en la actividad natatoria (DTR, VMed y AG) de renacuajos de *P. albonotatus* expuestas a bajas concentraciones de diclofenac (125 y 250 µg/L) y un aumento de la actividad a altas concentraciones (1000 y 2000 µg/L). En relación a lo anterior y de acuerdo con los resultados aquí presentados, se puede determinar que *P. albonotatus* es la especie menos sensible a la formulación de GLY, en comparación con dos especies con la que simpátricamente ocurre en ambientes acuáticos (*S. nasicus* y *R. arenarum*). En otro estudio, se reportan que el mecanismo de acción del insecticida piroxifeno reduce la actividad natatoria en términos de Vmed y la AG en larvas de *Odontoprynus americanus*, encontrando además, una correlación negativa con la actividad enzimática de AChE y la hormona T4 (Lajmanovich y col., 2019).

Si bien la interacción entre factores no ha sido evaluada en este experimento, otros autores han observado interacciones entre las señales de presencia de depredadores o



depredación (parcial o total) y la presencia de contaminantes. Alteraciones en la interacción PRED-presa entre larvas de las especies de anuros *R. arenarum*, *Physalaemus santafecinus*, *L. latrans* y *Elachistocleis bicolor* depredadas por el pez *Synbranchus marmoratus* fueron reportadas luego de la exposición al fungicida trifloxistrobin (Junges y col., 2012). Estos autores observaron que la tasa de depredación disminuyó cuando el depredador y los renacuajos fueron expuestos simultáneamente al trifloxistrobin y cuando solo la presa fue expuesta al fungicida; mientras que las tasas de depredación aumentaron cuando el depredador y la presa no fueron expuestos al trifloxistrobin (Junges y col., 2012). Estos resultados fueron consistentes con otro estudio, en donde la tasa de depredación se redujo entre renacuajos de *B. pulchella* (presa) y *S. marmoratus* (depredador) por la acción neurotóxica (natación errática, e inactividad) del fenitrotión (2,5 mg/L, Junges y col., 2010). Esto se explica en términos del aumento de la detectabilidad de las presas por parte de los depredadores, en casos de actividad natatoria normal o super-actividad inducida por estrés (Werner y Anholt, 1993; Teplitsky y col., 2003).

### **5.3. Experimento crónico 1 (EC1): Evaluación del crecimiento y desarrollo de las larvas de *R. arenarum* expuestas a señales del depredador *B. elongatum* y a una concentración ambientalmente relevante de glifosato**

En este trabajo, la presencia del PRED *B. elongatum* aceleró el desarrollo de larvas de *R. arenarum*, mientras que la presencia de GLY afectó esa respuesta anti predatoria ralentizando el proceso de metamorfosis (Figuras 22 y 23).

Los bufónidos, en general son considerados especies tóxicas o poco palatables para algunos depredadores (Gunzburger y Travis, 2005; Hayes y col., 2009; Jara y Perotti, 2009), cuya toxicidad se encuentra asociada al contenido y la variedad de bufadienólidos (Hayes y col, 2009). Antes del clímax metamórfico, la epidermis de las larvas contiene células gigantes bufónidas o *riesenzellen*, que producen una sustancia mucosa involucrada en desencadenar una reacción de huida en otros renacuajos circundantes, y además poseen una capa apical de moco alcianofílico que cubre la epidermis, la cual podría ser la responsable de producir el sabor desagradable de los renacuajos bufónidos (Regueira y col., 2015). Sin embargo, algunas especies de insectos acuáticos como los belostómidos han sido citadas como depredadoras de larvas de bufónidos (Jara y Perotti, 2009; Nomura y col., 2011). En este sentido, se sostiene que la alimentación por succión es una ventaja adaptativa de los belostómidos, ya que los protege de las toxinas concentradas en la piel de sus presas, siendo que la misma no forma parte de su alimento (Wassersug, 1973; Peterson y Blaustein, 1992; Wilbur, 1997; Benard y Fordyce, 2003). En relación a lo

anteriormente mencionado y en consistencia con los resultados obtenidos en este trabajo, se podría explicar la respuesta antidepredatoria de las larvas de *R. arenarum* luego de la exposición a señales del PRED *B. elongatum*.

Los renacuajos de bufónidos pueden percibir la presencia de depredadores mediante la detección de señales químicas liberadas por conespecíficos que fueron heridos por depredadores (Hews, 1988). Esta situación sugiere que la detección de depredadores en *R. arenarum* podría tener una base genética, ya que los individuos fueron expuestos al PRED *B. elongatum* durante el desarrollo embrionario *in ovo*, por lo que no presentaban una exposición previa al PRED y pese a esto, los renacuajos percibieron con éxito las señales inducidas por la presencia del depredador. Esta base genética también se apoya en los postulados de Rödin Mörch y col., (2011), quienes sugieren que la señalización de alarmas químicas ha evolucionado principalmente en géneros sociales. En este sentido, la evolución de las señales de alarma habría tenido lugar sólo en los linajes de anuros sociales y no en otros, lo cual podría explicar por qué las señales químicas de *B. elongatum* y el pez *M. dichroua* no tuvieron ningún efecto detectable en la tasa de crecimiento y la tasa de desarrollo de los renacuajos de *E. bicolor* (Gomez y Kehr, 2012).

La aceleración en el desarrollo de larvas de *R. arenarum* en presencia de PRED de este experimento (**Figura 22**) coincide con los resultados de Hoverman y Relyea., (2008), quienes encontraron que los renacuajos de *R. clamitans* crecían más en presencia de depredadores como el cangrejo *Orconectes rusticus* y peces como *Lepomis gibbosus* y *Belostoma flumineum* (Hoverman y Relyea, 2008). Esta aceleración en el desarrollo, parece ser consistente con el aumento de actividad de bufónidos en presencia de PRED registrada en el EA2, que podría inducir el incremento de la tasa de alimentación y, por lo tanto, la tasa de desarrollo y crecimiento.

Estudios previos que evaluaron los efectos de GLY de grado técnico en el desarrollo de larvas de anuros han demostrado que la sal de isopropilamina del compuesto no produce efectos significativos sobre el desarrollo o en el tiempo requerido para alcanzar la metamorfosis (Howe y col., 2004; Lanctôt y col., 2014). Sin embargo, las larvas de *R. arenarum* expuestas a una formulación comercial de GLY en el experimento EC1, evidenciaron un retraso en el tiempo de alcance a la metamorfosis respecto al tratamiento con PRED. Esta reducción en la tasa o retraso de la metamorfosis es uno de los efectos observados con mayor frecuencia de las formulaciones comerciales de glifosato (Howe y col., 2004; Williams y Semlitsch, 2010; Gahl y col., 2011; Navarro-Martín y col., 2014). La consecuencia inmediata de este retraso es contribuir a un mayor tiempo de exposición

a expensas del PRED y también mayor riesgo de desecación del cuerpo de agua temporal en donde se desarrollan las larvas (Wilbur y Collins, 1973). No obstante, otros autores no han encontrado diferencias en el tiempo de metamorfosis (Smith, 2001; Lanctôt y col. 2014; Wood y Welch, 2015), incluso en mezclas con otros agroquímicos (Henao Muñoz y col., 2012).

Si bien los resultados relativos al desarrollo de larvas de *R. arenarum* del experimento EC1 muestran un retraso ontogénico de las larvas expuestas a GLY, principalmente en la mayor concentración (2,5 mg/L GLY), respecto a las expuestas a PRED, al mismo tiempo, estos tratamientos mostraron una aceleración del desarrollo de las larvas en comparación con el control (**Figuras 22 y 23**). Este fenómeno también ha sido descrito por Cauble y Wagner., (2005) quienes observaron que los renacuajos de *Rana cascadae* expuestos a formulaciones comerciales de GLY se desarrollaron más rápido que los grupos que no estaban expuestos. En anfibios, esta aceleración generalmente deriva en un tamaño corporal más pequeño en la metamorfosis y tiene efectos adicionales a largo plazo, como la reducción en la supervivencia y reproducción, como así también una menor producción de huevos por parte de las hembras (Semlitsch, 1988). Contrariamente, Cuzziol Boccioni y col., (2021) encontraron un retraso en el desarrollo de larvas de *R. arenarum* a las 2 y 4 semanas de exposición a concentraciones de 1,5 y 2,5 mg/L de GLY (con renovación cada 48 h) respecto al control.

El efecto inductivo del desarrollo por los depredadores en *R. arenarum* del EC1 también tuvo efectos post metamorfosis, derivando en un mayor peso, LT y ancho de cabeza (**Tabla 10; Figuras 24-31**). Más aún, efectos similares se observaron en respuesta a la concentración más alta de GLY (2,5 mg/L). Los cambios inducidos por el depredador en el comportamiento de la presa impactan sobre el crecimiento de las mismas (Relyea y Werner, 1999). En este marco, el aumento de la actividad observada en el tratamiento con PRED en el EA2 sería el resultado de una mayor tasa de forrajeo, especialmente en larvas criadas con alimentación *ad libitum* como en este caso, a expensas de un mayor riesgo de depredación por mayor probabilidad de encuentros con el PRED. Esta hipótesis sobre el aumento de la actividad y el incremento del forrajeo podría aplicarse para la interpretación de resultados aquí obtenidos en los tratamientos con GLY, ya que los reportes de ambas concentraciones (1,5 y 2,5 mg/L) demostraron un aumento de la DTR y AG. Más aún, tal aumento fue incluso mayor que el generado por el tratamiento PRED en el EA2.

El BCI no mostró efectos significativos por parte del GLY o de la presencia de PRED aunque sí se detectaron interacciones entre ambos factores. Esta interacción fue

producida por una atenuación en la respuesta a PRED de los tratamientos con GLY respecto a los tratamientos sin el herbicida. La condición corporal es un indicador de la calidad o estado fisiológico de un organismo (Jakob y col., 1996), por lo que en este sentido, nuestros resultados demuestran que el estado fisiológico de las larvas expuestas a PRED es alterado cuando las larvas están o no expuestas a CARs de GLY. Los juveniles con una condición corporal reducida están en desventaja en comparación con otros de mayor condición con respecto al forrajeo, la reproducción, la evitación de depredadores y el estrés por deshidratación; todos factores de gran importancia para la aptitud general de la población (Howard y Young, 1998; Newman y Dunham, 1994; Newman, 1999; Beck y Congdon, 2000). Estos resultados de laboratorio, concuerdan con otros a escala de paisaje, donde se ha documentado que larvas de *R. arenarum* procedentes de agroecosistemas de soja RR, presentan una condición corporal más baja en comparación con poblaciones de sitios control (Bionda y col., 2011). Estudios de laboratorio en larvas de otros bufónidos como *Bufo bufo* expuestos a una AF de GLY a 20° C no encontraron diferencias significativas en el BCI entre el tratamiento control y el tratamiento 1,5 mg/L i.a. GLY pero sí respecto a los tratamientos 3 y 4 mg/L i.a. GLY (Baier y col., 2016). Además, otros experimentos similares al EC1, que evaluaron BCI luego de una exposición crónica a distintas formulaciones de GLY en ránidos, no encontraron diferencias significativas al momento de la metamorfosis en concentraciones de 0,021; 0,55; 1,1 y 2,9 mg/L i.a. GLY (Navarro-Martín y col., 2014); mientras que Lanctot y col. (2014) encontraron una reducción del BCI respecto al control con una formulación comercial de GLY al 2,89 mg/L i.a., con una solución de 2,89 mg/L de sal de glifosato de grado técnico y con una solución de 1,43 mg/L de POEA.

#### **5.4. Experimento crónico 2 (EC2): Evaluación de los efectos de la exposición crónica a glifosato y a depredadores en variables morfométricas, enzimáticas y hormonales de larvas de *R. arenarum*, *P. albonotatus* y *S. nasicus***

##### **5.4.1 Morfometría clásica**

En el EC2, se observó un aumento significativo del peso y LT de larvas de *R. arenarum* luego de la exposición a GLY (Tabla 11; Figuras 32-35). Numerosos estudios realizados en especies silvestres han documentado que ciertos contaminantes ambientales se comportan como obesogénicos, es decir que podrían influir o promover la acumulación anormal o excesiva de grasa corporal (Kubsad y col., 2019; Ren y col., 2020). Esto se debe a la capacidad que tienen estos contaminantes de causar alteraciones en la expresión de genes relacionados con la regulación del metabolismo de los lípidos, lo que resulta en

afecciones severas como alteración de la disponibilidad del principal recurso energético para los principales procesos vitales como desarrollo, crecimiento y reproducción (Ho y col., 2016; Chai y col., 2017; Fathi y col., 2019; Huang y col., 2020). Asimismo, la exposición a sustancias obesogénicas durante períodos críticos del desarrollo, como en estadio de larvas, podría alterar los procesos de programación epigenética que contribuyen a la diferenciación de una célula madre o progenitora a un tipo de célula específica (Walker, 2016). De manera similar, antecedentes han demostrado el potencial que presenta el GLY para inducir la formación de vacuolas lipídicas en los hepatocitos de organismos acuáticos, lo que se traduce a patologías de hígado graso (Langiano Vdo y Martínez, 2008) y otras afecciones como la dislipidemia, obesidad, daños por peroxidación de lípidos, entre otras (Mesnage y col., 2015, 2018; Ho y col., 2016; Chai y col., 2017; Fathi y col., 2019; Huang y col., 2020; Liu y col., 2021). Respecto a los juveniles de esta especie, existieron diferentes respuestas en los experimentos EC1, en el cual se encontró un aumento de las variables peso y LT y en el experimento EC2, donde no se hallaron diferencias significativas. Una posible explicación a estas discrepancias podría ser que las diferencias en el crecimiento determinadas en el EC2 fueron relativamente pequeñas, con un promedio de 0,09 g para el peso y 9,3 mm para LT (tamaño de efecto pequeño). Además, el número total de animales analizados en el EC1 fue más de tres veces superior que en el EC2 (150 renacuajos del EC1 vs 40 EC2), lo que sugiere que sería necesario aumentar el tamaño muestral para poder aumentar la potencia estadística y detectar diferencias significativas en el crecimiento.

Además, las interacciones estadísticas GLY\*PRED en las respuestas de las variables LT y ancho de cabeza de juveniles de *R. arenarum* del EC1 se producen por diferencias en las respuestas de los tratamientos 0 mg/L GLY y 2,5 mg/L GLY con el tratamiento 1,5 mg/L GLY. En los dos primeros, las respuestas se dan en el mismo sentido, aunque en distinta magnitud generando un aumento del LT y del ancho de cabeza, mientras que en el tratamiento con 1,5 mg/L GLY no hay diferencias en la respuesta entre la presencia o ausencia de PRED. Estas diferencias podrían ser el resultado de alteraciones en el comportamiento reguladas por el eje HHA y podría tener implicancias en el riesgo de depredación. Vale aclarar que este tema, es desarrollado con mayor profundidad en la sección de variables hormonales de esta tesis.

En larvas de *P. albonotatus* si bien no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal luego de la exposición a los tratamientos, se observó una tendencia de disminución del peso corporal del 28% y 30% luego de la exposición al PRED y al GLY, respectivamente (Tabla 12; Figura 36). Al mismo tiempo, se demostró una

interacción significativa entre los factores GLY\*PRED. La respuesta de larvas en presencia de señales de PRED sin GLY fue la disminución del peso, mientras que con PRED y con GLY se observó un incremento del peso corporal. Estas observaciones sugieren una influencia negativa por un incremento en costo energético ocasionado por la exposición al estresor PRED en período crítico del crecimiento de esta especie (Levesque y col., 2002). Resultados similares de reducción del tamaño corporal fueron reportados en una especie del mismo género, *P. santafecinus*, luego de la exposición de distintos depredadores (Gómez y Kehr, 2011). No obstante, el incremento en el peso frente a los dos estresores evaluados en esta tesis, PRED y GLY, podría asociarse a un mecanismo de compensación adaptativa (Lanctot y col., 2014). Previamente se mencionó el potencial del herbicida GLY como agente obesogénico (Kubsad y col., 2019), por lo que, en condiciones de estrés ante la presencia de depredadores en un contexto de contaminación ambiental, esta especie tendría la capacidad de ajustarse a los disturbios de origen antrópico mediante distintas respuestas bioecológicas y bioquímicas (Lajmanovich y col., 2009; 2010).

Si bien en el EA2 no se hallaron cambios estadísticamente significativos en el comportamiento de *P. albonotatus*, se observa una disminución de la actividad de sus larvas bentónicas y naturalmente poco activas (**Figuras 18-21**). La evitación espacial a los depredadores es común en las especies del género *Physalaemus* (Gómez y Kehr., 2011) y en otras especies, además, esta característica del comportamiento a menudo, conduce a un crecimiento reducido de las mismas (Sih, 1980; 1982; Werner y col., 1983; Fraser y Huntingford, 1986; Holomuzki., 1986; Gómez y Kehr., 2011).

#### 5.4.2. Morfometría geométrica

Tanto los tratamientos PRED como el GLY generaron cambios en la morfología de larvas de *R. arenarum*. El análisis estadístico multivariado CVA, permitió separar las larvas de *R. arenarum*, según las diferencias en el largo y ancho de la cabeza, posibilitando discriminar a través de la CV1 entre los tratamientos con y sin PRED independientemente de la presencia de GLY (**Tabla 14; Figura 44**). Por otro lado, los resultados obtenidos de la CV2 demuestran que las diferencias a nivel de la cabeza, agrandamiento del cuerpo y ensanchamiento de la cola se vieron influenciadas por la presencia del herbicida GLY.

Estudios previos han revelado que los renacuajos de varias especies de anuros exhiben una variedad de respuestas morfológicas cuando se enfrentan a depredadores (Relyea, 2001; Van Buskirk, 2002; Kishida y col. 2005; Wells, 2007). Respecto a las especies de bufónidos, Kehr y Gómez., (2009) encontraron que larvas de *Rhinella diptycha* en presencia de *Belostoma elegans* redujeron la longitud de su tracto digestivo y el largo



de la cola, lo podría contribuir a la reducción de la eficiencia digestiva y por lo tanto, ralentizar el crecimiento (Sibly, 1981; Relyea y Auld, 2004). En otro estudio donde se evaluó la morfología de larvas de *P. santafecinus* expuestas a señales de depredadores como escarabajos de agua de la familia Hydrophilidae y el pez *M. dichroua*, se reportaron diferentes grados de alteraciones morfológicas en la especie evaluada según la especie depredadora (Gómez y Kehr., 2011). Respecto a *S. nasicus*, Gómez y Kehr., (2013) reportaron que las larvas de esta especie exhiben diferentes patrones de respuesta a diferentes especies de depredadores y que a su vez, estas respuestas están influenciadas por la densidad de renacuajos (Gómez y Kehr., 2013). Los mismos autores señalaron que los individuos de *S. nasicus* expuestos a señales químicas de *B. elongatum* tienden a cambiar la morfología cuando la densidad de conespecíficos es alta, mostrando un aumento en la longitud de todas las variables morfológicas; sin embargo, en presencia de señales químicas de *M. dichroua*, las larvas tienden a reducir la longitud de todas las variables morfológicas cuando los renacuajos se encuentran en densidades bajas y no en altas densidades, reforzando la hipótesis de la existencia de interacciones entre tipo de depredador y competencia intraespecífica.

El GLY también produjo modificaciones en la morfología de larvas de *R. arenarum* (Tabla 14; Figura 44), aunque se desconoce el mecanismo subyacente de la capacidad del GLY para inducir cambios morfológicos en los renacuajos, sería razonable hipotetizar que el herbicida pueda estar interfiriendo con las hormonas del estrés que inducen las defensas contra los depredadores (Glennemeier y Denver, 2002). Otros autores (Relyea, 2012) encontraron que el GLY generó que un incremento de la altura de cola muy similar a la generada por el herbicida en larvas de *Rana sylvatica* y *R. pipiens*; además, los efectos fueron aditivos, por lo que la combinación de señales de depredadores y del herbicida provocó aumentos en la altura de la cola que fue del doble de magnitud que cualquiera de los dos factores por separado. Por otra parte, Relyea., (2018) encontró que en *H. versicolor*, los depredadores y el GLY produjeron cambios morfológicos diferenciales y hasta cambios en la coloración de la cola de los renacuajos. Las consecuencias en el fitness post metamorfosis de esta inducción fenotípica del herbicida es todavía desconocida. Sin embargo, basándonos en los resultados del EC1 respecto al tamaño (LT), peso y ancho de cabeza de *R. arenarum*, podríamos inferir que esta inducción tendría un costo asociado de crecimiento reducido frente a un escenario de PRED y sin GLY, lo cual podría incrementar el riesgo de depredación de los juveniles y reducir la talla de sus presas por la disminución del tamaño de cabeza y consecuentemente de su boca.



Hasta la fecha, los ejemplos de plaguicidas que inducen cambios morfológicos (sin contar los casos de malformaciones) en animales son escasos y se limitan a unas pocas especies de cladóceros. Una de las primeras publicaciones fue realizada por Hanazato, (1991), quién informó que varios insecticidas organofosforados y carbamatos inducían cambios morfológicos en *Daphnia ambigua* y que esos cambios morfológicos eran similares a los inducidos por los depredadores. Otros estudios más recientes han encontrado que algunos insecticidas pueden inducir crestas alargadas, en *Daphnia*, un fenotipo inducido por depredadores (Barry 1998, Oda y col., 2011). Por otro lado, los estudios sobre *Bosmina fatalis* han encontrado que los insecticidas pueden impedir la inducción de la morfología inducida por depredadores (Barry 1999; 2000; Sakamoto y col., 2006). Todos estos casos sugieren que los cambios morfológicos inducidos por plaguicidas pueden ser frecuentes en la naturaleza y sus efectos en términos de fitness y supervivencia son todavía desconocidos.

#### **5.4.3. Variables enzimáticas**

En este experimento, tanto los juveniles de *R. arenarum* (Tabla 16; Figura 48 y 50) como las larvas de *P. albonotatus* (Tablas 17; Figura 53 y 54) y de *S. nasicus* (Tabla 18; Figuras 57 y 58), mostraron un aumento significativo de los niveles de AChE en presencia de PRED. Si bien la función más conocida de la AChE es la de la hidrolización de ACh en las sinapsis del sistema nervioso central y periférico (Legay, 2000; Soreq y Seidman, 2001; Massoulie, 2002; Rotundo, 2003), la versatilidad funcional de la AChE también está implicada en el desarrollo neocortical (Dori y col., 2005), la cognición (Beeri y col., 1995) y la respuesta al estrés (Kaufer y col., 1998). El aumento de los niveles de AChE de las larvas de anuros luego de la exposición a PRED, estaría asociado al aumento transitorio de la ACh en el cerebro durante las respuestas al estrés (Masuda y col., 2004), lo que disminuye la producción de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT), clave en la síntesis de ACh (Kaufer y col., 1998) y deriva en un incremento en los niveles de ARNm de AChE en el cerebro en respuesta al estrés como el generado por la presencia de depredadores (Kaufer y col., 1998; Meshorer y col., 2002; Adamec y col., 2008). Se ha establecido la existencia de una modulación bidireccional similar de genes que regulan la disponibilidad de acetilcolina después del estrés y el bloqueo de la acetilcolinesterasa (Kaufer y col., 1998). No obstante, la sobreexpresión de AChE no se limita solamente al sistema nervioso central sino que se acumula también en diferentes tejidos, especialmente durante el desarrollo embrionario (Soreq y Seidman, 2001).

En este trabajo, las larvas y juveniles de *R. arenarum* expuestos a GLY mostraron un aumento de los niveles de AChE similar a los generados por la presencia de PRED (Tabla 16; Figuras 48-51). Tayebati y col., (2004) encontraron aumentos similares en la señalización mediada por ACh después de la exposición a un inhibidor de colinesterasa. Efectivamente, experimentos de estrés en ratones evidenciaron efectos similares a los observados después de una exposición aguda o crónica a los anticolinesterásicos, inhibidores de AChE (Beck y col., 2003). Sin embargo, otros autores (Lajmanovich y col., 2010) reportaron una inhibición de la enzima AChE en *R. arenarum* en concentraciones de 1,85-120 mg/L i.a. de cuatro formulaciones comerciales de GLY luego de 48 h de exposición respecto al control. Lajmanovich y col., (2013) también encontraron inhibición de la enzima AChE luego de 48h de exposición a una concentración de 10 mg/L del herbicida GLY. En condiciones más parecidas a las de este experimento, Cuzziol Boccioni y col., (2021) no encontró variaciones de la concentración de AChE en larvas de *R. arenarum* expuestas a 1,5 y 2,5 mg/L de GLY (con renovación cada 48h a las 2 y 4 semanas de exposición). No obstante, en el mismo trabajo se registró una inhibición de la enzima cuando el GLY se encontraba en mezclas con ciprofloxacina, amoxicilina y clorpirifos (Cuzziol Boccioni y col., 2021). En otro experimento, Lajmanovich y col., (2019) encontraron un aumento de la actividad de AChE a las 48 h de exposición a 1,25 mg/L GLY, sin embargo, no observaron los mismos resultados luego de la exposición crónica de 22 días.

Las respuestas de la enzima GST en este experimento, estuvieron dominadas por procesos de interacción GLY-PRED, tanto en larvas de *P. albonotatus* (Tablas 17; 56-57) como en larvas y juveniles de *S. nasicus* (Tabla 18; Figuras 60-61). Si bien los valores de GST de larvas de *P. albonotatus* aumentaron luego de la exposición al PRED y al GLY, se encontró un aumento diferencial en función al tratamiento evaluado. Se observó un aumento del 38% en presencia del PRED, mientras que luego de la exposición al GLY, el aumento fue de un 99% mayor respecto al control. En *S. nasicus* se invirtió el sentido de respuesta entre larvas y juveniles, ya que en larvas la respuesta al PRED se manifestó en un aumento de los niveles de GST, mientras que expuestas al GLY se produjo una disminución de los niveles; y en juveniles los niveles de GST disminuyeron en presencia del PRED y aumentaron con la exposición al GLY. Las GST son una superfamilia de enzimas que participan en la desintoxicación de las especies reactivas (ER) de oxígeno y nitrógeno, moléculas originadas a partir del metabolismo celular fisiológico, como así también detoxifican a los xenobióticos al catalizar las reacciones redox y de conjugación dependientes de GSH (Ketterer y col., 1986). Tanto el contenido de GSH como las

actividades enzimáticas de GST están bajo un estricto control homeostático (Li, 2009). En este contexto, la interferencia de factores que modifiquen las respuestas correspondientes a la actividad antioxidante, podría no compensar la producción de ER y producirse un daño oxidativo en los ácidos nucleicos, los lípidos y las proteínas; lo que eventualmente daña las organelas y finalmente a la muerte celular (Bagchi y col., 1995).

Los estresores ambientales, tales como la presencia de PRED, tienen el potencial de elevar ciertos parámetros fisiológicos como la presión arterial, el consumo de oxígeno y el metabolismo (Dielenberg y col., 2001). Del mismo modo, estos estresores tienden a incrementar las señales dependientes de dopamina (Sullivan y Gratton, 1998), liberación de adrenalina y noradrenalina, y el metabolismo de las catecolaminas (Gönenç y col., 2000; Pajovic y col., 2006). Es así que los valores incrementados de GST en las larvas de *P. albonotatus* y *S. nasicus* expuestas a señales de PRED obtenidos en este experimento, estarían asociados a alteraciones del estado redox celular relacionadas al daño potencial por estrés oxidativo (Oruc y col., 2004). Un aumento de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial inducido por un aumento en la demanda metabólica (Nogueira y col., 2001) ante la necesidad de respuesta rápida por riesgo a depredación, contribuye a una sobreproducción del anión superóxido y otras ER (Filipovic, 2009; Hoffman y Brookes, 2009), lo cual explicaría los valores aumentados de GST para proteger a la célula del daño oxidativo con la adición de GSH como mecanismo compensatorio.

Como se mencionó anteriormente, el aumento de la enzima GST en larvas de *P. albonotatus* luego de la exposición al GLY fue mucho mayor que la respuesta en presencia al PRED (Figuras 56 y 57). En general, la exposición a pesticidas y otras mezclas de contaminantes genera un aumento de la actividad de GST (Güngördü y col., 2016). Sin embargo, otros autores demostraron una inhibición de la enzima GST en renacuajos de *R. arenarum* expuestas a concentraciones de 1,85-120 mg/L i.a. de 4 formulaciones comerciales de GLY luego de 48 h de exposición en comparación al control sin exposición (Lajmanovich y col., 2010). En condiciones similares a las de este experimento, Cuzziol Boccioni y col., (2021) no encontraron variaciones en la concentración de GST en larvas de *R. arenarum* expuestas de manera individual a concentraciones de 1,5 y 2,5 mg/L de GLY (con renovación cada 48h a las 2 y 4 semanas de exposición), como así tampoco registraron variaciones cuando el GLY se encontraba en mezclas con ciprofloxacina, amoxicilina y clorpirifos. En Lajmanovich y col., (2022), la evaluación de la actividad de GST en *Scinax squaleirostris* luego de 48h de exposición tanto a GLY como a glufosinato de amonio en distintas concentraciones (0; 1,56; 3,12; 6,25 mg/L), mostró un aumento significativo únicamente en la concentración más alta en ambos herbicidas, como así

también se observaron respuestas similares en presencia de estos herbicidas en mezclas con microplásticos (Lajmanovich y col., 2022).

Si bien existe evidencia de la acción del estrés oxidativo como uno de los mecanismos de toxicidad del GLY en especies de animales silvestres, la variabilidad de los efectos intra e interespecífica de los herbicidas es un fenómeno bien conocido que se observa en los anfibios (p. ej., Holcombe y col., 1987; Howe y col., 2004; Jones y col., 2009; Lajmanovich y col., 2010).

#### **5.4.4. Variables hormonales**

Cuando los estímulos del entorno se perciben como una amenaza, los animales en general y los anuros en particular, inician las respuestas de estrés mediante la activación del eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal y la secreción de hormonas glucocorticoides, tales como el cortisol y la corticosterona (Cockrem, 2013). En este trabajo se evaluaron los valores de CORT en larvas de *R. arenarum* y *S. nasicus*, aunque solo las larvas de *S. nasicus* incrementaron los valores de CORT ante la presencia del PRED *B. elongatus* (Tabla 19 y 20). En coincidencia con otros trabajos, se ha establecido que los niveles de hormonas glucocorticoides en larvas de anuros son excelentes biomarcadores en presencia de depredadores y otros estresores ambientales (Burraco y col., 2016; Gabor y col., 2019; Denver y col., 2021).

A diferencia de la respuesta neuroendocrina a las señales de los depredadores en los mamíferos, donde el eje HPA se activa (Figueiredo y col., 2003; Apfelbach y col., 2005; Roseboom y col., 2007), algunos autores han encontrado que la exposición de larvas de anuros a feromonas de alarma provocó una supresión dosis-dependiente del contenido de GC en homogenato de renacuajos (Fraker y col., 2009) de manera similar a lo observado en juveniles de *R. arenarum* en este trabajo. Asimismo, Jaffe (1981), determinó los niveles de corticosterona durante el desarrollo de larvas de *R. catesbeiana* y observó un decrecimiento de los niveles de la hormona post clímax metamórfico. Caldji y col., (2010), sugirieron que este es un período de hiporrespuesta al stress que protege a los neonatos de los efectos nocivos de los GC durante la fase inicial de rápido crecimiento, especialmente en las neuronas en crecimiento (Caldji y col., 2010). Además, un aumento o disminución en las concentraciones de GC circulantes depende de la interpretación del estímulo, ya sea de manera positiva interpretado el estímulo como una mejora o de manera negativa, al interpretado como un empeoramiento de las condiciones (Romero, 2004). Según estas observaciones, es de esperar que el cambio de un ambiente acuático en estadio larval con depredadores por otro terrestre, sería interpretado como una disminución del riesgo de

depredación por parte de los individuos post metamorfosis de *R. arenarum*, siendo que una vez que finaliza el estímulo del riesgo al PRED, los GC vuelven a las concentraciones de referencia (Romero y col., 2009). Burraco y col., (2016) asociaron la reducción de GC en larvas de *Pelobates cultripes* en presencia de depredadores con la reducción en la tasa de actividad (Polo-Cavia y Gomez-Mestre, 2014); estos resultados se concuerdan con los obtenidos en otras especies de anfibios (Barry y Syal, 2013), incluso, en ocasiones donde previamente se reportó un aumento transitorio inicial (Steiner y Van Buskirk, 2009).

En larvas y juveniles de *R. arenarum* y *S. nasicus* no se reportaron cambios en sus niveles de CORT luego de la exposición crónica a GLY (**Tablas 19 y 20**). En consistencia con los resultados publicados por Gabor y col., (2019), donde se expusieron durante 7 días a renacuajos de *Incilius nebulifer* a una concentración de 0,7 mg/L de GLY con la formulación de Roundup (Gabor y col., 2019). En contraste, en renacuajos de *Pelobates cultripes* expuestos a 1 o 2 mg/L i.a. de GLY, se demostró un incremento de CORT en todo el cuerpo después de un período de exposición de 10 días (Burraco y Gomez-Mestre, 2016). Algunos estudios, muestran que la exposición crónica a múltiples factores estresantes interactúa de manera impredecible y alteran la liberación de GC (Dallman y col., 1992) pudiendo generar aclimatación, donde el individuo ya no percibe al factor estresante como nocivo y reduce la respuesta de secreción de GC (Romero y col., 2009).

La única especie de este trabajo que mostró cambios significativos a nivel de las hormonas tiroideas fue *S. nasicus* (**Tabla 20; Figuras 68-72**). La exposición al herbicida GLY junto al PRED en juveniles de *S. nasicus* mostró interacciones significativas en los valores de las hormonas T3, mientras que las concentraciones de T4 evaluadas en este trabajo se mostraron incrementadas de manera significativa en larvas luego de la exposición a PRED y en juveniles luego de la exposición a GLY. Las hormonas tiroideas modulan el funcionamiento de numerosas vías metabólicas relevantes para el metabolismo basal (Danforth y Burger, 1984; Onur y col., 2005), aunque los mecanismos exactos que subyacen a su regulación siguen sin estar del todo claros (Kim y col., 2000). Se ha establecido que la presencia de depredadores aumenta la producción de hormonas tiroideas al activar el eje de estrés neuroendocrino (Relyea 2002; Capellán y Nicieza, 2007). En renacuajos, la regulación de las hormonas tiroideas es esencial para alcanzar la metamorfosis, por lo que una vez que inicia su secreción a partir de la glándula tiroidea, su concentración aumenta determinando la tasa de desarrollo (Shi, 2000; Brown y Cai, 2007). En coincidencia con los resultados aquí obtenidos, a partir de la exposición de las larvas de *S. nasicus* al PRED, donde la concentración de T4 se incrementó, se sugiere una aceleración en la tasa de desarrollo en correspondencia con el incremento en el peso de las

larvas de esta especie, pese a que esta variable no mostró significancias estadísticas. Más aún, en presencia de PRED, las larvas de *S. nasicus*, no sólo experimentaron un aumento de la T4, sino que también aumentaron sus niveles de CORT. El cortisol actúa sinérgicamente con un aumento de los niveles hormonales en la tiroides, lo que acelera la metamorfosis (Hayes y col., 1993, Kikuyama y col., 1993, Wright y col., 1994).

En cuanto a los resultados obtenidos en *R. arenarum*, el hecho de no hallarse cambios significativos en la concentración de CORT o de las hormonas tiroideas T3 y T4 luego de la exposición al PRED puede indicar que los estímulos estresantes por parte de estos no fueron los suficientes para incrementar los valores de estos biomarcadores en larvas de especies aposemáticas o tóxicas, aun siendo que *B. elongatum* efectivamente depreda larvas de *R. arenarum*. Alternativamente, un patrón de respuesta mayor a estos estímulos puede haberse expresado en los niveles de otra hormona de respuesta al stress como la corticosterona que no ha sido evaluada en este trabajo.

La evidencia acumulada durante las últimas dos décadas indica que una amplia gama de sustancias químicas antropogénicas tiene la capacidad de alterar la función endocrina en especies silvestres (Techer y col., 2016; Movasseghi y col., 2017; Chang y col., 2018; Lajmanovich y col., 2019). Las concentraciones de T3 y T4 en larvas de *S. nasicus* luego de la exposición al GLY se redujeron un 33,3% y 26% respectivamente en relación al grupo control, aunque no mostraron una disminución estadísticamente significativa. Estos resultados parecen ser consistentes con los antecedentes de disrupción hormonal post-exposición, sin embargo, es necesario realizar más determinaciones con un número mayor de muestras para dilucidar si los cambios observados se deben efectivamente al efecto del herbicida sobre la regulación hormonal de los renacuajos. Efectos marcados de alteración hormonal fueron observados en los juveniles *S. nasicus*, donde se reportó una alteración en los parámetros de concentración de T4 luego de la exposición al herbicida GLY en comparación con el grupo control. Más aún, las interacciones establecidas en los juveniles de esta especie luego de la exposición al GLY y PRED, dan cuenta de similares mecanismos de regulación del metabolismo general frente a diferentes estresores ambientales. Si bien son varias las hormonas que componen las complejas vías metabólicas responsables de causar cambios morfológicos o etológicos en los anfibios, las principales hormonas involucradas son las hormonas tiroideas T3 y T4 (Denver, 2021). En este sentido, cualquier interrupción en la producción, biodisponibilidad o acción de estas hormonas como la interacción de T3 observada en larvas de *S. nasicus* tiene el potencial de provocar efectos significativos en el crecimiento, desarrollo y supervivencia de los renacuajos (Crain y col., 2000).



Por otro lado, si bien los valores de T4 en juveniles de *S. nasicus* experimentaron un aumento significativo en presencia de GLY, no se observaron los mismos resultados en larvas o juveniles de *R. arenarum*. Cuzziol Boccioni y col., (2021) tampoco encontraron variaciones de la concentración de T4 en larvas de *R. arenarum* luego de 4 semanas de exposición a 1,5 y 2,5 mg/L de GLY (con renovación cada 48h), aunque sí observaron un aumento de la hormona T4 a las dos semanas de exposición con la mayor concentración de GLY evaluada (2,5 mg/L), junto con un retraso en el desarrollo de larvas que se observó a las 2 y 4 semanas en ambas concentraciones. Sin embargo, en un estudio donde se compararon la tasas de desarrollo de larvas de *Rana sylvatica* expuestas crónicamente desde la etapa de desarrollo de Gosner 25 a 42 a dos concentraciones de 0,021 mg/L y 2,9 mg/L del i.a. de la formulación de GLY VisionMax, sólo se observó una disminución en la tasa de desarrollo en la concentración más alta, sugiriendo que los renacuajos deben estar expuestos a una concentración "umbral" de herbicida a base de glifosato para exhibir efectos fenotípicos observables y que estos umbrales son especie específicos (Navarro-Martin y col., 2014). Los mismos autores encontraron una relación entre la exposición a GLY VisionMax y la expresión de genes clave vinculados a la cascada hormonal que induce la metamorfosis en los renacuajos anuros en desarrollo, tales como el receptor beta de la hormona tiroidea (*trβ*), las desyodasas (*dio2* y *dio3*), el factor liberador de corticotropina (*crf*) y el receptor de glucocorticotiroideo (*grII*), lo que demuestra el potencial que poseen que los herbicidas a base de glifosato para alterar la respuesta hormonal normal durante la metamorfosis (Navarro-Martin y col., 2014).



## 6. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo de tesis doctoral indican que Roundup Controlmax, un herbicida que contiene glifosato y otros surfactantes no revelados, afectaría potencialmente la viabilidad poblacional de distintas especies de anuros nativos por la exposición aguda y crónica a este contaminante, alterando la interacción depredador-presa en las comunidades ecológicas remanentes en los agroecosistemas. Las especies evaluadas *R. arenarum*, *P. albonotatus* y *S. nasicus* mostraron una respuesta especie-específica frente a la exposición de dos estresores ambientales diferentes: un depredador y un contaminante ampliamente utilizado como lo es el glifosato.

- ✚ La presencia de depredadores belostomátidos y la concentración ambientalmente relevante (1,5mg/L) de una formulación comercial afectó el comportamiento natatorio de *R. arenarum* y *S. nasicus*.
- ✚ Sólo las larvas de la especie *R. arenarum* mostraron efectos por depredadores y por el glifosato en su morfología. Además las larvas de *R. arenarum* mostraron diferencias respecto al peso y el largo total por efecto del glifosato mientras que los juveniles evidenciaron efectos respecto al peso, el largo total, el ancho de cabeza y el factor de condición animal en presencia de depredadores y de glifosato. Por su parte, las larvas de *P. albonotatus* redujeron su peso a causa de la presencia de depredadores mientras que los juveniles de *S. nasicus* aumentaron su longitud en presencia del herbicida glifosato.
- ✚ La presencia de depredadores belostomátidos afectaron los niveles de cortisol, generando una disminución de sus niveles en juveniles de *R. arenarum* y un aumento de los mismos en larvas de *S. nasicus*. Asimismo, se observó una interacción entre la presencia de depredadores y de glifosato respecto a los niveles de triyodotironina. En *S. nasicus* la concentración de la hormona tiroxina aumentó en presencia de de ambos estresores ambientales (depredador en larvas; glifosato en juveniles).
- ✚ La presencia de depredadores produjo un incremento en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en larvas de *P. albonotatus* y *S. nasicus* y en juveniles de *R. arenarum*. Similarmente, la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa fue inducida en larvas de *R. arenarum* luego de la exposición a glifosato, manteniendo su incremento en los juveniles.
- ✚ La actividad de la enzima glutatión-S-transferasa presentó interacciones entre los estresores estudiados en larvas de *P. albonotatus* y en larvas y juveniles de *S. nasicus*.

La heterogeneidad de respuestas especie-específicas respecto a los estresores ambientales (depredadores y glifosato) dificulta la selección de un único biomarcador para la evaluación ecotoxicológica en anfibios anuros cuando son expuestos a este agroquímico de uso masivo en todo el mundo. Es así que se advierte la necesidad de incorporar múltiples marcadores que contemplen distintas escalas jerárquicas etológicos, morfológicos, enzimáticos y hormonales para obtener mayor relevancia ambiental y evitar el mecanicismo ecotoxicológico, sobre todo cuando estos vertebrados no solo son utilizados como organismos modelo sino que también presentan serias falencias de conservación por la disparidad de resultados respecto a los mecanismos y respuestas químico-intra-interespecíficas.

Finalmente, los resultados expuestos en esta tesis se acepta la hipótesis planteada de que el herbicida glifosato es ecotóxico para las larvas de anfibios argentinos poniendo en riesgo sus poblaciones y comunidades y a los ecosistemas en su conjunto, por lo que se recomienda enfáticamente un cambio de modelo productivo: desde uno biotecnológico a base de herbicidas hacia uno basado en la agroecología, que mitigue los impactos de la agricultura como la pérdida de biodiversidad y los costos ambientales y sanitarios asociados.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Adamec, R.E. y Shallow, T. (1993). Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiology & Behavior*, 54(1), 101–109.
- Adamec, R.E., Blundell, J., Burton, P. (2005). Neural circuit changes mediating lasting brain and behavioral response to predator stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 29(8), 1225–1241.
- Adamec, R., Head, D., Soreq, H., Blundell, J. (2008). The role of the read through variant of acetylcholinesterase in anxiogenic effects of predator stress in mice. *Behavior Brain Research*, 189(1), 180–190.
- Adams, S.M. (2005). Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems. *Marine Pollution Bulletin*, 51(8-12), 649-657.
- Ågerstrand, M., Arnold, K., Balshine, S., Brodin, T., Brooks, B. W., Maack, G., Ford, A. T. (2020). Emerging investigator series, use of behavioural endpoints in the regulation of chemicals. *Environmental Science, Processes & Impacts*, 22(1), 49-65.
- Ahmed, O.M., El-Gareib, A.W., El-bakry, A.M., Abd El-Tawab, S.M., Ahmed, R.G. (2008). Thyroid hormone states and brain development interactions. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 26(2), 147–209.
- Aldridge, W.N. (1953). Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochemical Journal*, 53(2), 110-117.
- Alonso, L.L., Demetrio, P.M., Etchegoyen, M.A., Marino, D.J. (2018). Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Science of the Total Environment*, 645, 89-96.
- Altwegg, R. y Reyer, H.U. (2003). Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution*, 57(4), 872-882.
- Amiard-Triquet, C. (2009). Behavioral disturbances, the missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. *Human and Ecological Risk Assessment*, 15(1), 87-110.
- Anderson, G.W., Schoonover, C.M., Jones, S.A. (2003). Control of thyroid hormone action in the developing rat brain. *Thyroid*, 13(11), 1039–1056.
- Angel, G. y Angel, M. (2000). *Interpretación Clínica de Laboratorio*, 6° ed., Panamericana, Bogotá, 664.

- Anholt, B.R. y Werner, E.E. (1995). Interaction between food availability and predation mortality mediated by adaptive behaviour. *Ecology*, 76(7), 2230-2234.
- Anholt, B.R.E., Werner, Skelly, D.K. (2000). Effect of food and predators on the activity of four larval ranid frogs. *Ecology*, 81(12), 3509-3521.
- Aparicio, V.C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., Costa, J. L. (2013). Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere*, 93(9), 1866-1873.
- Aparicio, V.C., De Gerónimo, E., Hernández Guijarro, K., Perez, D.J., Portocarrero R.A., Vidal, C.M. (2015). Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente. Ediciones INTA, 2015. -- 73 p. Buenos Aires, Argentina.
- Apfelbach, R., Blanchard, C.D., Blanchard, R.J., Hayes, R.A., McGregor, I.S. (2005). The effects of predator odors in mammalian prey species, a review of field and laboratory studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1123-1144.
- Aristizábal-García, H. (2017). Hemípteros acuáticos y semiacuáticos del neotrópico. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Colección Jorge Álvarez Lleras, 33, 984. ISBN Vol. 978-958-9205-91-4
- Arregui, M.C., Puricell, EC. (2013). Mecanismos de acción de plaguicidas. Rosario, Ed UNR. ISSN 978-987-702-017-5.
- ASIH. (2004). Guidelines for Use of Live Amphibians and Reptiles in Field and Laboratory Research, Herpetological Animal Care and Use Committee (HACC) of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Washington DC, USA.
- Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C. (2004). Nuevo caso de malformación en un ejemplar de rana (*Leptodactylus ocellatus*) (Amphibia, Anura) del Litoral Argentino. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 15(1), 20-22.
- Attademo, A.M., Peltzer, P., Lajmanovich, R.C. (2005). Amphibians occurring in soybean and implications for biological control in Argentina. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 106(4), 385 - 395.
- Attademo, A.M., Cejas, W., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C. (2007). Phenology in the diet of *Chaunus arenarum* (Anura, Bufonidae) in a soybean field of Córdoba province, Argentina. *Revista Española de Herpetología*, 21, 41-48.
- Attademo, A.M., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Boccioni, A.P.C., Martinuzzi, C., Simoniello, F., Repetti, M.R. (2021). Effects of the emulsifiable herbicide Dicamba on

amphibian tadpoles, an underestimated toxicity risk?. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(24), 31962-31974.

- Azevedo-Ramos, C., Magnusson, W.E. y Bayliss, P. (1999). Predation as a key factor structuring tadpole assemblages in a savanna area in Central Amazonia. *Copeia*, 1999(1), 22-33.
- Bach, N.C., Natale, G.S., Somoza, G. M., Ronco, A.E. (2016). Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole frog, *Leptodactylus latrans*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(23), 23959–23971.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E.A., Stohs, S.J. (1995). *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 104(1-3), 129–140.
- Baier, F., Gruber, E., Hein, T., Bondar-Kunze, E., Ivanković, M., Mentler, A., Brühl, C. A., Spangl, B., & Zaller, J. G. (2016). Non-target effects of a glyphosate-based herbicide on Common toad larvae (*Bufo bufo*, Amphibia) and associated algae are altered by temperature. *PeerJ*, 2016(11), 1–23.
- Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, A., Bertone, V., Freitas, I., Fasola, M., Fenoglio, C. (2007). Evaluation of *Rana esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology*, 81(1), 45 - 54.
- Barros, L. y Braun, J.P. (1996). Glutathion S-Transferases (GST), aplicaciones biomédicas y veterinarias. *Veterinaria (Montevideo)*, 32(131), 11-16.
- Barry, M.J. (1998). Endosulfan-enhanced crest induction in *Daphnia longicephala*, Evidence for cholinergic innervation of kairomone receptors. *Journal of Plankton Research*, 20(7), 1219–1231.
- Barry, M.J. (1999). The effects of a pesticide on inducible phenotypic plasticity in *Daphnia*. *Environmental Pollution*, 104(2), 217–224.
- Barry, M.J. (2000). Effects of endosulfan on Chaoborus- induced life-history shifts and morphological defenses in *Daphnia pulex*. . *Journal of Plankton Research*, 22(9), 1705–1718.
- Barry, M.J. y Syal, S. (2013). Metabolic responses of tadpoles to chemical predation cues. *Hydrobiologia*, 700(1), 267-276.

- Battaglin, W.A., Kolpin, D.W., Scribner, E.A., Kuivila, K.M., Sandstrom, M.W. (2005). Glyphosate, other herbicides, and transformation products in midwestern streams, 20021. *American Journal of Water Resources*, 41(2), 323-332.
- Battaglin, W.A. y Kolok, A. (2014). Featured collection introduction--Contaminants of emerging concern II, JAWRA. *American Journal of Water Resources*, 50(2), 261-265.
- Battaglin, W.A., Meyer, M.T., Kuivila, K.M., Dietze, J.E. (2014). Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation, JAWRA. *American Journal of Water Resources*, 50(2), 275-290.
- Bayley, M.A.R.K., Dell'Omo, G. (2002). Basic Behaviour: The use of Animal Locomotion in Behavioural Ecotoxicology. *Behavioural ecotoxicology*, 5, 211.
- Becerril Bravo, J.E. (2009). Contaminantes emergentes en el agua. *Revista Digital Universitaria*, 10(8), 1-7. ISSN: 1067-6079
- BCR. (2021). Informe semanal Bolsa de Comercio de Rosario. <https://www.bcr.com.ar/es/print/pdf/node/90722>
- Beck, C.W., Congdon, J.D. (2000). Effects of age and size at metamorphosis on performance and metabolic rates of Southern Toad, *Bufo terrestris*, metamorphs. *Functional Ecology* 14, 32–38.
- Beck, K.D., Brennan, F.X., Moldow, R.L., Ottenweller, J.E., Zhu, G., Servatius, R.J. (2003). Stress interacts with peripheral cholinesterase inhibitors to cause central nervous system effects. *Life Science*, 73(1), 41–51.
- Beeri, R., Andres, C., Lev-Lehman, E., Timberg, R., Huberman, T., Shani, M., Soreq, H. (1995). Transgenic expression of human acetylcholinesterase induces progressive cognitive deterioration in mice. *Current Biology*, 5(9), 1063–1071.
- Begon, M., Harper, J.L., Townsend, C.R. (1996). *Ecology: individuals, populations and communities*. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK.
- Beketov, M.A. y Liess, M. (2005). Acute contamination with esfenvalerate and food limitation, Chronic effects on the mayfly, *Cleon dipterum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(5), 1281 - 1286.
- Belden, J., McMurry, S., Smith, L., Reilley, P. (2010). Acute toxicity of fungicide formulations to amphibians at environmentally relevant concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(11), 2477-2480.

- Belfiore, A., LeRoith, D. (2018). Principles of Endocrinology and Hormone Action. Endocrinology series. Springer International Publishing, 794. ISBN 9783319452173
- Benard, M.F., Fordyce, J. A. (2003). Are induced defenses costly? Consequences of predator-induced defenses in western toads, *Bufo boreas*. Ecology, 84(1), 68–78.
- Benard, M.F. (2004). Predator-induced phenotypic plasticity in organisms with complex life histories. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 35, 651-673.
- Bergman, Å., Heindel, J.J., Jobling, S., Kidd, K., Zoeller, T.R., & World Health Organization. (2013). State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012. World Health Organization.
- Bernal, J. (2002). Thyroid hormones and brain development. In Hormones, brain and behavior. Eds: Academic Press. 4, 543-587
- Bernal-Rey, D.L., Cantera, C.G., dos Santos Afonso, M., Menéndez-Helman, R.J. (2020). Seasonal variations in the dose-response relationship of acetylcholinesterase activity in freshwater fish exposed to chlorpyrifos and glyphosate. Ecotoxicology and Environmental Safety, 187, 109673.
- Berven, K.A. y Gill, D.E. (1983). Interpreting geographic variation on life history traits. American Zoologist, 23(1), 85 - 97.
- Biasatti, N.R, Rozzatti, J.C, Fandiño, B, Pautaso, A., Mosso, E., Marteleur, G., Algañaz, N., Giraudo, A., Chiarulli, C., Romano, M., Ramírez Llorens, P., Vallejos, L. (2016). Las ecoregiones, su conservación y las Áreas Naturales Protegidas de la provincia de Santa Fe. Ministerio de Medio Ambiente.
- Bionda, C., Gari, N., Luque, E., Salas, N., Lajmanovich, R., & Martino, A. (2012). Ecología trófica en larvas de *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) en agroecosistemas y sus posibles implicaciones para la conservación. Revista de Biología Tropical, 60(2), 771–779.
- Blair, J. y Wassersug, R.J. (2000). Variation in the pattern of predator-induced damage to tadpole tails. Copeia, 2, 390-401.
- Blaustein, A.R., Wake, D.B. (1990). Declining amphibian populations, a global phenomenon?. Trends in Ecology & Evolution, 5(7), 203–204.
- Blaustein, A.R., Wake, D.B., Sousa, W.P. (1994). Amphibian declines, judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. Biological Conservation, 8(1), 60 - 71.



- Blaustein, A.R. y Wake, D.B. (1995). The puzzle of declining amphibians populations. *Scientific American*, 272(4), 52-57.
- Blaustein, A.R., Han, B.A., Relyea, R.A., Johnson, P.T., Buck, J.C., Gervasi, S.S., Kats, L.B. (2011). The complexity of amphibian population declines, understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1223(1), 108-119.
- Blaustein, A.R., Urbina, J., Snyder, P.W., Reynolds, E., Dang, T., Hoverman, J.T., Hambalek, N.M. (2018). Effects of emerging infectious diseases on amphibians, a review of experimental studies. *Diversity*, 10(3), 81.
- Bókony, V., Mikó, Z., Móricz, Á. M., Krüzselyi, D., & Hettyey, A. (2017). Chronic exposure to a glyphosate-based herbicide makes toad larvae more toxic. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1858), 20170493.
- Bolsa de Comercio de Rosario (BCR). (2018). Área por tipo de cultivo, lo que nos deja el Censo Nacional Agropecuario 2018. AÑO XXXVII - N° Edición 1931 - 15 de Noviembre de 2019 (consultado Diciembre 2021).
- Bookstein, F.L., Grayson, B., Cutting, C.B., Kim, H.C., McCarthy, J.G. (1991). Landmarks in three dimensions, reconstruction from cephalograms versus direct observation. *Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.* 100(2), 133-140.
- Boone, M.D. y Semlitsch, R.D. (2001). Interactions of an insecticide with larval density and predation in experimental amphibian communities. *Conservation Biology*, 15(1), 228-238.
- Boone, M.D. y Semlitsch, R.D. (2002). Interactions of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities. *Ecological Applications*, 12(1), 307 - 316.
- Boone, M.D. y Bridges, C.M. (2003). Effects of carbaryl on green frog (*Rana clamitans*) tadpoles, timing of exposure versus multiple exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(11), 2695- 2702.
- Boone, M.D. y Semlitsch, R.D. (2003). Interactions of bullfrog tadpole predators and an insecticide, predation release and facilitation. *Oecologia* 137(4), 610 - 616.
- Boone, M.D., Semlitsch, R.D., Fairchild, J.F., Rothermel, B.B. (2004). Effects of an insecticide on amphibians in large-scale experimental ponds. *Ecological Applications*, 14(3), 68-691.

- Boone, M.D. y Bridges-Britton, C.M. (2006). Examining multiple sublethal contaminants on the gray treefrog (*Hyla versicolor*), effects of an insecticide, herbicide, and fertilizer. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(12), 3261 - 3265.
- Bosch, B., Mañas, F., Gorla, N., Aiassa, D. (2011). Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura) for environmental monitoring. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 3(6), 155-163.
- Botten, N., Wood, L.J., Werner, J.R. (2021). Glyphosate remains in forest plant tissues for a decade or more. *Forest Ecology and Management*, 493, 119259.
- Bradberry, S.M., Proudfoot, A.T., Vale, J.A. (2004). Glyphosate poisoning. *Toxicological Reviews*, 23(3), 159-167.
- Bray, J.R. y Curtis, J.T. (1957). An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 325-349.
- Breuner, C.W., Patterson, S.H., Hahn, T.P. (2008). In search of relationships between the acute adrenocortical response and fitness. *General and Comparative Endocrinology*, 157(3), 288–295.
- Bridarolli, M.E. y Tada, I.E.D. (1994). Biogeografía de los anfibios anuros de la región central de la República Argentina. *Cuaderno de Herpetología*, 8, 63-82.
- Bridges, C.M. (1999). Predator-prey interactions between two amphibian species, effects of insecticide exposure. *Aquatic Ecology*, 33(2), 205-211.
- Bridges, C.M. (2000). Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenocephala*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(1), 91–96.
- Bridges, C.M. y Boone, M.D. (2003). The interactive effects of UV-B and insecticide exposure on tadpole survival, growth and development. *Biological Conservation*, 113(1), 49-54.
- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Jonsson, M. (2014). Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1656), 20130580.
- Brönmark, C., Rundle, S.D., Erlandsson, A. (1991). Interactions between freshwater snails and tadpoles, competition and facilitation. *Oecologia*, 87(1), 8-18.

- Broomhall, S.D. y Shine, R. (2003). Effects of the insecticide endosulfan and presence of congeneric tadpoles on Australian treefrog (*Litoria freycineti*) tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45(2), 221-226.
- Broomhall, S.D. (2004). Egg temperature modifies predator avoidance and the effects of the insecticide endosulfan on tadpoles of an Australian frog. *Journal of Applied Ecology*, 41(1), 105-113.
- Broomhall, S.D. (2005). Measuring chemical impacts on amphibians, ecotoxicity and behavioural data in governmental regulation. *Applied Herpetology*, 2(3), 259-285.
- Brown, D.D. y Cai, L. (2007). Amphibian metamorphosis. *Developmental Biology* 306(1), 20.
- Brunelli, E., Bernabò, I., Berg, C., Lundstedt-Enkel, K., Bonacci, A., Tripepi, S. (2009). Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicology*, 91(2), 135-142.
- Brunelli, E., Bernabò, I., Sperone, E., Tripepi, S. (2010). Gill alterations as biomarkers of chronic exposure to endosulfan in *Bufo bufo* tadpoles. *Histology & Histopathology*, 25(12), 1519–1529.
- Burgett, A.A., Wright, C.D., Smith, G.R., Fortune, D.T. y Johnson, S.L. (2007). Impact of ammonium nitrate on wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles, effects on survivorship and behavior. *Herpetological Conservation and Biology*, 2(1), 29-34.
- Burkart, R.N., Bárbaro, O., Sánchez, R.O., Gómez, D.A. (1999). Ecorregiones de la Argentina. Administración de Parques Nacionales y Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable. Argentina, Buenos Aires.
- Burlibaşa, L. y Gavrilă, L. (2011). Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. *Applied Ecology and Environmental Research*, 9(1), 1-15.
- Burraco, P., Duarte, L.J., Gomez-Mestre, I. (2013). Predator-induced physiological responses in tadpoles challenged with herbicide pollution. *Current Zoology*, 59(4), 475-484.
- Burraco, P. y Gomez-Mestre, I. (2016). Physiological stress responses in amphibian larvae to multiple stressors reveal marked anthropogenic effects even below lethal levels. *Physiological and Biochemical Zoology*, 89(6), 462-472.
- Burraco, P., Valdés, A.E., Johansson, F., Gomez-Mestre, I. (2017). Physiological mechanisms of adaptive developmental plasticity in *Rana temporaria* island populations. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 1-10.

- Burraco, P., Iglesias-Carrasco, M., Cabido, C., Gomez-Mestre, I. (2018). Eucalypt leaf litter impairs growth and development of amphibian larvae, inhibits their antipredator responses and alters their physiology. *Conservation physiology*, 6(1) coy066.
- Burton, T. M. y Likens, G.E. (1975a). Energy flow and nutrient cycling in salamander populations in the Hubbard Brook Experimental Forest, New Hampshire. *Ecology*, 56(5), 1068–80.
- Busch, D.S. y Hayward, L.S. (2009). Stress in a conservation context, a discussion of glucocorticoid actions and how levels change with conservation-relevant variables. *Biological Conservation*, 142(12), 2844–2853.
- Cabagna, M., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Attademo, M., Ale, E. (2006) Induction of micronucleus in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia, Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 88(4), 729-737.
- Cabagna-Zenklusen, M.C. (2012). Caracterización hematológica de especies de anfibios anuros con distribución en los ecosistemas del litoral fluvial argentino (provincias de Entre Ríos y Santa Fe). Potencialidad de su utilización como biomarcadores. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. pp. 251.
- Cabrera, A.L., Abraham, W. (1973). Biogeografía de América latina. Washington DC, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, 13, 1-117.
- Cabrera, A.L. (1994). Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Fascículo 1. Regiones fitogeográficas argentinas. Tomo II. Editorial ACME, Buenos Aires, Argentina, pp. 85.
- Caldji, C., Liu, D., Sharma, S., Diorio, J., Francis, D., Meaney, M.J., Plotsky, P.M. (2010). Development of individual differences in behavioral and endocrine responses to stress, role of the postnatal environment. *Comprehensive Physiology*, 271-292.
- Campero, M., Slos, S., Ollevier, F., Stoks, R. (2007) Sublethal pesticide concentrations and predation jointly shape life history: behavioral and physiological mechanisms. *Ecological Applications* 17(7), 2111–2122.
- Capellán, E. y Nicieza, A.G. (2007). Trade-offs across life stages, does predator-induced hatching plasticity reduce anuran post-metamorphic performance?. *Evolutionary Ecology*, 21(4), 445–58.

- Carballo, M.A. y Mudry, M.D. (2006). Indicadores y marcadores biológicos. En: *Genética Toxicológica*, Mudry MD., Carballo MA. (Eds.). De los Cuatro Vientos Editorial, Buenos Aires, Argentina 4, 83–108.
- Carmona, D. (2001). Sitio Argentino de Producción Animal. Revista Visión Rural, nov. *Zoología Agrícola*, Unidad Integrada Balcarce, INTA. [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
- Carolina, E., Antoniazzi, Quiroga, M.F., Vaira, M. (2021). Técnicas de relevamiento de la Diversidad de anuros Relevamiento de renacuajos. En, *Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de anfibios de Argentina Parte I*. Universidad Nacional de Jujuy. Editorial Ediunju. San Salvador de Jujuy, Argentina.
- Carrasco, A.E., Sánchez, N.E., Tamagno, L.E. (2012). Modelo agrícola e impacto socio-ambiental en la Argentina, monocultivo y agronegocios. Serie Monográfica Sociedad y Ambiente, Reflexiones para una nueva América Latina. Primera edición electrónica, AUGM-Comité de Medio Ambiente. (Ed) Jorge L. Frangi. SeDiCI (Servicio de Difusión de la Creación Intelectual), UNLP La Plata, Argentina. ISSN 2314-1743, Monografía, 1, 135.
- Carvalho, W.F., Ruiz de Arcaute, C., Torres, L., de Melo e Silva, D., Soloneski, S., Larramendy, M.L. (2020). Genotoxicity of mixtures of glyphosate with 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid chemical forms towards *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(6), 6515-6525.
- CASAFE. (2022). Mercado Argentino 2022 de Productos Fitosanitarios. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. <http://www.casafe.org>
- Castillo, P. (2016). Expansión regional del cultivo de soja en Argentina. Documentos del Centro Interdisciplinario de Estudios Agrarios (CIEA), N° 3-Documento 5 [http://bibliotecadigital.econ.uba.ar/download/docuciea/docuciea\\_n3\\_05.pdf](http://bibliotecadigital.econ.uba.ar/download/docuciea/docuciea_n3_05.pdf)
- Castro Berman, M., Marino, D.J.G., Quiroga, M.A., Zagarese, H. (2018). Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. *Chemosphere*, 200, 513 – 522
- Cauble, K. y Wagner, R.S. (2005). Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75(3), 429-435.
- Cavalcante, D.G., Martinez, C.B., Sofia, S.H. (2008). Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research*, 655(1-2), 41-46.

- Cederlund, H. (2017). Effects of spray drift of glyphosate on nontarget terrestrial plants—A critical review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(11), 2879–2886.
- Cei, J.M. (1980). Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano*, 2, 609.
- Cei, J.M. (1987). Additional notes to “Amphibians of Argentina” an update, 1980-1986. *Monitore Zoologico Italiano*, 21(3), 209-272.
- Chang, J., Li, J., Hao, W., Wang, H., Li, W., Guo, B., Li, J., Wang, Y., Xu, P. (2018). The body burden and thyroid disruption in lizards (*Eremias argus*) living in benzoylurea pesticides-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 347, 218–226.
- Chen, Q.L., Luo, Z., Zheng, J.L., Li, X.D., Liu, C.X., Zhao, Y.H., Gong, Y. (2012). Protective effects of calcium on copper toxicity in *Pelteobagrus fulvidraco*, copper accumulation, enzymatic activities, histology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76, 126–134.
- Chen, T.H., Gross, J.A., Karasov, W.H. (2009). Chronic exposure to pentavalent arsenic of larval leopard frogs (*Rana pipiens*), bioaccumulation and reduced swimming performance. *Ecotoxicology*, 18(5), 587-593.
- Chuang, M.F., Choe, M., Kang, H., Borze'e, A., Kim, A., Kwon, S., Sung, M., Jang, Y. (2019). Microhabitat preference in American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) in relation to predation pressure. *Aquatic Invasions*, 14(3).
- Clarke, K.R. (1993). Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Austral Ecology*, 18(1), 117-143.
- Cockrem, J.F. (2013). Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *General and Comparative Endocrinology*, 181(1), 45–58.
- Cohn, J. y MacPhail, R.C. (1996). Ethological and experimental approaches to behavior analysis, implications for ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, 104(2), 299-305.
- Colborn, T., Vom Saal, F.S., Soto, A.M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, 101(5), 378-384.
- Collins, S.J., y Russell, R.W. (2009). Toxicity of road salt to Nova Scotia amphibians. *Environmental Pollution*, 157(1), 320-324.
- 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.

- Cooke, A.S. (1971). Selective predation by newts on frog tadpoles treated with DDT. *Nature* 229(5282), 275-276.
- Cooke, S.J., Sack, L., Franklin, C.E., Farrell, A.P., Beardall, J., Wikelski, M., Chown, S.L. (2013). What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conservation physiology*, 1(1), 1-13
- Costa, J.R.M.A., Mela, M., Da Silva de Assis, H.C., Pelletier, E., Ferreira, M.A., De Oliveira, C.A. (2007). Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(1), 82-88.
- Crain, D.A., Rooney, A.A., Orlando, E.F., Guillette Jr, L.J. (2000). Endocrine-disrupting contaminants and hormone dynamics: lessons from wildlife. *Environmental Endocrine Disruptors: An Evolutionary Perspective* (Guillette LJ Jr, Crain DA, eds). New York: Taylor & Francis, 1-21.
- Crespi, E.J. y Denver, R.J. (2004). Ontogeny of corticotropin-releasing factor effects on locomotion and foraging in the western spadefoot toad (*Spea hammondi*). *Hormones and Behavior*, 46(4), 399–410.
- Crespi, E.J. y Denver, R.J. (2005). Roles of stress hormones in food intake regulation in anuran amphibians throughout the life cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141(4), 381-390.
- Crespi, E.J., Williams, T.D., Jessop, T.S., Delehanty, B. (2013). Life history and the ecology of stress, how do glucocorticoid hormones influence life-history variation in animals? *Functional Ecology*, 27, 93–106.
- Curi, L.M., Cuzziol Boccioni, A.P., Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Basso, A., Leon, E.J., Lajmanovich, R.C. (2021). Predator, conspecific and pesticides signals switch swimming behavior of gregarious tadpoles *Rhinella fernandezae* (Anura, Bufonidae). *Canadian Journal of Zoology*, (aceptado).
- 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.
- da Costa Araújo, A.P., Gomes, A.R., Malafaia, G. (2020). Hepatotoxicity of pristine polyethylene microplastics in neotropical physalaemus cuvieri tadpoles (Fitzinger, 1826). *Journal of Hazardous Materials*, 386, 121992.



- da Silva Pinto, T.J., Moreira, R.A., da Silva, L.C.M., Yoshii, M.P.C., Goulart, B.V., Fraga, P. D., Espindola, E.L.G. (2021). Toxicity of fipronil and 2, 4-D formulations (alone and in a mixture) to the tropical amphipod *Hyalella meinerti*. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(28), 38308-38321.
- da Silva Pinto, T.J., Rocha, G.S., Moreira, R.A., da Silva, L.C.M., Yoshii, M.P.C., Goulart, B.V., Espindola, E.L.G. (2022). Chronic environmentally relevant levels of pesticides disrupt energy reserves, feeding rates, and life-cycle responses in the amphipod *Hyalella meinerti*. *Aquatic Toxicology*, 245, 106117.
- Dallman, M.F., Akana, S.F., Scribner, K.A., Bradbury, M.J., Walker, C.D., Strack, A.M., Cascio, C.S. (1992). Stress, Feedback and Facilitation in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Journal of Neuroendocrinology*, 4(5), 517–526.
- Danforth Jr., E. y Burger, A. (1984). The role of thyroid hormones in the control of energy expenditure. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 13(3), 581–595.
- Dardanelli, S., Nores, M.L., Nores, M. (2006). Minimum area requirements of breeding birds in fragmented woodland of Central Argentina. *Diversity and Distributions*, 12(6), 687-693.
- Darlington, R.B., Weinberg, S. L., Walberg, H.J. (1973). Canonical Variate Analysis and Related Techniques. *Review of Educational Research*, 43(4), 433–454.
- Davidson, C. (2004). Declining downwind, amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecological Applications*, 14(6), 1892-1902.
- Davis, R.A., Lohr, C.A., Dale Roberts, J. (2018). Frog survival and population viability in an agricultural landscape with a drying climate. *Population Ecology*, 61(1), 102–112.
- de Abelleira, D., Verón, S., Banchemo, S., Iturralde Elortegui, M., Valiente, S., Puig, O., Murray, F., Martini, J.P., Zelaya, K., Maidana, D., Varlamoff, N., Peiretti, J., Benedetti, P., Portillo, J., Melilli, M., Maidana, E., Goytía, Y., Sapino, V., Regonat, A., Cracogna, F., Espíndola, C., Parodi, M., Colombo, F., Scarel, J., Ayala, J., Martins, L., Basanta, M., Rausch, A., Almada, G., Boero, L., Calcha, J., Chiavassa, A., Lopez de Sabando, M., Kurtz, D., Marini, F., Sarrailhe, S., Petek, M., Propato, T., Ferraina, A., Pezzola, A., Winschel, C., Muñoz, S., Mesa, J., Volante, J. (2021). Mapa Nacional de Cultivos campaña 2020/2021. Colección 1. Versión 1.0. Informe. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.

- de Araujo, M.C., Assis, C.R.D., Silva, L.C., Machado, D.C., Silva, K.C.C., Lima, A.V.A., de Oliveira, M.B.M. (2016). Acetilcolinesterasa cerebral del cíclido jaguar (*Parachromis managuensis*), de las propiedades fisicoquímicas y cinéticas a su potencial como biomarcador de pesticidas e iones metálicos. *Toxicología Acuática*, 177, 182-189.
- de Jesus, E.G., Inui, Y., Hirano, T. (1990). Cortisol enhances the stimulating action of thyroid hormones on dorsal fin-ray resorption of flounder larvae *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology*, 79(2), 167–173.
- de Oliveira, M., de Avila, F.R., Tozetti, A.M. (2017). Diet of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) in a coastal habitat in southern Brazil. *Herpetology Notes*. 10, 507-510
- de Souza, J.S., Kizys, M. M.L., da Conceição, R.R., Glebocki, G., Romano, R.M., Ortiga-Carvalho, T.M., Giannocco, G., Guerreiro da Silva, I.D.C., da Silva, R. M D., Chiamolera, 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.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater, a review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 442-448.
- Deevey, E.S.Jr. (1947). Life tables for natural populations of animals. *Quarterly Review of Biology* 22, 283–314.
- Defarge, N., Takács, E., Lozano, V.L., Mesnage, R., de Vendômois, J.S. (2016). Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. *Molecular Diversity Preservation International., International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(3), 1-17
- Dejadór, M.J., George, S.G. (1998). Una glutatión S-transferasa de piscina que conjuga eficientemente los productos finales de la peroxidación lipídica. *Investigación Ambiental Marina*, 46(1-5), 71–74.
- Denoël, M., Bichot, M., Ficetola, G.F., Delcourt, J., Ylief, M.Y., Kestemont, P., Poncin, P. (2010). Cumulative effects of a road de-icing salt on amphibian behavior. *Aquatic Toxicology*, 99(2), 275-280.
- Denoël, M., D’Hooghe, B., Ficetola, G.F., Brasseur, C., De Pauw, E., Thomé, J.P., Kestemont, P. (2012). Using sets of behavioral biomarkers to assess short-term effects of pesticide, a study case with endosulfan on frog tadpoles. *Ecotoxicology*, 21(4), 1240-1250.

- Denoël, M., Libon, S., Kestemont, P., Brasseur, C., Focant, J. F., De Pauw, E. (2013). Effects of a sublethal pesticide exposure on locomotor behavior, a video-tracking analysis in larval amphibians. *Chemosphere*, 90(3), 945-951.
- Denver, R.J. (1998). Hormonal correlates of environmentally induced metamorphosis in the *Western spadefoot* toad, *Scaphiopus hammondi*. *General and Comparative Endocrinology*, 110(3), 326–36.
- Denver, R.J., Glennemeier, K. A., Boorse, G.C. (2002). Endocrinology of complex life cycles, amphibians. In *Hormones, brain and behavior*. Academic press. 469-XI
- Denver, R.J. (2009). Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. *General and Comparative Endocrinology*, 164(1), 20–31.
- Denver, R.J. (2021). Stress hormones mediate developmental plasticity in vertebrates with complex life cycles. *Neurobiology of Stress*, 14, 100301.
- Devine, M.D., Duke, S.O., Fedtke, C. (1993). *Physiology of herbicide action*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ., EE.UU. 441
- Díaz-Paniagua, C. (1989). Oviposition behavior of *Triturus marmoratus pygmaeus*. *Journal of Herpetology*, 159-163.
- Diaz-Paniagua, C. (1992). Variability in timing of larval season in an amphibian community in SW Spain. *Ecography*, 15(3), 267-272.
- Díaz-Paniagua, C., Portheault, A., Gómez-Rodríguez, C. (2007). Depredadores de los anfibios de Doñana: Análisis cualitativo. Eds: Sociedad de Ciencias Aranzadi. 25: 148- 15.
- Dielenberg, R.A. y McGregor, I.S. (2001). Defensive behavior in rats towards predatory odors, a review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 25(7-8), 597–609.
- Dinerstein, E., Olson, D.M., Graham, D.J., Webster, A.L., Primm, S.A., Bookbinder, M. P., Ledec, G. (1995). Una evaluación del estado de conservación de las eco-regiones terrestres de América Latina y el Caribe. Washington, DC, USA, Banco Mundial. 135-135.
- Dingle, H. y Holyoak, M. (2001). The evolutionary ecology of movement. In *Evolutionary ecology*. Oxford University Press. ISBN-13: 9780195131543
- Dori, A., Cohen, J., Silverman, W.F., Pollack, Y., Soreq, H. (2005). Functional manipulations of acetylcholinesterase splice variants highlight alternative splicing contributions to murine neocortical development. *Cerebral Cortex*, 15(4), 419-430.

- Dudley, S.A., Schmitt, J. (1996). Testing the adaptive plasticity hypothesis, density-dependent selection on manipulated stem length in *Impatiens capensis*, *American Naturalist*, 147(3), 445–465.
- Duke, S.O., Lydon, J., Koskinen, W. C., Moorman, T. B., Chaney, R. L., Hammerschmidt, R. (2012). Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosate-resistant crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(42), 10375-10397.
- 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.
- Duke, S.O., Powles, S.B., Sammons, R.D. (2018). Glyphosate—How it became a once in a hundred year herbicide and its future. *Outlooks on Pest Management*, 29(6), 247-251.
- Duré, M.I., Kehr, A.I., Schaefer, E.F. (2009). Niche overlap and resource partitioning among five sympatric bufonids (*Anura*, *Bufo*) from northeastern Argentina. *Phyllomedusa*, 8(1), 27–39.
- Eaton, D.L., Gilbert, S.G. (2008). Principles of toxicology. En, *Toxicology. The basic sciences of Poison*. Seventh Ed. Klaassen CD. Casarett and Doull's. McGraw-Hill/ Medical publishing division, New York, Chicago, San Francisco, Lisbon, London, Madrid, Mexico City, New Delhi, San Juan Seoul, Singapore, Sydney, Toronto. 1, 1-107.
- Egea-Serrano, A., Relyea, R.A., Tejedo, M., Torralva, M. (2012). Understanding of the impact of chemicals on amphibians, a meta-analytic review. *Ecology and Evolution*, 2(7), 1382-1397.
- Eissa, B.L., Salibian, A., Ferrari, L., Porta, P., Borgnia, M. (2003). Evaluación toxicológica no invasiva del Cadmio: modificaciones de biomarcadores conductuales en *Cyprinus carpio*. *Biología Acuática*, 20, 56-62
- Eissa, B.L., Salibian, A., Ferrari, L., Pérez, R. (2005). Estudios sobre los efectos etológicos del Cadmio. En: *Anales de la Fundación Alberto J. Roemmers*, 16, 435-443.
- Eissa, B.L., Ferrari, L., Osanna, N.A., Salibian, A. (2006). Biomarcadores etológicos no invasivos de estrés ambiental, estudio comparativo en dos teleósteos de ecosistemas de la región pampeana argentina. *Revista de Toxicología*, 23, 11-16.

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V., Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Ezemonye, L. y Tongo, I. (2010). Acute toxic effects of endosulfan and diazinon pesticides on adult amphibians (*Bufo regularis*). *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 2(5), 73-78.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., Glass, C.K., Merrill Jr, A.H., Murphy, R.C., Raetz, R.H., Russell, D.W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Van Nieuwenhze, M.S., White S.H. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *European journal of lipid science and technology*, 107(5), 337-364.
- FAO. (1996). *Herbicidas. En, Manejo de Malezas para Países en Desarrollo. (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal - 120)*. Por, Labrada, R., Caseley, J.C., Parke, C. Roma, Italia. ISBN 92-5-303427-0
- FAO. (2006). Expert Committee on Food Additives. Meeting Staff. *Compendium of food additive specifications*, 67(3). Food & Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO. (2015). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, y Organización Mundial de la Salud Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas. Artículo 2. <http://www.fao.org/3/a-i3604s.pdf> (consultado Noviembre 2021).
- FAO. (2017). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. *Global assessment of the impact of plant protection products on soil functions and soil ecosystems*. Rome, Italy. ISBN, 978-92-5-130031-2
- FAOSTAT. (2022). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAOSTAT Database. <https://www.fao.org/faostat/en/>
- Farenhorst, A.N.N.E.M.I.E.K.E., Papiernik, S.K., Saiyed, I., Messing, P., Stephens, K.D., Schumacher, J.A., Schumacher, T. E. (2008). Herbicide sorption coefficients in relation to soil properties and terrain attributes on a cultivated prairie. *Journal of environmental quality*, 37(3), 1201-1208.
- Fellers, G.M., McConnell, L.L., Pratt, D., Datta, S. (2004). Pesticides in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) from the Sierra Nevada Mountains of California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(9), 2170 - 2177.

- Ferrando, M.D. y Andreu-Moliner, E. (1993). Feeding behavior as an index of copper stress in *Daphnia magna* and *Brachionus calyciflorus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 106(2), 327 - 331.
- Ferrari, M.C., Wisenden, B.D., Chivers, D.P. (2010). Chemical ecology of predator–prey interactions in aquatic ecosystems, a review and prospectus. *Canadian Journal Zoology*, 88(7), 698-724.
- Ferreira, A.P. (2017). Distribución de esteroides estrogénicos en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales. *Acta toxicológica argentina*, 25(3), 80-90.
- Ferreira, M.F., Torres, C., Bracamonte, E., Galetto L. (2017). Effects of the herbicide glyphosate on non-target plant native species from Chaco forest (Argentina). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, 360-368.
- Field, J.A., Johnson, C A., Rose, J B. (2006). What is “emerging”? *Environmental Science and Technology*, 40(23):7105.
- Figueiredo, H., Bodie, B.L., Tauchi, M., Dolgas, C.M., Herman, J.P. (2003). Stress integration following acute and chronic predator stress, differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology*, 144(12), 5249–5258.
- Filipovic, D., Zlatkovic, J., Pajovic, S.B. (2009). The effect of acute or/and chronic stress on the MnSOD protein expression in rat prefrontal cortex and hippocampus. *General Physiology and Biophysics*, 28, 53–61.
- Folmar, L.C., Sanders, H.O., Julin, A.M. (1979). Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 8(3), 269–278.
- Fordham, C.L., Tessari, J.D., Ramsdell, H.S., Keefe, T.J. (2001). Effects of malathion on survival, growth, development, and equilibrium posture of bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1),179-184.
- Forson, D. y Storfer, A. (2006). Effects of atrazine and iridovirus infection on survival and life-history traits of the long-toed salamander (*Ambystoma macrodactylum*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(1), 168-173.
- Fort, D.J., Rogers, R.L., Morgan, L.A., Miller, M.F., Clark, P.A., White, J.A., Paul, R.R., Stover, E.L. (2000). Preliminary validation of a short-term morphological assay to evaluate adverse effects on amphibian metamorphosis and thyroid function using *Xenopus laevis*. *Journal of Applied Toxicology*, 20(5), 419– 425.

- Fort, D.J., Guiney, P.D., Weeks, J.A., Thomas, J.H., Rogers, R.L., Noll, A.M., Spaulding, C. D. (2004). Effect of methoxychlor on various life stages of *Xenopus laevis*. *Toxicological Sciences*, 81(2), 454-466.
- Fraker, M.E., Hu, F., Cuddapah, V., McCollum, S.A., Relyea, R.A., Hempel, J, Denver, R.J. (2009). Characterization of an alarm pheromone secreted by amphibian tadpoles that induces behavioral inhibition and suppression of the neuroendocrine stress axis. *Hormones and Behavior*, 55(4), 520-529.
- Freitas, J.S., Kupsco, A., Diamante, G., Felicio, A.A., Almeida, E.A., Schlenk, D. (2016). Influence of temperature on the thyroidogenic effects of Diuron and its metabolite 3, 4-DCA in tadpoles of the American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Environmental Science & Technology*, 50(23), 13095-13104.
- Freitas, J.S., Giroto, L., Goulart, B.V., Alho, L.D.O.G., Gebara, R.C., Montagner, C.C., Schiesar, L., Espíndola, E.L.G. (2019). Effects of 2, 4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109446.
- Freitas, J.S., da Silva Pinto, T.J., Yoshii, M.P.C., da Silva, L.C.M., de Palma Lopes, L.F., Ogura, A.P., Espíndola, E.L.G. (2022). Realistic exposure to fipronil, 2, 4-D, vinasse and their mixtures impair larval amphibian physiology. *Environmental Pollution*, 118894.
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B., De Sá, R., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M., Wheeler, W.C. (2006). The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297, 1-370.
- Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M.L., Fischer, M., Schönbrunn, E. (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13010-13015.
- Furlow, J.D., Neff, E.S. (2006). A developmental switch induced by thyroid hormone, *Xenopus laevis* metamorphosis. *Trends Endocrinology Metabolism*, 17,40-7.
- Gabor, C.R., Perkins, H.R., Heitmann, A.T., Forsburg, Z.R., Aspbury, A.S. (2019). Roundup with corticosterone functions as an infodisruptor to antipredator response in tadpoles, 7(2), 1-7.



- Gahl, M.K., Longcore, J.E., Houlihan, J.E. (2012). Varying responses of northeastern North American amphibians to the chytrid pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology*, 26(1), 135-141.
- García-de la Parra, L.M., Bautista-Covarrubias, J.C., Rivera-de la Rosa, N., Betancourt-Lozano, M., Guilhermino, L. (2006). Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(3), 372-380.
- Gattás, F., De Stefano, L.G., Vinocur, A., Bordet, F., Espinosa, M.S., Pizarro, H., Cataldo, D. (2018). Impact of interaction between *Limnoperna fortunei* and Roundup Max® on freshwater phytoplankton, an *in situ* approach in Salto Grande reservoir (Argentina). *Chemosphere*, 209, 748–757.
- Gattás, F., Vinocur, A., Graziano, M., Dos Santos Afonso, M., Pizarro, H., Cataldo, D. (2016). Differential impact of *Limnoperna fortunei*-herbicide interaction between Roundup Max® and glyphosate on freshwater microscopic communities. *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (18), 18869–18882.
- Gavier-Pizarro, G.I., Calamari, N.C., Thompson, J.J., Canavelli, S.B., Solari, L.M., Decarre, J., Goijman, A.P., Suarez, R.P., Bernardos, J.N., Zaccagnini, M.E. (2011) Expansion and intensification of row crop agriculture in the Pampas and Espinal of Argentina can reduce ecosystem service provision by changing avian density. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, (154), 44- 55.
- Gazzola, A., Balestrieri, A., Martín, J., Pellitteri-Rosa, D. (2018). Is it worth the risk? Food deprivation effects on tadpole anti-predatory responses. *BMC Evolutionary Biology*, 45(1), 67-74.
- Gervasi, S.S. y Foufopoulos, J. (2008). Costs of plasticity, responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Functional Ecology*, 22(1), 100–8.
- Ghirardi, R., Levy, M.G., López, J.A., Corbalán, V., Steciow, M.M., Perotti, M.G. (2014). Endangered amphibians infected with the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in austral temperate wetlands from Argentina. *The Herpetological Journal*, 24(2), 129-133.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*, 167, 35-120

- Giri, A., Yadav, S.S., Giri, S., Sharma, G.D. (2012). Effect of predator stress and malathion on tadpoles of Indian skittering frog. *Aquatic Toxicology*, 106-107, 157-163.
  - Glennemeier, K.A. y Denver, R.J. (2002). Small changes in whole-body corticosterone content affect larval *Rana pipiens* fitness components. *General and Comparative Endocrinology*, 127(1), 16–25.
  - Glisic, B., Mihaljevic, I., Popovic, M., Zaja, R., Loncar, J., Fent, K., Kovacevic, R., Smital, T. (2015). Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 158, 50-62.
  - Goldman, L.R. (2007). Managing pesticide chronic health risks, U.S. policies. *Journal of Agromedicine*, 12 (1), 67–75.
  - Gómez, S.E. y Ferriz, R.A. (2002) Capacidad de natación en *Poecilia reticulata* (Pisces, Cyprinodontiformes). *Revista Museo Argentino Ciencias Naturales, Nueva Serie* 4, 181-185
  - Gómez, V.I. y Kehr, A.I. (2012a). Morphological and developmental responses of anuran larvae (*Physalaemus albonotatus*) to chemical cues from the predators *Moenkhausia dichoroura* (Characiformes, Characidae) and *Belostoma elongatum* (Hemiptera, Belostomatidae). *Zoological Studies*, 50(2), 203–210.
  - Gómez, V.I. y Kehr, A.I. (2012b). The effect of chemical signal of predatory fish and water bug on the morphology and development of *Elachistocleis bicolor* tadpoles (Anura, Microhylidae). *Biologia*, 67(5), 1001–1006.
  - Gómez V.I., Kehr A.I. (2011) Morphological and developmental plasticity in larvae of *Physalaemus santafecinus* (Anura, Leiuperidae) in response to chemical cues of different predators. *Phyllomedusa*, 10(2), 143–151,
  - Gómez, V I., Kehr, A I. (2013). Interaction between competitors and predators and its effects on morphological and behavioural defences in *Scinax nasicus* tadpoles. *Behaviour*, 150(8), 921 - 937
- Gómez, V.I. (2019). The influence of tadpole density and predation on the behavioral responses of two Neotropical anurans. *Phyllomedusa*, 18, 293 – 298. ISSN: 1519-1397
- Gomez-Mestre, I., Touchon, J.C., Warkentin, K.M. (2006). How amphibian eggs survive with pathogenic water molds, parental and embryo defenses and the egg-stage benefit of a larval predator. *Ecology*, 87(10), 2570- 2581.

- Gomez-Mestre, I., Wiens, J.J., Warkentin, K.M. (2008). Evolution of adaptive plasticity in an ontogenetic switch point, risk-sensitive hatching in neotropical leaf-breeding treefrogs (*Agalychnis*, Hylidae). *Ecological Monographs*, 78(2), 205-224.
- Gomez-Mestre, I. y Diaz-Paniagua, C. (2011). Invasive predatory crayfish do not trigger inducible defenses in tadpoles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1723), 3364-3370
- Gomez-Mestre, I., Kulkarni, S., Buchholz, D.R. (2013). Mechanisms and consequences of developmental acceleration in tadpoles responding to pond drying. *PLoS One*, 8(12), e84266.
- Gönenç, S., Açıkgöz, O., Kayatekin, B.M., Uysal, N., Akhisaroglu, M. (2000). Effects of footshock stress on superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzyme activities and thiobarbituric acid reactive substances levels in the rat prefrontal cortex and striatum. *Neuroscience Letters*, 289(2), 107–110.
- Gotthard, K., Nylin, S. (1995). Adaptive plasticity and plasticity as an adaptation, a selective review of plasticity in animal morphology and life history. *Oikos*, 74, 3–17
- Grasswitz, T.R. y Jones, G.R. (2002). *Chemical Ecology*. Encyclopedia of Life Science. John Wiley & Sons, Ltd. ISBN 978-0470016176.
- Gregorc, A. y Ellis, J.D. (2011). Cell death localization *in situ* in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide biochemistry and physiology*, 99(2), 200–207
- Greulich, K. y Pflugmacher, S. (2003) Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquatic Toxicology*, 65(3), 329 - 336.
- Grisham, C.M., Garrett, R.H. (1999). *Biochemistry*. Philadelphia, Saunders College Pub. pp. 426–7. ISBN 0-03-022318-0.
- 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.
- Gunzburger, M.S. y Travis, J. (2005). Critical literature review of the evidence for unpalatability of amphibian eggs and larvae. *Journal of Herpetology*, 39(4), 547-571.
- Gutleb, A.C., Appelman, J., Bronkhorst, M., van den Berg, J.H., Murk, A.J. (2000). Effects of oral exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) on the development and

metamorphosis of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *Science of the Total Environment*, 262(1-2), 147-157.

- Habdous, M., Herbeth, B., Vincent-Viry, M., Lamont, J.V., Fitzgerald, P.S., Visvikis, S., Siest, G. (2003). Serum total antioxidant status, erythrocyte superoxide dismutase and whole-blood glutathione peroxidase activities in the Stanislas cohort, influencing factors and reference intervals. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 41(2), 209-215.
- 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(22), 7130-7139.
- Hanazato, T. y Hirokawa, H. (2004). Changes in vulnerability of *Daphnia* to an insecticide application depending on the population phase. *Freshwater Biology*, 49(4), 402 - 409.
- Hanifin, C.T., Brodie, E.D. (2003). Tetrodotoxin levels in eggs of the roughskin newt, *Taricha granulosa*, are correlated with female toxicity. *Journal of Chemical Ecology*, 29(8), 1729-1739.
- Hansen, H. y Grossmann, K. (2000). Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiology*, 124(3), 1437-1448.
- Hansen L.R, Rosle P. (2016). Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes. *Aquatic Toxicology*, 179, 36-43.
- Hansen, W.K., Bate, L.J., Landry, D.W., Chastel, O., Parenteau, C., Breuner, C.W. (2016). Feather and faecal corticosterone concentrations predict future reproductive decisions in harlequin ducks (*Histrionicus histrionicus*). *Conservation physiology*, 4(1), cow015
- Harari, Y.N. (2014). *Sapiens, A brief history of humankind*. Londres,. Harvill Secker, 443.
- Haro Sly, M.J. (2017). The Argentine portion of the soybean commodity chain. *Palgrave Communications*, 3(1), 1-11.
- Hartmann, J.T., Beggel, S., Auerswald, K., Stoeckle, B. C., Geist, J. (2016). Establishing mussel behavior as a biomarker in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 170, 279-288.
- Harwood, J.L. (1999). Graminicides which inhibit lipid synthesis. *Pesticide outlook*, 10(4), 154-158.

- Hayes, J.D., Gilligana, D., Chapmanb, B.J., Becketta, G.J. (1983). Purification of human hepatic glutathione S-transferases and the development of a radioimmunoassay for their measurement in plasma. *Clinica chimica acta*, 134(1-2), 107-121.
- Hayes, T.B., Licht, P. (1993). Metabolism of exogenous steroids by anuran larvae. *General and Comparative Endocrinology*, 91(3), 250-258.
- Hayes, T.B., Gill, T.N. (1995). Hormonal regulation of skin gland development in the toad (*Bufo boreas*), the role of the thyroid hormones and corticosterone. *General and Comparative Endocrinology*, 99(2), 161–168.
- Hayes, T. (1997). Steroids as potential modulators of thyroid hormone activity in anuran metamorphosis. *American Zoologist*, 37(2), 185–94.
- Hayes, M.P., Rombough, C.J., Padgett-Flohr, G.E., Hallock, L.A., Johnson, J.E., Wagner, R.S., Engler, J.D. (2009). Amphibian chytridiomycosis in the Oregon spotted frog (*Rana pretiosa*) in Washington State, USA. *Northwestern Naturalist*, 148-151.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 51-88.
- Hazarika, A., Sarkar, S.N., Hajare, S., Kataria, M., Malik, J.K. (2003). Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats, a biochemical interaction study. *Toxicology*, 185(1-2), 1-8.
- Helbing, C.C., van Aggelen, G., Veldhoen, N. (2010). Triclosan affects thyroid hormone-dependent metamorphosis in anurans. *Toxicological Sciences*, 119(2), 417-418.
- Henao Muñoz, L.M., Triana Velásquez, T.M., Bernal Bautista, M.H. (2015). Evaluación de la toxicidad de dos agroquímicos, Roundup® Activo y Cosmo-Flux® 411F, en renacuajos de anuros colombianos. *Acta Biológica Colombiana*, 20(2), 153-161.
- Hernández, J.M.H. (2010). Ensayo comparativo de siembra directa y siembra convencional en el Centro de Formación y Experimentación Agraria (CFA) Viñalta de Palencia - 23 campañas. <https://docplayer.es/41268903-Ensayo-de-siembra-directa-siembra-convencional-cfa-vinalta-de-palencia-23-campanas.html>
- Hero, J.M., Gascon, C., Magnusson, W.E. (1998) Direct and indirect effects of predation on tadpole community structure in the Amazon rainforest. *Austral Ecology*, 23(5), 474 - 482.
- Hero, J.M., Magnusson, W.E., Rocha, C.F.D., Catterall, C.P. (2001) Antipredator defenses influence the distribution of amphibian prey species in the central Amazon rainforest. *Biotropica*, 33(1), 131 - 141.

- Heugens, E.H.W., Hendriks, A.J., Dekker, T., van Straalen, N.M., Admiraal, W.A. (2001). Review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 31(3), 247 - 284.
- Hews, D.K. (1988). Alarm response in larval western toads, *Bufo boreas*, release of larval chemicals by a natural predator and its effect on predator capture efficiency. *Animal Behaviour*, 36(1), 125-133.
- Heyer, W.R., McDiarmid, R.W., Weigmann, D.L. (1975) Tadpoles, predation and pond habitats in the tropics. *Biotropica*. 7, 100 - 111.
- Ho, J.C., Hsiao, C.D., Kawakami, K., William, K.F. (2016). Triclosan (TCS) exposure impairs lipid metabolism in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 173, 29-35.
- Hoffman, D.L. y Brookes, P.S. (2009). Oxygen Sensitivity of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation Depends on Metabolic Conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 284(24), 16236–16245.
- Holcombe, G.W., Phipps, G.L., Sulaiman, A.H., Hoffman, A.D. (1987). Simultaneous multiple species testing, acute toxicity of 13 chemicals to 12 diverse freshwater amphibian, fish, and invertebrate families. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 16(6), 697-710.
- Hook, S.E., Gallagher, E.P., Batley, G.E. (2014). The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integrated environmental assessment and management*, 10(3), 327-341.
- Hooper, M.J., Ankley, G.T., Cristol, D.A., Maryoung, L.A., Noyes, P.D., Pinkerton, K. E. (2013). Interactions between chemical and climate stressors, A role for mechanistic toxicology in assessing climate change risks. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(1), 32-48.
- Horat, P. y Semlitsch, R.D. (1994). Effects of predation risk and hunger on the behavior of two species of tadpoles. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 34(6), 393-401.
- Hoverman, J.T. y Relyea, R.A. (2008). Temporal environmental variation and phenotypic plasticity, a mechanism underlying priority effects. *Oikos*, 117(1), 23-32.
- Howard, R.D., Young, J.R. (1998). Individual variation in male vocal traits and female mating preferences in *Bufo americanus*. *Animal Behavior* 55, 1165–1179.

- 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*, 23(8), 1928–1938.
- Huang, W., Xie, P., Cai, Z. (2020). Lipid metabolism disorders contribute to hepatotoxicity of triclosan in mice. *Journal of Hazardous Materials*, 384, 121310.
- Hued, A.C., Oberhofer, S., Bistoni, M.D. (2012). Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62(1), 107–117
- IARC. (2015). Some Organophosphate Insecticides and Herbicides. International Agency for Research on Cancer. <https://www.iarc.who.int/> (consultado Enero 2022)
- Ili, M., Joji, V., Stamenkovi, G., Markovi, V., Simi, V., Paunovi, M., Crnobrnja-Isailovi, J. (2019). Geometric vs. traditional morphometric methods for exploring morphological variation of tadpoles at early developmental stages. *Amphibia Reptilia*, 40(4), 499–509.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (2015). Archivo, Plaguicidas agregados al suelo. Ediciones INTA. Libro de edición Argentina. ISBN 978-987-521-665-567
- International Life Sciences Institute (ILSI) Argentina. (2012). Clasificación Toxicológica y Etiquetado de Productos Fitosanitarios. Criterios Regulatorios Locales e Internacionales. ILSI Argentina. En, <https://www.casafe.org/wp-content/uploads/2019/05/Clasificacion-toxicologica-etiquetado-fitosanitarios.pdf> (consultado Abril 2020)
- IUCN. (2021). Red List version 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. <https://www.iucn.org/>
- IUPAC., Chemical name computed from chemical structure that uses International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) nomenclature standards.
- Iwamuro, S., Yamada, M., Kato, M., Kikuyama, S. (2006). Effects of bisphenol A on thyroid hormone-dependent up-regulation of thyroid hormone receptor alpha and beta and down-regulation of retinoid X receptor gamma in *Xenopus* tail culture. *Life Sciences*, 79(23), 2165– 2171.
- Jaffe, R.C. (1981). Plasma concentration of corticosterone during *Rana catesbeiana* tadpole metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*, 44(3), 314-318.



- Jager, T., Heugens, E.H.W., Kooijman, S.A.L.M. (2006). Making sense of ecotoxicological test results, towards application of process-based models. *Ecotoxicology* 15(3), 305 - 314.
- Jakob, E.M., Marshall, S.D., Uetz G.W. (1996). Estimating fitness: a comparison of body condition indices. *Oikos* 77: 61-67.
- Jansen, M., De Meester, L., Cielen, A., Buser, C.C., Stoks, R. (2011). The interplay of past and current stress exposure on the water flea *Daphnia*. *Functional Ecology*, 25(5), 974–982.
- Jansens, L., Verberk, W., Stoks, R. (2018). A widespread morphological antipredator mechanism reduces the sensitivity to pesticides and increases the susceptibility to warming. *Science of the Total Environment*, 626, 1230-1235.
- Janssens, L. y Stoks, R. (2012). How does a pesticide pulse increase vulnerability to predation? Combined effects on behavioral traits and escape swimming. *Aquatic Toxicology*, 110-111, 91–98.
- Jara, F.G.y Perotti, M.G. (2006). Variacion ontogenetica en la palatabilidad de los renacuajos de *Bufo spinulosus papillosus* Philippi, 1902 (Anura, Bufonidae). *Cuadernos de Herpetologia*, 19, 37–42.
- Jara, F.G. y Perotti, M.G. (2009). Toad tadpole responses to predator risk, ontogenetic change between constitutive and inducible defenses. *Journal of Herpetology*, 43(1), 82–88
- Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C., Schulz, R. (2005). Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61(6), 817 - 826.
- Jokanovic, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166(3), 139–160.
- Jones, D.K., Hammond, J.I., Relyea, R.A. (2009). Very highly toxic effects of endosulfan across nine species of tadpoles, lag effects and family-level sensitivity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9), 1939 - 1945.
- Jones, D.K., Hammond, J.I., Relyea, R.A. (2011). Competitive stress can make the herbicide Roundup® more deadly to larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(2), 446 - 454.
- Jongman, E. y Jongman, S.R.R. (1995). Data analysis in community and landscape ecology. Cambridge university press.

- Jung, R.E. y Jagoe, C.H. (1995). Effects of low pH and aluminum on body size, swimming performance, and susceptibility to predation of green tree frog (*Hyla cinerea*) tadpoles. *Canadian Journal of Zoology* 73(12), 2171-2183.
- Junges, C.M., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Bassó, A. (2010) Predator-prey interactions between *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae) and *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Amphibia, Hylidae), importance of lateral line in nocturnal predation and effects of fenitrothion exposure. *Chemosphere*, 81(10), 1233 - 1238.
- Junges, C.M., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Cabagna-Zenklusen, M.C., Basso, A. (2012). Toxicity of the fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish-tadpole interaction. *Chemosphere* 87(11), 1348 - 1354. *Academis Press Inc Elsevier Science, Inglaterra*. ISSN, 0045-6535.
- Kats, L.B., Petranka, J.W., Sih, A. (1988). Antipredator defenses and the persistence of amphibian larvae with fishes. *Ecology*, 69(6), 1865-1870.
- Kats, L.B. y Ferrer, R.P. (2003). Alien predators and amphibian declines, Review of two decades of science and the transition to conservation. *Diversity and Distributions*, 9(2), 99 - 110.
- Katzenberger, M., Hammond, J., Duarte, H., Tejedo, M., Calabuig, C., Relyea, R.A. (2014). Swimming with Predators and Pesticides, How Environmental Stressors Affect the Thermal Physiology of Tadpoles. *PLoS ONE*, 9(5), e98265.
- Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S., Soreq, H. (1998). Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*, 393(6683), 373-377.
- Kehr, A.I. y Williams, J.D. (1990). Larvas de Anuros de la República Argentina. *Cuad. Herpetol. (Serie Monografias)* 2, 1-44.
- Kehr, A.I. y Schnack, J.A. (1991). Predator-prey relationship between water bugs (*Belostoma oxyurum*) and larval anurans (*Bufo arenarum*). *Alytes*, 9(3), 61-69.
- Kehr, A.I. (1994a) Density-dependent responses in *Bufo arenarum* tadpoles. *Physis. B*, 49(116-117), 31-36.
- Kehr, A.I. (1994b) Patrones de dispersión espacio-temporales y su influencia en la biología larval de *Bufo arenarum* (Amphibia, Anura). *Neotropical*, 40(103-104), 35- 40.
- Kehr, A. I. y Duré, M.I. (1995). Descripción de la larva de *Scinax nasica* (Cope, 1862) (Anura, Hylidae). *Facena*, 11, 99-103.

- Kehr, A.I., Schaefer, E.F., Duré, M.I. (2004). The tadpole of *Physalaemus albonotatus* (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Herpetology*, 38(1), 145 - 148.
- Kehr, A. y Gomez, V. (2009). Intestinal, Body and Tail Plasticity in *Rhinella schneideri* (Bufonidae) Tadpoles Induced by a Predator Insect (*Belostoma elegans*). *Advances Studies in Biology*, 1(2), 85–94.
- Kehr, A.I. y Gómez, V.I. (2014). Influence of density and predators on metamorphic size in *Rhinella schneideri* tadpoles raised in mesocosm conditions. *Biologia (Poland)*, 69(10), 1417–1424.
- Kendall, R.J., Anderson, T.A., Baker, R.J., Bens, K.M., Carr, J.A., Chiodo, L.A., Cobb, G.P., Dickerson, R.L., Dixon, K.R., Frame, L.T., Hooper, M.J., Martin, C.F., McMurry, S.T., Patino, R., Smith, E.E., Theodorakis, C.W. (2005). *Ecotoxicología*. En, *Fundamentos de Toxicología*. (Eds., Klaassen, C.D. y Watkins, J.B.) Casarett y Doull, McGraw-Hill / Interamericana, Madrid, España. 428 - 437.
- Kerfoot, W.C., Sih, A. (1987). In, Kerfoot, W.C., Sih, A. (Eds.), *Predation, Direct and Indirect Impacts on Aquatic Communities*. Hannover University Press, New England.
- Ketterer, B. (1986). Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica*, 16(10/11), 957-973.
- Kikuyama, S., Kawamura, K., Tanaka, S., Yamamoto, K. (1993). Aspects of amphibian meta- morphosis, hormonal control. *International Review of Cytology*, 45, 105-148.
- Kim, M.S., Small, C.J., Stanley, S.A., Morgan, D.G., Seal, L.J., Kong, W.M., Edwards, C.M., Abusnana, S., Sunter, D., Ghatei, M.A., Bloom, S.R. (2000). The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effects of leptin. *The Journal of Clinical Investigation*, 105, 1005–1011.
- Kingsley, G.R. (1942). The direct biuret method for the determination of serum proteins as applied to photoelectric and visual colorimetry. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 27, 840-845.
- Kishida, O. y Nishimura, K. (2005). Multiple inducible defences against multiple predator in the anuran tadpole, *Rana pirica*. *Evolutionary Ecology Research*, 7(4), 619–631.
- Kissane, Z. y Shephard, J.M. (2017). The rise of glyphosate and new opportunities for biosentinel early-warning studies. *Conservation Biology*, 31(6), 1293-1300.
- Kloskowski, J. (2009). Size-structured effects of common carp on reproduction of pond-breeding amphibians. *Hydrobiologia*, 635(1), 205 - 213.

- Kubsad, D., Nilsson, E.E., King, S.E., Sadler-Riggelman, I., Beck, D., Skinner, M.K. (2019). Assessment of glyphosate induced epigenetic transgenerational inheritance of pathologies and sperm epimutations, generational toxicology. *Scientific Reports*, 9(1), 6372
- Kupferberg, S.J. (1997). The role of larval diet in anuran metamorphosis. *American Zoologist*, 37(2), 146-159.
- Lajmanovich, R.C. (1994). Contribución al conocimiento de la alimentación de larvas de la rana *criolla* *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia, Anura) en el Paraná, Argentina. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 29(1), 55 - 61.
- Lajmanovich, R.C. (1995). Relaciones tróficas de bufonidos (Anura, Bufonidae) en ambientes del Río Paraná, Argentina. *Alytes*, 13(3), 87-103.
- Lajmanovich, R.C. (1997). Alimentación de larvas de anuros en ambientes temporales del sistema del Río Paraná, Argentina. *Doñana Acta Vertebrata* 24(1-2), 191-202.
- Lajmanovich, R.C. (2000). Interpretación ecológica de una comunidad larvaria de anfibios anuros. *Interciencia*, 25(2), 71-79.
- Lajmanovich, R.C. y Peltzer, P.M. (2001) Evaluación de la diversidad de anfibios de un remanete forestal del valle aluvial del río Paraná (Entre Ríos-Argentina). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 12(1), 12 - 17.
- Lajmanovich, R.C., Lorenzatti, E., de la Sierra, P., Marino, F., Peltzer, P.M. (2002). First registrations of organochlorines pesticides residues in amphibians of the Mesopotamic Region, Argentina. *Froglog* 54, 4-5.
- Lajmanovich, R., Lorenzatti, E., Maitre, M.I., Enrique, S., Peltzer, P. (2003). Comparative acute toxicity of the commercial herbicides glyphosate to neotropical tadpoles *Scinax nasicus* (Anura, Hylidae). *Fresenius Environmental Bulletin*, 12(4), 364-367.
- Lajmanovich, R.C., Sánchez-Hernández, J.C., Stringhini, G., Peltzer, P.M. (2004). Levels of serum cholinesterase activity in the rococo toad (*Bufo paracnemis*) in agrosystems of Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(3), 548 - 591.
- Lajmanovich, R.C., Cabagna, M., Peltzer, P.M., Stringhini, G.A., Attademo, A.M. (2005a). Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia, Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research*, 587(1-2), 67 - 72.
- Lajmanovich R., De La Sierra, P., Marino, F., Peltzer, P., Lenardón, A., Lorenzatti, E. (2005b). Determinación de residuos de organoclorados en vertebrados silvestres del litoral

fluvial de Argentina. En, Temas de la Biodiversidad del Litoral Fluvial Argentino II (Ed., Aceñolaza, F.G.), INSUGEO, Miscelánea 14, Tucumán, Argentina. 255 - 262.

- Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M. (2009) Inhibition and recovery of brain and tail cholinesterases of *Odontophrynus americanus* tadpoles (Amphibia, Cycloramphidae) exposed to fenitrothion. *Journal of Environmental Biology*, 30 (5), 923-926.
- Lajmanovich R., Attademo A., Peltzer P., Junges C., Cabagna M. (2011). Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles, B-esterases and glutathione s-transferase inhibitions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(4), 681 - 689.
- 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.
- 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 and Soil Pollution*, 224(3), 1404.
- Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Martinuzzi, C.S., Attademo, A.M., Bassó, A., Colussi, C.L. (2019). Insecticide pyriproxyfen (Dragón®) damage biotransformation, thyroid hormones, heart rate, and swimming performance of *Odontophrynus americanus* tadpoles. *Chemosphere*, 220, 714-722.
- 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.
- Lanctôt, C., Navarro-martín, L., Robertson, C., Park, B., Jackman, P., Pauli, B.D., Trudeau, V L. (2014). Effects of glyphosate-based herbicides on survival , development , growth and sex ratios of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles . II, Agriculturally relevant exposures to Roundup WeatherMax ® and Vision ® under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, 154, 291–303. \_
- Langiano, Vdo, C., Martinez, C.B. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147, 222e231.

- Lanno, M. (2005). Amphibian declines. The conservation status of United States species. USA. ISBN-13: 9780520235922
- Larramendy, M.L., Molinari, G., González, N.V., Pilili, J.P., Vera Candiotti, J., Reigosa, M.A., Soloneski, S. (2010). Agroquímicos en Argentina. Genotoxicidad y citotoxicidad inducida por principios activos y sus formulaciones comerciales. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 21(2), 6.
- Laurila, A., Pakkasmaa, S., Merilä, J. (2006). Population divergence in growth rate and antipredator defences in *Rana arvalis*. *Oecologia*, 147(4), 585-595.
- Lavilla, E.O. y Cei, J.M. (2001). Amphibians of Argentina. A second update, 1987-2000. Monografie XXVIII. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Torino, 177.
- Lavilla, E.O., Langone, J.A., Caramaschi, U., Heyer, W.R., De Sá, R.O. (2010). The identification of *Rana ocellata* Linnaeus, 1758. Nomenclatural impact on the species currently known as *Leptodactylus ocellatus* (Leptodactylidae) and *Osteopilus brunneus* (Gosse, 1851) (Hylidae). *Zootaxa*, (2346), 1 - 16.
- Legay, C. (2000). Why so many forms of acetylcholinesterase? *Microscopy Research and Technique*, 49(1), 56 -72.
- Lehman, C.M. y Williams, B.K. (2010). Effects of current-use pesticides on amphibians. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, 2nd ed. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA, 167-202.
- Leonzio, C. y Fossi, M.C. (2020). Nondestructive biomarker strategy, perspectives and applications. In *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. CRC Press, 297-312.
- Levesque, H.M., Moon T.W., Campbell, P.G.C. Hontela, A. (2002). Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flaescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquatic Toxicology*, 60(3-4), 257-267.
- Lew, C. (2017). Cartography of Global Amphibian Species Richness. In, *Worldwide Amphibian Declines, What is the scope of the problem, what are the causes, and what can be done?* AmphibiaWeb. <https://amphibiaweb.org/declines/>
- Li, X. (2009). Glutathione and glutathione-s-transferase in detoxification mechanisms. *General and Applied Toxicology. Molecular and Cellular Aspects of Toxicology*, 1-13
- Li, Y., Ma, Y., Yang, L., Duan, S., Zhou, F., Chen, J., Zhang, B. (2020). Effects of azithromycin on feeding behavior and nutrition accumulation of *Daphnia magna* under the different exposure pathways. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197, 110573.

- Liess, M., Schäfer, R.B., Schriever, C.A. (2008). The footprint of pesticide stress in communities – species traits reveal community effects of toxicants. *Science of the Total Environment*, 406(3), 484–490.
- Liess, M., Foit, K., Knillmann, S., Schäfer, R.B., Liess, H.D. (2016). Predicting the synergy of multiple stress effects. *Scientific Reports*, 6(1), 32965.
- Linkov, F., Yurkovetsky, Z., Lokshin, A. (2009). Hormones as biomarkers, practical guide to utilizing luminex technologies for biomarker research. In *Tumor Biomarker Discovery*. Humana Press, Totowa, NJ, 129-141
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M.E., Schettino, T. (2013). Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine, new insights and future perspectives. *BioMed research international*, 1-8.
- Lips, K.R., Reaser, J.K., Young, B.E., Ibañez, R. (1999). El monitoreo de anfibios en América Latina. Un manual para coordinar esfuerzos. The nature conservancy. United States National Science Foundation. Smithsonian Tropical Research Institute, Ciudad de Panamá, Panamá. Colegio de la Frontera Sur, Chetumal, México. Pontificia Universidad Católica de Ecuador, Quito, Ecuador.
- Little, E.E., Archeski, R.D., Flerov, B.A., Kozlovskaya, V.I. (1990). Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19(3), 380-385.
- Little, E.E. (2002) Behavioural measures of injuries to fish and aquatic organisms, regulatory considerations. En: *Behavioural Ecotoxicology* (Ed., Dell’Omo, G.) 463, 411 - 432.
- Litwack, G., Ketterer, B., Arias, I.M. (1971). Ligandin, a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature*, 234(5330), 466-467.
- Lockridge, O., Bartels, C.F., Vaughan, T.A., Wong, C.K., Norton, S.E., Johnson, L.L. (1987). Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*, 262(2), 549 - 557.
- López, J. A. (2009). Ecología trófica de anuros en ambientes ribereños de la provincia de Santa Fe (Argentina) y su relación con alteraciones ambientales (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata), 158-176



- Lower, W.R. y Kendall, R.J. (1990). Sentinel species and sentinel bioassay. En, *Biomarkers of Environmental Contamination* (Eds., Mc Carthy, J.F. y Shugart, L.R.) Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, USA, 309 - 331.
- Lupi, L., Bedmar, F., Puricelli Marino, M., Marino, D., Aparicio, V., Wunderlin, D., Miglioranza, K. (2019). Glyphosate runoff and its occurrence in rainwater and subsurface soil in the nearby area of agricultural fields in Argentina. *Chemosphere*, 225, 906-914.
- Lushchak, V., Kubrak, O. I., Storey, J. M., Storey, K. B., Lushchak, V. I. (2009). Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*, 76(7), 932-937.
- Lutri, V.F., Matteoda, E., Blarasin, M., Aparicio, V., Giacobone, D., Maldonado, L., Becher Quinodoz, F., Cabrera, A., Giuliano, Albo, J. (2019). Hydrogeological features affecting spatial distribution of glyphosate and AMPA in groundwater and surface water in an agroecosystem. Córdoba, Argentina. *Science of the Total Environment*, 22, 134557.
- Lyche, J.L., Nourizadeh-Lillabadi, R., Karlsson, C., Stavik, B., Berg, V., Skåre, J.U., Ropstad, E. (2011). Natural mixtures of POPs affected body weight gain and induced transcription of genes involved in weight regulation and insulin signaling. *Aquatic Toxicology*, 102(3-4), 197-204.
- Macchi, I., Phillips, J. (1966). *In vitro* effect of adrenocorticotropin on corticoid secretion in the turtle, snake, and bullfrog. *General and Comparative Endocrinology*, 6(2), 170–182.
- Macchi, L., Grau, H. R., Zelaya, P. V., Marinaro, S. (2013). Trade-offs between land use intensity and avian biodiversity in the dry Chaco of Argentina, A tale of two gradients. *Agriculture, ecosystems & environment*, 174, 11-20.
- Macchi, L., Decarre, J., Goijman, A.P., Mastrangelo, M., Blendinger, P.G., Gavier-Pizarro, G. I., Kuemmerle, T. (2020). Trade-offs between biodiversity and agriculture are moving targets in dynamic landscapes. *Journal of Applied Ecology*, 57(10), 2054-2063.
- Madliger, C.L., Cooke, S.J., Crespi, E.J., Funk, J.L., Hultine, K.R., Hunt, K.E., Rohr, J.R., Sinclair, B.J., Suski, C.D., Willis, C.K. (2016). Success stories and emerging themes in conservation physiology. *Conservation physiology*, 4,(1):cov057.
- Mandrillon, A. L. y Saglio, P. (2007). Herbicide exposure affects the chemical recognition of a non native predator in common toad tadpoles (*Bufo bufo*). *Chemoecology*, 17(1), 31-36.

- Mann, R.M. y 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(2), 193–199.
- 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.
- Marco, A. (2002). Contaminación global por nitrógeno y declive de anfibios. *Revista Española de Herpetología*. 16, 5-17.
- Marentette, J.R., Tong, S., Wang, G., Sopinka, N.M., Taves, M.D., Koops, M.A., Balshine, S. (2012). Behavior as biomarker? Laboratory versus field movement in round goby (*Neogobius melanostomus*) from highly contaminated habitats. *Ecotoxicology*, 21(4), 1003-1012.
- Massoulié, J. (2002). The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*, 11(3), 130-143.
- Masuda, J., Mitsushima, D., Kimura, F. (2004). Female rats living in small cages respond to restraint stress with both adrenocortical corticosterone release and acetylcholine release in the hippocampus. *Neuroscience Letters*, 358(3), 169–172.
- McCallum, M. L. (2007). Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. *Journal of Herpetology*, 41(3), 483-491.
- McCollum, S. y Leimberger, J. (1997). Predator-induced morphological changes in an amphibian, predation by dragonflies affects tadpole shape and color. *Oecologia* 109(4), 615-621.
- McCoy, K.A., Bortnick, L.J., Campbell, C.M., Hamlin, H.J., Guillette Jr., L.J., St Mary, C.M. (2008). Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*. *Environmental Health Perspectives*, 116(11), 1526 - 1532.
- McDiarmid, R.W. y Altig, R. (1999). Tadpoles. *The Biology of Anuran Larvae*. The University of Chicago Press, Chicago.
- McEwen, B.S. y Wingfield, J.C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43(1), 2–15.
- Mena, F., Romero, A., Blasco, J., Araújo, C.V. (2022). Can a mixture of agrochemicals (glyphosate, chlorpyrifos and chlorothalonil) mask the perception of an individual chemical? A hidden trap underlying ecological risk. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 230, 113172.

- Menke, A. (1979). Family Belostomatidae giant water bugs. The semiaquatic and aquatic hemiptera of California (Heteroptera, Hemiptera). University of California Press, Berkeley, 76–86.
- Meshorer, E. y Soreq, H. (2006). Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends Neurosciences*, 29(4), 216–224.
- Meshorer, E., Bryk, B., Toiber, D., Cohen, J., Podoly, E., Dori, A., Soreq, H. (2005). SC35 promotes sustainable stress-induced alternative splicing of neuronal acetylcholinesterase mRNA. *Molecular psychiatry*, 10(11), 985-997.
- Meshorer, E., Erb, C., Gazit, R., Pavlovsky, L., Kaufer, D., Friedman, A., Glick, D., Ben-Arie, N., Soreq, H. (2002). Alternative splicing and neuritic mRNA translocation under long-term neuronal hypersensitivity. *Science*, 295(5554), 508–512.
- Meshorer, E., Toiber, D., Zurel, D., Sahly, I., Dori, A., Cagnano, E., Schreiber, L., Grisaru, D., Tronche, F., and Soreq, H. (2004). Combinatorial complexity of 5' alternative acetylcholinesterase transcripts and protein products. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), 29740–29751.
- Mesnage, R., Arno, M., Costanzo, M., Malatesta, M., Seralini, G.E., Antoniou, M.N. (2015). Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. *Environmental Health*, 14(1), 70.
- Mesnage, R., Renney, G., Seralini, G.E., Ward, M., Antoniou, M.N. (2018). Author Correction, multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. *Scientific Reports*, 8(1), 12572.
- Meyer, M.T., Loftin, K.A., Lee, E.A., Hinshaw, G.H., Dietze, J.E., Scribner, E.A. (2009). Determination of glyphosate, its degradation product aminomethylphosphonic acid, and glufosinate, in water by isotope dilution and online solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Techniques and Method 5-A10*, US Geological Survey, Reston, VA.
- Miaud, C. (1993). Predation on newt eggs (*Triturus alpestris* and *T. helveticus*), identification of predators and protective role of oviposition behaviour. *Journal of Zoology*, 231(4), 575-581.
- Michelena, R., Irurtia, C., Vavruska, F., Mon, R., Pittaluga, A. (1989). Degradación de suelos en el norte de la Región Pampeana. *Publ. Técnica. N°6*. INTA, Centros Regionales Buenos Aires Norte, Córdoba, Entre Ríos y Santa Fé. Proyecto de Agricultura Conservacionista. Pergamino, Buenos Aires. 1–132.

- Mikó, Z., Ujszegi, J., Gál, Z., Hettyey, A. (2017). Standardize or diversify experimental conditions in ecotoxicology? A case study on herbicide toxicity to larvae of two anuran amphibians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(4), 562-569.
- Milesi, M.M., Lorenz, V., Durando, M., Rossetti, M.F., Varayoud, J. (2021). Glyphosate herbicide, reproductive outcomes and multigenerational effects. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 672532.
- Mills, N.E. y Semlitsch, R.D. (2004) Competition and predation mediate the indirect effects of an insecticide on southern leopard frogs. *Ecological Applications*, 14(49), 1041-1054.
- Miyata, K. y Ose, K. (2012). Thyroid hormone-disrupting effects and the amphibian metamorphosis assay. *Journal of toxicologic pathology*, 25(1), 1-9.
- Miyaura, S.H.U.I.C.H.I., Horie, K., IsoNo, H.I.D.E.O. (1988). Glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferase in rabbit liver. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 36(7), 2523-2530.
- Miyazawa, M. y Yamafuji, C. (2005). Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1765-1768.
- Mnif, W., HAssine A.I.H.H., Bouaziz, A., Bategi, A., Thomas, O., Roig, B. (2011). Effect of Endocrine Disruptor Pesticides, A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(6), 2265-2303.
- Mohammad, H.B. y Garza Almanza, V. (2007) Resistencia en Insectos, Plantas y Microorganismos. *Cultura Científica y Tecnológica*, 4(18), 9 - 25.
- Molayemraftar, T., Peyghan, R., Jalali, M. R., Shahriari, A. (2022). Single and combined effects of ammonia and nitrite on common carp, *Cyprinus carpio*, Toxicity, hematological parameters, antioxidant defenses, acetylcholinesterase, and acid phosphatase activities. *Aquaculture*, 548, 737676.
- Mónaco, M.H., Peri, P.L ., Medina, F.A., Colomb, H.P ., Rosales, V.A., Berón, F., Manghi, E., Miño, M.L., Bono, J., Silva, J.R., González Kehler, J.J., Ciuffoli, L., Presta, F., García Collazo, A., Navall, M., Carranza, C., López, D., Gómez Campero, G. (2020). Causas e impactos de la deforestación de los bosques nativos de Argentina y propuestas de desarrollo alternativas. Dirección Nacional de Bosques, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) <https://www.argentina.gob.ar/ambiente/bosques/desmontes-y-alternativas>

- Moore, R.D., Griffiths, R.A., O'Brien, C.M., Murphy, A., Jay, D. (2004). Induced defences in an endangered amphibian in response to an introduced snake predator. *Oecologia*, 141(1), 139-147.
- Moreira, J.C., Peres, F., Simões, A.C., Pignati, W.A., Dores, E.D.C., Vieira, S.N., Mott, T. (2012). Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. *Ciência & Saúde Coletiva*, 17, 1557-1568.
- Morey, S. y Reznick, D. (2001). Effects of larval density on postmetamorphic spadefoot toads (*Spea hammondi*). *Ecology*, 82(2), 510–22.
- Morillo-Velarde, P.S., Lloret, J., Marín, A., Sánchez-Vázquez, F.J. (2011). Effects of cadmium on locomotor activity rhythms of the amphipod *Gammarus aequicauda*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(3), 444-451.
- Movasseggi, A.R., Rodriguez-Estival, J., Smits, J.E.G. (2017). Thyroid pathology in deer mice (*Peromyscus maniculata*) from a reclaimed mine site on the athabasca oil sands. *Environmental Pollution*, 222, 42–49.
- Mudry M.D. y Carballo M.A. (Eds.). De los Cuatro Vientos Editorial, Buenos Aires, Argentina. 17, 459-479.
- Mudry, M.D. y Greizerstein, E. (2006). Principios de citogenética y evaluación genotóxica. En, *Genética Toxicológica*, Mudry MD., Carballo MA. (Eds.). De los Cuatro Vientos Editorial, Buenos Aires, Argentina. 5, 57–81.
- Mussalli-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M., Rojas del Castillo E. (2013). Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution, from molecules to ecosystem. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 117-140.
- Nacionales y Secretaria de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires.
- Nanni, A.S. y Grau, H. R. (2017). Land-use redistribution compensated for ecosystem service losses derived from agriculture expansion, with mixed effects on biodiversity in a NW Argentina watershed. *Forests*, 8(8), 303.
- National Toxicology Program. Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health (NTP). (1992). National Toxicology Program Chemical Repository Database. Research Triangle Park, North Carolina.
- Navarro-Martín, L., Lanctot, 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.

- Newman, R.A., Dunham, A.E. (1994). Size at metamorphosis and water loss in a desert anuran (*Scaphiopus couchii*). *Copeia* 1994, 372–381.
- Newman, R.A. (1999). Body size and diet of recently metamorphosed spadefoot toads (*Scaphiopus couchii*). *Herpetologica* 55, 507–515.
- Newman, M., Clements, W. (2007). *Ecotoxicology A Comprehensive Treatment*. 1st ed., CRC Press, Gloucester Point, VA, USA. ISBN 9780849333576.
- Newman, M.M., Hoilett, N., Lorenz, N., Dick, R.P., Liles, M.R., Ramsier, C., Kloepper, J.W. (2016). Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. *Science of the Total Environment*, 543, 155-160.
- NGNCA. (2005). Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente. Correspondiente a Heptacloro + Epóxido de Heptacloro República Argentina Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación, 18.
- Nogueira, V., Rigoulet, M., Piquet, M.A., Devin, A., Fontaine, E., Leverve, X.M. (2001). Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 46104-46110.
- Noldus, L.P., Spink, A.J., Tegelenbosch, R.A. (2002). Computerized video tracking, movement analysis and behaviour recognition in insects. *Computers and Electronics in agriculture*, 35(2-3), 201-227.
- Nomura, F., do Prado, V.H.M., da Silva, F.R., Borges, R.E., Dias, N.Y.N., Rossa-Feres, D.D.C. (2011). Are you experienced? Predator type and predator experience trade-offs in relation to tadpole mortality rates. *Journal of Zoology*, 284(2), 144–150.
- Nørum, U., Friberg, N., Jensen, M.R., Pedersen, J.M., Bjerregaard, P. (2010). Behavioural changes in three species of freshwater macroinvertebrates exposed to the pyrethroid lambda-cyhalothrin, laboratory and stream microcosm studies. *Aquatic Toxicology* 98(4), 328-335.
- Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2005) Characterization and use of the total head soluble cholinesterases from the mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) for screening of anticholinesterase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20(4), 369-376.
- Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2006) Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, 62(4), 581-594.

- Oda, S., Kato, Y., Watanabe, H., Tatarazako, N., Iguchi, T. (2011). Morphological changes in *Daphnia galeata* induced by a crustacean terpenoid hormone and its analog. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(1), 232–238.
- OMS. (2019). Clasificación recomendada por la OMS de los plaguicidas por el peligro que presentan y Directrices para la clasificación. Organización Mundial para la Salud. ISBN 978-92-4-001605-7 [online]
- ONU. (2022). Database de la Organización de Naciones Unidas. <https://data.un.org/>
- Onur, S., Haas, V., Bosy-Westphal, A., Hauer, M., Paul, T., Nutzinger, D., Klein, H., Muller, M.J. (2005). L-triiodothyronine is a major determinant of resting energy expenditure in underweight patients with anorexia nervosa and during weight gain. *European Journal of Endocrinology*, 152(2), 179–184.
- Orchinik, M. (1998). Glucocorticoids, stress, and behavior, shifting the timeframe. *Hormones and Behavior*, 152(3), 48–56.
- Orizaola Pereda, G. (2004). Efecto de la predación sobre el comportamiento de puesta y la biología larvaria de anfibios. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, de la Universidad de Oviedo. España. 1-174.
- Orlofske, S.A. y Hopkins, W.A. (2009). Energetics of metamorphic climax in the pickerel frog (*Lithobates palustris*). *Comparative Biochemistry & Physiology, Part A*, 154(2), 191–196.
- Oruc, E. O., Sevgiler, Y., Uner, N. (2004). Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2, 4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology & Pharmacology*, 137(1), 43-51.
- 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.
- Pajovic, S.B., Pejic, S., Stojiljkovic, V., Gavrilovic, L., Dronjak, S., Kanazir, D.T. (2006). Alterations in hippocampal antioxidant enzyme activities and sympatho-adrenomedullary system of rats in response to different stress models, *Physiological Research*, 55(4), 453–460.
- Pala, A. (2019). The effect of a glyphosate-based herbicide on acetylcholinesterase (AChE) activity, oxidative stress, and antioxidant status in freshwater amphipod, *Gammarus pulex* (Crustacean). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(36), 36869-36877.



- Papa, J.C. y Tuesca, D. (2014). Los problemas actuales de malezas en la región sojera núcleo argentina, origen y alternativas de manejo. Para mejorar la producción N° 52 - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria, Oliveros
- Peckarsky, B.L. (1996). Alternative predator-avoidance syndromes of stream-dwelling mayflies. *Ecology*, 77(6), 1888– 1905
- Peltzer, P.M., Ponssa, M.L., Lajmanovich, R.C. (2001). Caso de malformación en *Leptodactylus mystacinus* (Anura, Leptodactylidae). *Neotropical Naturalist*, 32(2), 165 - 168.
- Peltzer, P.M. y Lajmanovich, R.C. (2001). Habitat fragmentation and amphibian species richness in riparian areas of the Parana River, Argentina. *Froglog* 46, 5.
- 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 Parana River, Argentina. *Journal of Herpetology*, 13, 95 - 98.
- Peltzer, P.M. y Lajmanovich, R.C. (2004). Anuran tadpole assemblages in riparian areas of the Middle Paraná River, Argentina. *Biodiversity and Conservation*, 13(10), 1833 - 1842.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Cejas, W. (2005). Diversidad y conservación de anuros en ecosistemas agrícolas de Argentina, implicancias en el control biológico de plagas. *Miscelánea*, 14, 399-416.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Beltzer, A.H. (2006). Diversity of anurans across agricultural ponds in Argentina. *Biodiversity and Conservation*, 15, 3499 - 3513.
- Peltzer, P.M y Lajmanovich, R.C. (2007). Amphibians. En, *The Middle Paraná River, Limnology of a Subtropical Wetland* (Eds., Iriondo, M.H., Paggi, J.C. y Parma, M.J), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 328 - 340.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Sánchez-Hernández, J.C., Cabagna, M., 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.
- Peltzer, P., Attademo, A.M., Lajmanovich, R.C., Junges, C.M., Beltzer, A.H., Sanchez L.C. (2010). Trophic dynamics of three sympatric anuran species in a soybean

agroecosystem from Santa Fe Province, Argentina., British Herpetological Society., Herpetological Journal, 20(4), 261-269.

- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Sanchez, L.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Bionda, C.L., Martino, A.L., Bassó, A. (2011). Morphological abnormalities in amphibian populations from the mid - eastern region of Argentina. Herpetological Conservation and Biology, 6(3), 432 - 442.

- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Curi, L.M., Martinuzzi, C.S., Agostini, M.G., Ghirardi, R., Martino, J.A., Ludovico, A., Natale, G.S., Arellano, M.L., Ubeda, C.A., Vaira, M., Akmentins, M.S. (2018). Plan de Acción para la Conservación de los Anfibios de la República Argentina. Componente 3. Amenazas., Asociación Herpetológica Argentina., Cuadernos de Herpetología, 32(1- 8), 29-35.

- Peluso, J., Furió Lanuza, A., Pérez Coll, C.S., Aronzon, C.M. (2021). Synergistic effects of glyphosate-and 2, 4-D-based pesticides mixtures on *Rhinella arenarum* larvae. Environmental Science and Pollution Research, 29(10), 14443–14452.

- Pereira, H.A., Hernandez, P.R.T., Netto, M.S., Reske, G.D., Vieceli, V., Oliveira, L.F.S., Dotto, G.L. (2021). Adsorbents for glyphosate removal in contaminated waters, a review. Environmental Chemistry Letters, 19(2), 1525-1543.

- Pérez, G.L., Torremorell, A., Mugni, H., Rodriguez, P., Vera, M.S., Nascimento, M., Allende, L., Bustingorry, J., Escaray, R., Ferraro, M., Izaguirre, I., Pizarro, H., Bonetto, C., Morris, D.P., Zagarese, H. (2007). Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities, a mesocosm study. Ecological Applications, 17(8), 2310–2322.

- Peruzzo, P. J., Porta, A.A., Ronco, A. E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. Environmental pollution, 156(1), 61-66.

- Peterson, J.A. y Blaustein, A. R. (1992). Relative palatabilities of anuran larvae to natural aquatic insect predators. Copeia, 2, 577–584.

- Petranka, J.W., Kats, L.B., Sih, A. (1987). Predator-prey interactions among fish and larval amphibians, Use of chemical cues to detect predatory fish. Animal Behavior, 35(2), 420–425

- Poletta, G.L., Kleinsorge, E., Paonessa, A., Mudry, M.D., Larriera, A., Siroski, P.A. (2011). Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed *in ovo* to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74(4), 852-859.

- Polo-Cavia, N., Gonzalo, A., López, P., Martín, J. (2010). Predator recognition of native but not invasive turtle predators by naïve anuran tadpoles. *Animal Behaviour* 80(3), 461-466.
- Polo-Cavia, N. y Gomez-Mestre, I. (2014). Learned recognition of introduced predators determines survival of tadpole prey. *Functional Ecology*, 28(2), 432-439.
- Polo-Cavia, N., Burraco, P., Gomez-Mestre, I. (2016). Low levels of chemical anthropogenic pollution may threaten amphibians by impairing predator recognition. *Aquatic Toxicology*, 172, 30-35.
- Polo-Cavia, N. y Gomez-Mestre, I. (2017). Pigmentation plasticity enhances crypsis in larval newts, associated metabolic cost and background choice behaviour. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Porthault, A., Diaz-Paniagua, C., Gomez-Rodriguez, C. (2007). Predation on amphibian eggs and larvae in temporary ponds, The case of *Bufo calamita* in Southwestern Spain. *Revue D'Ecologie-La Terre Et La Vie* 62, 315-322
- Portruneli, N., Bonansea, R.I., Valdés, M.E., da Silva, L.C.M., Viana, N.P., Goulart, B.V., Fernandes, M.N. (2021). Whole-body bioconcentration and biochemical and morphological responses of gills of the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid or fipronil individually or in a mixture. *Aquatic Toxicology*, 240, 105987.
- Postma, J.F., Buckert-de Jogn, M.C., Staats, N., Davids, C. (1994). Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) at different food levels. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26(2),143-148.
- Pough, F.H. (1980). The advantages of ectothermy for tetrapods. *American Naturalist* 115(1), 92–112.
- Pough, F.H. (1983). Amphibians and reptiles and low-energy systems. En *Behavioral energetics, The cost of survival in vertebrates*, ed. W. P. Aspey & S. I. Lustick, 141–88. Columbus, Ohio State University Press.
- Prat, N., Rios-Touma, B., Acosta, R., Rieradevall, M. (2009). Los macroinvertebrados como indicadores de calidad de las aguas. 631-654. ISBN, 978-950-668-015-2
- Puccinelli, E. (2011). How can multiple stressors combine to influence ecosystems and why is it important to address this question? *Integrated Environmental Assessment and Management*, 1(8), 201-202.

- Punzo, F. (2005). Effects of insecticide (carbaryl) exposure on activity and swimming performance of tadpoles of the Rio Grande leopard frog, *Rana berlandieri* (Anura, Ranidae). *Texas Journal of Science*, 57(3), 263 - 272.
- Pyron, R.A. y Wiens, J.J. (2011). A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2,800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61, 543 - 583.
- Ramamonjisoa, N., Nakanishi, K., Natuhara, Y. (2019). The efficacy of a generalized antipredator defense against a novel predator depends on the source of induction in prey. *Hydrobiologia*, 836(1), 197-205.
- Rand, G.M. y Petrocelli, S.R. (1985). *Fundamentals of aquatic toxicology, methods and applications*. FMC Corp., Princeton, NJ.
- Reeves, M.K., Jensen, P., Dolph, C.L., Holyoak, M. y Trust, K.A. (2010) Multiple stressors and the cause of amphibian abnormalities. *Ecological Monographs*, 80(3), 423-440.
- Regueira, E., Dávila, C., Hermida, G.N. (2015). Morphological changes in skin glands during development in *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae). *The Anatomical Record*, 299(1), 141–156.
- Reinehr, T. (2010). Obesity and thyroid function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 316(2), 165–171.
- Relyea, R.A. y Mills, N. (2001). Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2491–2496.
- Relyea, R.A. (2001). Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators. *Ecology*, 82(2), 523–540.
- Relyea, R.A. (2001a). The relationship between predation risk and anti-predator responses in larval anurans. *Ecology*, 82(2), 541 - 554.
- Relyea, R.A. (2002). Competitor-induced plasticity in tadpoles, consequences, cues, and connections to predator-induced plasticity. *Ecological Monographs*, 72(4), 523–40.
- Relyea, R.A. (2002). Local population differences in phenotypic plasticity, predator-induced changes in wood frog tadpoles. *Ecological Monographs*, 72(1), 77-93.
- Relyea, R.A. (2003a). Predator cues and pesticides, a double dose of danger for amphibians. *Ecological Applications*, 13(6), 1515-1521.

- Relyea, R.A. (2003b). How prey respond to combined predators, a review and an empirical test. *Ecology*, 84(7), 1827-1839.
- Relyea, R.A. (2004). Fine-tuned phenotypes, Tadpole plasticity under 16 combinations of predators and competitors. *Ecology*, 85(1), 172-179.
- Relyea, R.A. (2004). Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(7), 1737-1742.
- Relyea, R.A., Auld, J.R. (2004). Having the guts to compete, how intestinal plasticity explains costs of inducible defenses, *Ecology Letters*, 7(9), 869-875.
- Relyea, R.A., Schoepner, N.M., Hoverman, J.T. (2005). Pesticides and amphibians, the importance of community context. *Ecological Applications*, 15(4), 1125 - 1134.
- Relyea, R.A. (2007). Getting out alive, how predators affect the decision to metamorphose. *Oecologia*, 152(3), 389 - 400.
- Relyea, R.A. (2009). A cocktail of contaminants, how mixtures of pesticides at low affect aquatic communities. *Oecologia* 159(2), 363 - 376.
- Relyea, R.A. y Jones, D.K. (2009). The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(9), 2004 - 2008.
- Relyea, R.A. y Edwards, K. (2010). What doesn't kill you makes you sluggish, how sublethal pesticides alter predator-prey interactions. *Copeia*, 4, 558-567.
- Relyea, R.A. (2012). New effects of Roundup on amphibians, predators reduce herbicide mortality., herbicides induce antipredator morphology. *Ecological Applications*, 22(2), 634-647.
- Relyea, R.A. (2018). The interactive effects of predator stress, predation, and the herbicide Roundup. *Ecosphere*, 9(11), e02476.
- Ren, X.M., Kuo, Y., Blumberg, B. (2020). Agrochemicals and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 110926.
- Repetto, M., Sanz, P., Jurado, C., López-Artíguez, M., Menéndez, M., de la Peña, E. (1995). *Glosario de términos toxicológicos*. IUPAC. Versión española ampliada. Sevilla, Asociación Española de Toxicología
- Resetarits, W.J. y Wilbur, H.M. (1991). Calling site choice by *Hyla chrysoscelis*, effect of predators, competitors, and oviposition sites. *Ecology* 72(3), 778- 786-

- Rich, E.L. y Romero L.M. (2005). Exposure to chronic stress downregulates corticosterone responses to acute stressors. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288, R1628–R1636.
- Richardson, J.M.L. (2001). A comparative study of activity levels in larval anurans and response to the presence of different predators. *Behavioral Ecology* 12(1), 51-58.
- Rist, L., Semlitsch, R.D., Hotz, H., Reyer, H-U. (1997). Feeding behaviour, food consumption, and growth efficiency of hemiclinal and parental tadpoles of the *Rana esculenta* complex. *Functional Ecology* 11(6), 735–742.
- Rödin Mörch, P., Forsman, A., Hagman, M. (invited chapter) (2011). Taxonomic patterns of tadpole behavioural responses to alarm cues. *Frogs, biology, ecology and uses* (Murray, JL, ed.). Nova Science Publishers, New York, NY, 123-140.
- Rodriguez, E.M. (2006). Biomarcadores de fauna acuática, estudio de campo y de laboratorio en un contexto ecotoxicológico. En, *Genética Toxicológica*. Mudry MD., Carballo MA. (Eds.). De los Cuatro Vientos Editorial, Buenos Aires, Argentina. 17, 459-479.
- Rohlf, F. y Slice, D. (1990). Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic biology* 39(1), 40-59.
- Rohr, J.R., Elskus, A.A., Shepherd, B.S., Crowley, P.H., McCarthy, T.M., Niedzwiecki, J.H., Sager, T., Sih, A., Palmer, B.D. (2004). Multiple stressors and salamanders, effects of an herbicide, food limitation, and hydroperiod. *Ecological Applications*, 14, 1028 - 1040.
- Rohr, J.R. y Crumrine, P.W. (2005). Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecological Applications*, 15(4), 1135 - 1147.
- Rohr, J.R., Schotthoefer, A.M., Raffel, T.R., Carrick, H.J., Halstead, N., Hoverman, J.T., Johnson, C.M., Johnson, L.B., Lieske, C., Piwoni, M.D., Schoff, P.K., Beasley, V.R. (2008) Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*, 455(7217), 1235-1239.
- Rohlf, F.J. (2017). tpsDig program, digitize coordinates of landmarks and capture outlines, ver. 2.31. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY.
- Romero, L.M. (2004). Physiological stress in ecology, Lessons from biomedical research. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(5), 249–255.

- Romero, L.M., Dickens, M.J., Cyr, N.E. (2009). The reactive scope model, A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Hormones and Behavior*, 55(3), 375–389.
- Romero, D.M., de Molina, M.C.R., Juárez, Á.B. (2011). Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4), 741-747.
- Ronco, A.E., Marino, D.J.G., Abelando, M., Almada, P., Apartin, C.D. (2016). Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin, glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(8), 1-13.
- Roseboom, P.H., Nanda, S.A., Bakshi, V.P., Trentani, A., Newman, S.M., Kalin, N. +H. (2007). Predator threat induces behavioral inhibition, pituitary-adrenal activation and changes in amygdala CRF-binding protein gene expression. *Psychoneuroendocrinology*, 32(1), 44-55.
- Rotundo, R.L. (2003). Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *Journal of Neurocytology*, 32(5), 743–766.
- Rowe, C.L., Kinney, O.M., Nagle, R.D., Congdon J.D. (1998). Elevated maintenance costs in an anuran (*Rana catesbeiana*) exposed to a mixture of trace elements during the embryonic and early larval periods. *Physiological Zoology*, 71(1), 27–35.
- Ruthsatz, K., Dausmann, K.H., Drees, C., Becker, L.I., Hartmann, L., Reese, J., Glos, J. (2018). Altered thyroid hormone levels affect body condition at metamorphosis in larvae of *Xenopus laevis*. *Journal of Applied Toxicology*, 38(11), 1416-1425.
- Saglio, P., Olsén, K. H., Bretaud, S. (2001). Behavioral and olfactory responses to prochloraz, bentazone, and nicosulfuron-contaminated flows in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41(2), 192-200.
- Saidani, W., Sellami, B., Khazri, A., Mezni, A., Dellali, M., Joubert, O., Beyrem, H. (2019). Metal accumulation, biochemical and behavioral responses on the Mediterranean clams *Ruditapes decussatus* exposed to two photocatalyst nanocomposites (TiO<sub>2</sub> NPs and AuTiO<sub>2</sub>NPs). *Aquatic Toxicology* 208, 71-79.
- Sakamoto, M., Change, K.H, Hanazato, T. (2006). Inhibition of development of anti-predator morphology in the small cladoceran *Bosmina* by an insecticide, impact of an anthropogenic chemical on prey–predator interactions. *Freshwater Biology* 51(10), 1974–1983



- Salgado Costa, C. (2016). Desarrollo de un modelo experimental con larvas de *Ceratophrys* spp. (Anura, Ceratophryidae) para su aplicación en estudios ecotoxicológicos de plaguicidas, efectos sobre variables convencionales y bioacústicas (Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata).
- Sánchez, E., Waliszewski Kubiak, S. M., Trujillo, P., Infanzón Ruíz, R. M. (2003). El DDT, su uso y legislación. *La Ciencia y el Hombre*, 3, 27-30.
- Sánchez-Chávez, G. y Salceda, R. (2008). Enzimas Polifuncionales, El caso de la acetilcolinesterasa. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(2), 44-51.
- Sanchez, L.C., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C. (2009). Structure of wetland-breeding anuran assemblages from the southern section of the Paraná river, Argentina. *Journal of Herpetology*, 19(4), 173 - 184.
- Sanchez, L.C. (2011). Alteraciones de la dinámica y biología reproductiva de anuros (Amphibia, Anura) producidos por el avance de la frontera agrícola en ambientes naturales del delta superior del río Paraná. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, 175.
- Sánchez, J.A.A., Barros, D.M., de los Angeles Bistoni, M., Ballesteros, M.L., Roggio, M.A., Martins, C.D.G.M. (2021). Glyphosate-based herbicides affect behavioural patterns of the livebearer *Jenynsia multidentata*. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(23), 29958–29970.
- Sánchez-Hernández, J.C., Fossi, M.C., Focardi, S. (1997). Serum “B” esterases as a nondestructive biomarker for monitoring the exposure of reptiles to organophosphorus insecticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38(1), 45-52.
- Sanchez-Hernandez, J.C. (2001). Wildlife exposure to organophosphorus insecticides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 172, 21–63.
- Sánchez-Hernández, J.C. y Moreno Sánchez, B. (2002). Lizard cholinesterase as biomarkers of pesticide exposure, enzymological characterization. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(11), 2319-2325.
- Sánchez-Hernández, J.C. (2003). Evaluating reptile exposure to cholinesterase-inhibiting agrochemicals by serum butyrylcholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(2), 296 - 301.
- Sánchez-Hernández, J.C., Borghini, F., Corral, A. Grimalt, J.O. (2004). Field uptake rates of hydrophobic organic contaminants by semipermeable membrane devices,

environmental monitoring considerations. *Journal of Environmental Monitoring*, 6(11), 919 - 925.

- Sánchez-Hernández, J.C. (2007). Ecotoxicological perspectives of B-esterases in the assessment of pesticide contamination. En, *Environmental Pollution, New Research*. (Ed., Plattenberg, R.H.) Nova Science Publishers, New York, USA. p. 1-45.
- Sansiñena, J.A. (2020). Estudio de calidad ambiental con larvas de anfibios como bioindicadores (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Sanzo, D. y Hecnar, S. J. (2006). Effects of road de-icing salt (NaCl) on larval wood frogs (*Rana sylvatica*). *Environmental pollution*, 140(2), 247-256.
- Sapolsky, R.M. y Meaney, M.J. (1986). Maturation of the adreno- cortical stress response, neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Research Reviews*, 11(1), 64–76.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21(1), 55–89.
- Sarasamma, S., Audira, G., Siregar, P., Malhotra, N., Lai, Y.H., Liang, S. T., Hsiao, C.D. (2020). Nanoplastics cause neurobehavioral impairments, reproductive and oxidative damages, and biomarker responses in zebrafish, throwing up alarms of wide spread health risk of exposure. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1410.
- Sauv e, S. y Desrosiers, M. (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 1-7.
- Schmajuk, N.A. y Segura, E.T. (1982). Behavioral regulation of water balance in the toad *Bufo arenarum*. *Herpetologica*, 38(2), 296-301.
- Schubert, A. y Telcs, A.M. (2014). A note on the Jaccardized Czekanowski similarity index. *Scientometrics*, 98(2), 1397–1399.
- Scott, G.R. y Sloman, K.A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour, integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, 68(4), 369 - 392.
- Semlitsch, R.D. y Gibbons, W. (1988) Fish predation in size-structured populations of treefrog tadpoles. *Oecologia* 75, 321-326.

- Semlitsch, R.D., Scott, D.C. y Pechmann, J.H.K. (1988). Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology*, 69(1), 184-192.
- Semlitsch, R.D. (1993). Adaptive genetic variation in growth and development of tadpoles of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *Evolution*, 47, 1805-1818.
- Semlitsch, R.D. (1993). Effects of different predators on the survival and development of tadpoles from the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *Oikos* 67(1), 40-46.
- Semlitsch, R.D., Foglia, M., Mueller, A., Steiner, I., Fioramonti, E., Fent, K. (1995). Short-term exposure to triphenyltin affects the swimming and feeding behavior of tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(8), 1419-1423.
- Semlitsch, R.D., Bridges, C.M., Welch, A. M. (2000). Genetic variation and a fitness tradeoff in the tolerance of gray treefrog (*Hyla versicolor*) tadpoles to the insecticide carbaryl. *Oecologia*, 125(2), 179-185.
- Shaltiel, G., Hanan, M., Wolf, Y., Barbash, S., Kovalev, E., Shoham, S., and Soreq, H. (2012). Hippocampal microRNA-132 mediates stress- inducible cognitive deficits through its acetylcholinesterase target. *Brain Structure & Function*, 218(1), 59-72.
- Shapira, M., Tur-Kaspa, I., Bosgraaf, L., Livni, N., Grant, A. D.,Grisaru, D.,Korner, M.,Ebstein, R.P.,and Soreq, H. (2000). A transcription- activating polymorphism in the ACHE promoter associated with acute sensitivity to anti-acetylcholinesterases. *Human Molecular Genetics*, 9(9), 1273–1281.
- Sheriff, M.J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., Boonstra, R. (2011). Measuring stress in wildlife, techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 166(4), 869–887.
- Shi, Y.B. (2000). *Amphibian metamorphosis*. Wiley-Liss, New York.
- Shuman-Goodier, M.E. y Propper, C.R. (2016). A meta-analysis synthesizing the effects of pesticides on swim speed and activity of aquatic vertebrates. *Science of the Total Environment*, 565, 758–766.
- Shutler, D. y Marcogliese, D.J. (2011). Leukocyte profiles of northern leopard frogs, *Lithobates pipiens*, exposed to pesticides and hematozoa in agricultural wetlands. *Copeia* 2, 301-307.
- Sibly, R.M. (1981). Strategies of digestion and defecation. In, C.R. Townsend, P. Calow, (Eds.), *Physiological Ecology, An Evolutionary Approach to Resource Use*. Blackwell, Oxford, pp. 109–139.

- Sievers, M., Hale, R., Swearer, S. E., Parris, K. M. (2018). Contaminant mixtures interact to impair predator-avoidance behaviours and survival in a larval amphibian. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 482-488.
- Sih, A. (1987). Predators and prey lifestyles, an evolutionary and ecological overview. In Sih, A. & W. C. Kerfoot (eds), *Predation, Direct and Indirect Impacts on Aquatic Communities*. University Press of New England, Hanover, 203–224.
- Sih, A. y Moore, R.D. (1993). Delayed hatching of salamander eggs in response to enhanced larval predation risk. *American Naturalist*, 142(6), 947- 960.
- Sistema de Información Simplificado Agrícola (SISA). (2021).”SOJA.2020.2021” (consultado Febrero 2022).
- Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA) y Organización de las Naciones Unidas. (2019). Nueva York y Ginebra, Octava edición. ISBN, 978-92-1-117201-0
- Skelly, D.K. (1992). Field evidence for a behavioral antipredator response in a larval amphibian. *Ecology*, 73(2), 704-708.
- Skelly, D.K. (1994) Activity level and the susceptibility of anuran larvae to predation. *Animal Behavior*. 47(2), 465-468.
- Smith, D.C. (1987). Adult recruitment in chorus frogs, effects of size and date at metamorphosis. *Ecology*, 68(2), 344 - 350.
- Smith, D.C. y Van Buskirk, J. (1995). Phenotypic design, plasticity and ecological performance in two tadpole species. *American Naturalist*, 145(2), 211- 233.
- Smith, G.R. (2001). Effects of acute exposure to a commercial formulation of glyphosate on the tadpoles of two species of anurans. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(4), 0483–0488.
- Smith-Gill, S.J. y Berven, K.A. (1979). Predicting amphibian metamorphosis. *The American Naturalist*, 113(4), 563-585.
- SMN, (2022). Servicio Meteorológico Nacional. <https://www.smn.gob.ar/>
- Sokolova, I.M. (2013). Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and Comparative Biology*, 53(4), 597–608.

- Solomon, K.R. y Thompson, D.G. (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.
- Solomon, K., Anadón, A., Carrasquilla, G., Cerdeira, A., Marshall, J., Sanin, L.H. (2007). Coca and poppy eradication in Colombia, Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 190, 43-125.
- Soloneski, S., Ruiz de Arcaute, C., Larramendy, M.L. (2016). Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba- and glyphosate-based commercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae) late-stage larvae. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(17), 17811–17821.
- Soreq, H. y Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience* 2(4), 294–302
- Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A., Krest, S.K. (2010). *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Spencer, R.L., Kalman, B.A., Dhabhar, F.S. (2001). Role of endogenous glucocorticoids in immune system function, regulation and counterregulation. En *Handbook of Physiology, Section 7, The Endocrine System, Coping with the Environment, Neural and Endocrine Mechanisms, Vol. IV* (ed. B. S. McEwen and H. M. Goodman), pp. 381-423. New York, NY, Oxford University Press.
- Spinelli, V., Ceci, A., Dal Bosco, C., Gentili, A., Persiani, A.M. (2021). Glyphosate-eating fungi, study on fungal saprotrophic strains' ability to tolerate and utilise glyphosate as a nutritional source and on the ability of *Purpureocillium lilacinum* to degrade it. *Microorganisms*, 9(11), 2179.
- Stauffer, H.P. y Semlitsch R.D. (1993). Effects of visual, chemical and tactile cues of fish on the behavioural responses of tadpoles. *Animal Behaviour* 46(2), 355-364.
- Steiner, U.K. y Van Buskirk, J. (2009). Predator-induced changes in metabolism cannot explain the growth/predation risk tradeoff. *PLoS one*, 4(7), e6160.
- Stellin, F., Gavinelli, F., Stevanato, P., Concheri, G., Squartini, A., Paoletti, M.G. (2018). Effects of different concentrations of glyphosate (Roundup 360®) on earthworms (*Octodrilus complanatus*, *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa*) in vineyards in the North-East of Italy. *Applied Soil Ecology*, 123, 802-808.

- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, Neil A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306 (5702), 1783–1786.
- Sturm, A., de Assis, H.C., Hansen, P.D. (1999). Cholinesterases of marine teleost fish, enzymological characterization and potential use in biomonitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*, 47(4), 389-398.
- Sullivan, R.M. y Gratton, A. (1998). Relationships between stress-induced increases in medial prefrontal cortical dopamine and plasma corticosterone levels in rats, role of cerebral laterality. *Neuroscience*, 83(1), 81–91.
- Szelenyi, J.G., Bartha, E., Hollan, S.R. (1982). Acetylcholinesterase activity of lymphocytes, An enzyme characteristic of T-cells. *British Journal of Haematology*, 50(2), 241-245.
- Taha, B. y Mohammed, R. (2021). Morphological, Histological Changes and Acetyl Cholinesterase Activity in Chicken Embryos After Exposure to Abamectin Insecticide. *Journal of Life and Bio Sciences Research*, 2(2), 64-69.
- Takahara, T., Kohmatsu, Y., Maruyama, A., Yamaoka, R. (2008) Benefit of suites of defensive behavior induced by predator chemical cues on anuran tadpoles, *Hyla japonica*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63(2), 235-240.
- Tarlow, E.M. y Blumstein, D.T. (2007). Evaluating methods to quantify anthropogenic stressors on wild animals. *Applied Animal Behaviour Science*, 102(3-4), 429–451.
- Tata, J.R. (2006). Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 246(1-2),10–20.
- Tayebati, S. K., Di Tullio, M. A., Amenta, F. (2004). Effect of treatment with the cholinesterase inhibitor rivastigmine on vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in rat brain. *Clinical and Experimental Hypertension*, 26(4), 363–373.
- Techer, R., Houde, M., Verreault, J. (2016). Associations between organohalogen concentrations and transcription of thyroid-related genes in a highly contaminated gull population. *Environment International*, 545–546, 289–298.
- Tejedo, M. (2003). El declive de los anfibios. La dificultad de separar las variaciones naturales del cambio global. *Munibe* 16, 20 - 43.
- Teplitsky, C., Plénet, S., Joly, P. (2003). Tadpole's responses to risk of fish introduction. *Oecologia* 134(2), 270 - 277.

- 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.
- Thenkabail, P.S., Teluguntla, P.G., Xiong, J., Oliphant, A., Congalton, R.G., Ozdogan, M., Gumma, M.K., Tilton, J.C., Giri, C., Milesi, C., Phalke, A., Massey, R., Yadav, K., Sankey, T., Zhong, Y., Aneece, I., and Foley, D. (2021). Global cropland-extent product at 30-m resolution (GCEP30) derived from Landsat satellite time-series data for the year 2015 using multiple machine-learning algorithms on Google Earth Engine cloud, U.S. Geological Survey Professional Paper 1868, 63 p.
- Thibaut, R. y Porte, C. (2004). Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 92(5), 485-494.
- Thomas, P., Rahman, M.S., Kummer, J.A., Lawson, S. (2006). Reproductive endocrine dysfunction in Atlantic croaker exposed to hypoxia. *Marine Environmental Research*, 62, S249-S252.
- Tietge, J.E., Holcombe, G.W., Flynn, K.M., Kosian, P.A., Korte, J.J., Anderson, L.E., Wolf, D.C., Degitz, S.J. (2005). Metamorphic inhibition of *Xenopus laevis* by sodium perchlorate, Effects on development and thyroid histology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(4), 926– 933.
- Tornabene, B.J., Hossack, B.R., Crespi, E.J., Breuner, C. W. (2021). Evaluating corticosterone as a biomarker for amphibians exposed to increased salinity and ambient corticosterone. *Conservation physiology*, 9(1), coab049.
- Torres, R., Kuemmerle, T., Zak, M.R. (2021). Changes in agriculture-biodiversity trade-offs in relation to landscape context in the Argentine Chaco. *Landscape Ecology*, 36(3), 703-719.
- Touchon, J.C. y Warkentin, K.M. (2008). Fish and dragonfly nymph predators induce opposite shifts in color and morphology of tadpoles. *Oikos* 117(4),634-640.
- Touchon, J.C y Vonesh, J.R. (2016). Variation in abundance and efficacy of tadpole predators in a Neotropical pond community. *Journal of Herpetology* 50(1), 113-119.
- Trenti, P.S., Gómez, S.E., Ferriz, R.A. (1999). Capacidad de natación en tres peces pampásicos. *Aprona*, 13(38), 2-9.



- Trotter, B., Ramsperger, A.F.R.M., Raab, P., Haberstroh, J., Laforsch, C. (2019). Plastic waste interferes with chemical communication in aquatic ecosystems. *Scientific reports*, 9(1), 1-8.
- Tsui, M.T.K. y Chu, L.M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations, comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52(7), 1189-1197.
- Úbeda, A.C. y Grigera, D. (2007). El grado de protección de los anfibios patagónicos de Argentina. *Ecología Austral*, 17(2), 269-279.
- Úbeda, A.C. (1998). Batracofauna de los Bosques Templados Patagónicos, un enfoque Ecogeográfico. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires. Buenos Aires. [i - xv] + 354 pp.
- Úbeda, A.C., Moncada, M., Kun, M., Jara, F. (2019). Primeros registros de depredación en condiciones naturales de renacuajos de *Hylorina sylvatica* Bell 1843 (Anura, Batrachylidae) por insectos acuáticos. *Boletín Chileno de Herpetología*, 6, 53-56.
- Uddin, M.K. (2018) Agrochemicals and Environmental Risks. *Environmental Policy and Law* 48(2), 91-96
- Ulzurrun, P.A. (2013). Manejo de Malezas Problema. Modos de acción herbicida. Eds, REM AAPRESID Dorrego 1639 - Piso 2, Oficina A – 2000, Rosario, Santa Fe, Argentina. / 2250-5350 [online]
- Uribe-Hernández, R., Juárez-Mendez, C.H., Montes Oca, M.A., Palacios-Vargas, J.G., Cutz-Pool, L., Mejía-Recarmier, B.E. (2010). Collembola (Hexapoda) as quality bioindicators of the hydrocarburans polluted soils in Southeastern Mexico. *Revista mexicana de Biodiversidad*. [online] 81(1), 153-162. ISSN 2007-8706.
- USEPA. (1986). United States Environmental Protect Agency. Pesticide fact sheet, glyphosate office of pesticide programs, EPA Publication No. 540/FS-88-124, Washington, DC, USA.
- USEPA. (1989). United States Environmental Protect Agency. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to aquatic organisms. US Environmental Protection Agency Report No. EPA/600/4-89/001.
- USEPA. (1991). United States Environmental Protect Agency. Methods for measuring the acute toxicity of effluent and receiving waters to freshwater and marine organisms, 4ta ed., Weber, C.I. EPA-600/4-90-027.

- USEPA. (2002). United States Environmental Protection Agency. Methods for evaluating wetland condition, using amphibians in bioassessments of wetlands. U.S. Office of Water, Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA. EPA-822-R-02-022.
- Vaira, M., Baldo, D., Barrasso, D., Barrionuevo, S., Basso, N., Blotto, B., Cairo, S., Cajade, R., Céspedes, J., Corbalán, V., Chilote, P., Duré, M., Falcione, C., Ferraro, D., Gutierrez, F., Junges, C.M., Lajmanovich, R., Lescano, J.N., Marangoni, F., Martinazzo, L., Marti, L., Moreno, L., Natale, G., 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 (Supl. 1), 131-159.
- Van Bruggen, A.H., He, M.M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K.C., Finckh, M.R., Morris Jr, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment*, 616-617, 255-268.
- Van Buskirk, J., McCollum, S.A. (2000a). Functional mechanisms of an inducible defence in tadpoles, morphology and behaviour influence mortality risk from predation. *Journal of Evolutionary Biology*, 13(2), 336-347.
- Van Buskirk, J., McCollum, S.A. (2000b). Influence of tail shape on tadpole swimming performance. *Journal of Experimental Biology*, 203(14), 2149- 2158.
- Van Buskirk, J. (2000). The costs of an inducible defense in anuran larvae. *Ecology*, 81(10), 2813 - 2821.
- Van Buskirk, J. (2002). A comparative test of the adaptive plasticity hypothesis, relationships between habitat and phenotype in anuran larvae. *American Naturalist*, 60(1), 87-102.
- Van Buskirk, J., Aschwanden, J., Buckelmuller, I., Reolon, S., Ruttiman, S. (2004). Bold tail coloration protects tadpoles from dragonfly strikes. *Copeia*, 3,599-602.
- Van Buskirk, J., Ferrari, M., Kueng, D., Näpflin, K., Ritter, N. (2011). Prey risk assessment depends on conspecific density. *Oikos*, 120(8), 1235-1239.
- Vasseur, P. y Cossu-Leguille, C. (2003) Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environmental International*, 28(8), 711-717.
- Vazquez, L. A., Rendón, M. Á., Díaz-Paniagua, C., Mestre, I. G. (2017). Variaciones entre especies de anfibios en sus respuestas morfológicas a la presencia de depredadores nativos e introducidos. *Ecosistemas*, 26(3), 32-38.

- Vazquez, F.J., Condomiña, C.B., Aronzon, C. (2020). Contaminantes ambientales emergentes, Toxicidad del lauril eter sulfato de sodio y el salbutamol sobre larvas de *Rhinella arenarum* y semillas de *Lactuca sativa*. *Perspectivas, Revista Científica de la Universidad de Belgrano*, 3(1), 116-127.
- Venturino, A., Rosenbaum, E., De Castro, A.C., Anguiano, O.L., Gauna, L., De Schroeder, T.F., Pechen de D'Angelo, A.M. (2003). Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers*, 8(3-4), 167 - 186.
- Venturino, A. y Pechen de D'Angelo, A.M. (2005) Biochemical targets of xenobiotics, biomarkers in amphibian ecotoxicology. *Applied Herpetology*, 2(3), 335 - 353.
- Vera Candiotti, M.F., Lavilla, E.O., Echeverría, D.D. (2004). Feeding mechanisms in two treefrogs, *Hyla nana* and *Scinax nasicus* (Anura, Hylidae). *Journal of Morphology*, 261(2), 206–224.
- Vera Candiotti, M.F. y Altig, R. (2010). A survey of shape variation in keratinized labial teeth of anuran larvae as related to phylogeny and ecology. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101(3), 609 - 625.
- Vera, M. S., Di Fiori, E., Lagomarsino, L., Sinistro, R., Escaray, R., Iummato, M. M., Pizarro, H. (2012). Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology*, 21(7), 1805–1816.
- Vera, M. S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Perez, G., Rodriguez, P., Mugni, H., Sinistro, R., Ferraro, M., Bonetto, C., Zagarese, H., Pizarro H. (2010) New evidences of Roundup (glyphosate formulation) impact on the periphyton and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19(4), 710–721.
- Viglizzo, E.F., Pordomingo, A. J., Castro, M.G., Lértora, F.A. (2003). Environmental assessment of agriculture at a regional scale in the Pampas of Argentina. *Environmental monitoring and assessment*, 87(2), 169-195.
- Volante, J.N. (2014). Dinámica y consecuencias del cambio en la cobertura y el uso del suelo en el Chaco Semi-árido. Tesis doctoral. Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. 168 pp.
- Walker, C.H. y Thompson, H.M. (1991). Phylogenetic distribution of cholinesterases and related esterases. En, *Cholinesterase inhibiting insecticides, their impact on wildlife and the environment*. (Ed., Mineau, P.), Vol II, Elsevier, New York, p. 1 - 18.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B. (2001). *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis, London, UK.

- Warkentin, K.M. (2011). Plasticity of hatching in amphibians, evolution, tradeoffs, cues and mechanisms. *Integrative and Comparative Biology*, 51(1), 111-127.
- Wassersug, R.J. (1973). Aspects of social behavior in anuran larvae. In, Vial JL, (ed.). *Evolutionary Biology of the Anurans*. Columbia, University of Missouri Press. p 273–297.
- Webber, N.R., Boone, M.D., Distel, C.A. (2010). Effects of aquatic and terrestrial carbaryl exposure on feeding ability, growth, and survival of American toads. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(10), 2323 - 2327.
- Wells, K.D. (2007). *The ecology and behavior of amphibians*. The University of Chicago Press, USA.
- Werner, E.E. (1986). Amphibian metamorphosis, growth rate, predation risk, and the optimal size at transformation. *American Naturalist*, 128, 319-341.
- Werner, E.E., Anholtm, B.R. (1993). Ecological consequences of the trade-off between growth and mortality-rates mediated by foraging activity, *American Naturalist*, 142(2), 242-272.
- Whalen, R. y Boyer, T.D. (1998). Human glutathione S-transferases. In *Seminars in liver disease*. Thieme Medical Publishers, Inc. 18(4), 345-358.
- Wheelock, C.E., Phillips, B.M., Anderson, B.S., Miller, J.L., Miller, M.J., Hammock, B.D. (2008). Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 195, 117-178.
- Widder, P.D. & Bidwell, J.R. (2008). Tadpole size, cholinesterase activity, and swim speed in four frog species after exposure to sub-lethal concentrations of chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology*, 88(1), 9-18.
- Wilbur, H.M. y Collins, J.P. (1973). Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science*, 182, 1305-1314.
- Wilbur, H.M. (1980). Complex life cycles. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 11, 67-93.
- Wilbur, H.M. (1997). Experimental ecology of food webs, complex systems in temporary ponds. The Robert H. MacArthur Award lecture. *Ecology*, 78(8), 2279-2302.
- Wilhm, J. L. (1975). Biological indicators of pollution. En Whitton, B.A., Ed., *River Ecology*, Blackwell Scientific Publication, Oxford, 375-402.

- Williams, B.K. y Semlitsch, R.D. (2010). Larval responses of three Midwestern anurans to chronic, low-dose exposures of four herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(3), 819-827.
- Wilson, R., Kraft, P., van Damme, R. (2005). Predator-specific changes in the morphology and swimming performance of larval *Rana lessonae*. *Functional Ecology* 19(2), 238-244.
- Wingfield, J.C. y Kitaysky, A.S. (2002). Endocrine responses to unpredictable environmental events, stress or anti-stress hormones. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 600-609.
- Wingfield, J.C., Breuner, C., Jacobs, J. (1997). Corticosterone and behavioral responses to unpredictable events. Pages 267-278 in S. Harvey & R. J. Etches (eds.). *Perspectives in Avian Endocrinology*. Journal of Endocrinology Ltd., Bristol.
- Wood, L. y Welch, A.M. (2015). Assessment of interactive effects of elevated salinity and three pesticides on life history and behavior of southern toad (*Anaxyrus terrestris*) tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(3), 667-676.
- Wright, M.L., Cykowski, L.J., Lundrigan, L., Hemond, K.L., Kochan, D.M., Faszewski, E.E., Anuszewski, C.M. (1994). Anterior pituitary and adrenal cortical hormones accelerate or inhibit tad-pole hindlimb growth and development depending on stage of spontaneous development or thyroxine concentration in induced metamorphosis. *Journal of Experimental Zoology*, 270(2), 175-188.
- Wyman, R.L. (1990). What is happening to the amphibians? *Conservation Biology*, 4(4), 350 - 352.
- Yamano, T. y Morita, S. (1995). Effects of pesticides on isolated rathepatocytes, mitochondria, and microsomes II. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 25(2):271-8
- Yang, Y., Jian, X., Tang, X., Ma, W., Sun, Z., Zhang, X., Zhang, X. (2021). Feeding behavior toxicity in the marine rotifer *Brachionus plicatilis* caused by 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47), Characteristics and mechanisms. *Chemosphere*, 271, 129512.
- Yang, Z.P., Morrow, J., Wu, A., Roberts II, L.J., Dettbarn, W.D. (1996). Diisopropylphosphorofluoridate-induced muscle hyperactivity associated with enhanced lipid peroxidation in vivo. *Biochemical pharmacology*, 52(2), 357-361.

- Zelditch, M.L., Swiderski, H.D., Sheets, H.D., Fink, W. L. (2004). *Geometric Morphometrics for Biologists, A Primer*. Elsevier Academic Press, San Diego, California.
- Zhang, W., Jiang, F., & Ou, J. (2011). Global pesticide consumption and pollution : with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 1(2), 125–144.
- Zimmerman, G., Soreq, H. (2006). Termination and beyond, acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 655–669.
- Zimmerman, G., Shaltiel, G., Barabash, S., Cohen, J., Gasho, C., Shenhar, S., Shalev, H., Berliner, S., Shelef, I., Shoham, S., Friedman, A., Cohen, H., Soreq, H. (2012). Post-traumatic anxiety associates with failure of the innate immune receptor TLR9 to evade the pro-inflammatory NFkB pathway. *Translational Psychiatry* 2, e78.
- Zoeller, R.T., Brown, T.R., Doan, L.L., Gore, A.C., Skakkebaek, N.E., Soto, A.M., Vom Saal, F.S. (2012). Endocrine-disrupting chemicals and public health protection, a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology*, 153(9), 4097-4110.