

Tesis Doctoral 2018

“Efectos de herbicidas sobre la diferenciación sexual de Leptodactylus latrans”

Lic. Nadia Carla Bach





UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

**“Efectos de herbicidas sobre la diferenciación sexual de
Leptodactylus latrans”**

Tesista

Lic. Nadia Carla Bach

Directores

Alicia E. Ronco

Gustavo M. Somoza

Codirector

Guillermo S. Natale

2018

Ilustración de tapa:
Lourdes Desmarchelier 2018
Acuarela y microfibra

*A mi abuela, ejemplo de amor y fortaleza y
principio de todo.*

*A mis padres, por el amor, la libertad y los
valores transmitidos...y por hacer siempre
todo posible.*

*A mi querida Nina, por su gran sabiduría y
por seguir enseñándome más allá de este
mundo.*

“Entonces un extraño agotamiento se extendió por la comarca y todo empezó a cambiar. Algún maleficio se había adueñado del lugar; misteriosas enfermedades destruyeron las aves de corral; los ovinos y las cabras enflaquecieron y murieron.

Por todas partes se extendió una sombra de muerte. Los campesinos hablaron de muchos males que aquejaban a sus familias. En la ciudad, los médicos estaban más y más confusos por nuevas afecciones que aparecían entre sus pacientes. Hubo muchas muertes repentinas e inexplicables, no solo entre los adultos, sino entre los niños que, de pronto, eran atacados por el mal mientras jugaban, y morían a las pocas horas.

Se produjo una extraña quietud. Los pájaros, por ejemplo... ¿dónde se habían ido? Mucha gente hablaba de ellos, confusa y preocupada. Los corrales estaban vacíos.

Las pocas aves que se veían estaban moribundas: temblaban violentamente y no podían volar. Era una primavera sin voces. En las madrugadas que antaño fueron perturbadas por el coro de gorriones, golondrinas, palomos, arrendajos y petirrojos, y otra multitud de gorjeos no se percibía un solo rumor; solamente el silencio se extendía sobre los campos, los bosques y las marismas.”

(Rachel Carson 1962, Primavera Silenciosa)

Agradecimientos

La realización de una tesis doctoral, es un proceso que lleva años de trabajo y durante el cual la vida nos atraviesa y nos puede cambiar por completo, incluso no una, sino varias veces. Esta sección de la Tesis está dedicada a todos aquellos que cambiaron y cambian mi vida cada día, que hicieron de mí la persona que soy, ayudándome a construir-me, y que de manera directa o indirecta contribuyeron significativamente en la realización de esta Tesis.

En primer lugar, quiero agradecer a Dios, por no dejarme nunca sola y por ser ese Gran Apoyo en los momentos más difíciles, y sobre todo por darme tanta Paz.

Al CONICET, y a todos los ciudadanos de este país, que hacen posible que los becarios podamos acceder a una educación de excelencia.

A mis directores, Nina, Gustavo y Guillermo.

A Nina, por haber sido un pilar fundamental para la realización de esta tesis, por tantos consejos, por su preocupación, por su tiempo. Por tirarme siempre para arriba, por no dejarme aflojar, por tanta ayuda, tantas palabras afectuosas, tantas palabras de ánimo. Por creer en mí. Por haber estado siempre presente. Por buscar siempre, siempre, siempre mi beneficio. Por regalarme tardes de té y tostadas con miel. Por compartir sus conocimientos conmigo, de la ciencia, y de la vida. Por haberme enseñado tanto... Nina, me hiciste mucha falta en esta última etapa y me resulta imposible expresar con palabras el gran vacío que sentí con tu partida. Lo difícil que todo se hizo al principio, pero poco a poco, retomar la escritura, revisar mis cuadernos y encontrar tus anotaciones...gracias, gracias, GRACIAS! mi agradecimiento hacia vos es INMENSO para que te llegue mi abrazo más allá de esta Vida.

A Gustavo, por su profesionalismo. Por abrirme las puertas de su laboratorio y por creer en mí. Por enseñarme acerca de la biología molecular. Y por sobre todas las cosas por su gran confianza y libertad. Por dejarme realizar esta tesis, de la manera que yo la hubiera hecho, y por mostrarme, con paciencia, mis errores. Especialmente por su apoyo y ayuda para continuar en este camino de la investigación, sobre todo en esta última etapa.

A Guillermo, por tantos años de trabajo. Por abrirme las puertas de su laboratorio, donde inicié mis primeros pasos en la investigación. Por enseñarme acerca de los anfibios. Por compartir sus conocimientos de estadística y ayudarme en cada diseño experimental. Por su tiempo, por su ayuda especialmente durante los monitoreos y experimentos, sobre todo durante el primer año de esta tesis, cuando parecía que este momento no llegaría nunca.

A mi familia,

En primer lugar a mis padres, Patricia y Antonio, por criarme con amor y libertad de elegir, por enseñarme, sobre todo, el significado de la verdad. Por su ayuda ENORME frente a todas las circunstancias de la vida. Por entender cada una de mis ausencias y llegadas tarde, aun en fechas especiales, porque “estaba con un ensayo”... por comprender mi inusual horario de trabajo. Por su gran comprensión y alegría en cada uno de mis logros. Por entender Siempre y no cuestionar Nunca mis decisiones, por hacer todo posible...los amo.

En segundo lugar, a mi esposo JuanMa. Gracias por llenar de luz mis días. Por enseñarme a ver las cosas desde otra perspectiva, ser mi sostén y apoyo, siempre. Gracias por compartir tu pasión conmigo, por enseñarme, escucharme y valorarme. Por tus palabras de ánimo, incansables. Gracias por creer en mí. Por tu inmensa generosidad y comprensión. Por todo el amor que me das, y por ponerme siempre en el primer lugar. Gracias por cada uno de tus abrazos, por la fuerza y por tu paciencia sobre todo en estas últimas semanas. Gracias por tantas risas, tanta compañía y tantos colores...

A mi queridísima abuela Elena, por el amor y enseñanzas transmitidos a través de los años. Por tanta dedicación y cuidado recibido. Por despertar siempre en mí una gran ternura y sonrisa, y por regalarme tantos recuerdos... sos un verdadero tesoro abú! Gracias por ser tan hermosa...

A mis hermanos, de menor a mayor, Erik, Ax, Cin, Bladi e Iván. A ellos gracias por su apoyo, por ser siempre una alegría encontrarnos. Por hacer tan divertidas nuestras reuniones familiares. Por las discusiones de sobremesa. Por estar siempre, más allá de la distancia, por hacerme extrañarlos, y por los reencuentros.

A mis cuñadas, Lore, Pao Y Mari, por hacer felices a mis hermanos y por quererme y hacer que las quiera como hermanas. Por las charlas "femeninas" y por su gran ayuda siempre que la necesité. A mi cuñado Daniel, por hacer feliz a mi hermana y por las charlas y mates compartidos. Y a todos ellos ¡por darme unos hermosos sobrinos!

A mis sobrinos, Mia, Maia, Milo, Juli, Beni, Laure, Santi, Baltha, Igor, Boris, Kequi y Anto. Por hacerme jugar y reír, por mostrarme su mundo y por hacerme olvidar de las responsabilidades de la vida adulta.

A mi familia política,

A mis suegros: Delia y Raúl, por aceptarme y quererme. Por compartir conmigo, estar presentes y pendientes a pesar de la distancia. Por recibirme como una hija más, y hacerme sentir cómoda en cada oportunidad.

A mis cuñados y primos políticos: ¡¡¡son muchos!!! No los voy a nombrar a cada uno, a todos ustedes les agradezco enormemente estar siempre presentes. Por las reuniones familiares, las risas y por hacerme sentir una más de la familia. ¡¡¡Gracias!!!

A mis amigas de la vida (en orden alfabético, jajaja), Anto, Flor, Mechi, Negra, Romi y Tami. Por la hermosa amistad construida a través de los años, por estar ¡SIEMPRE! en cada uno de mis logros y comprender mis ausencias y mis obligaciones. Por escucharme y aconsejarme a través de los años. Por su curiosidad e interés en cada una de las cosas que emprendo y por tanto amor y tantas cosas compartidas. Por ser cada encuentro, aunque esporádicos, una auténtica celebración. ¡Las quiero!

A mis amigas de la facu, Bel, Caro y Mari. Por compartir conmigo el gusto por la biología y acompañarme y bancarme durante ¡¡tantos años!! Por ser mi sostén, mis consejeras y mis oídos tantas veces. Por darme su apoyo siempre que lo necesite. Por tantas catarsis, discusiones y consultas estadísticas. Por por aceptarme tal como soy, por tantas risas, tantos recuerdos y por hacer mi vida más feliz. ¡Las quiero!

A mis amigas del doctorado, Pato y Leti. Gracias por tantos momentos compartidos, tantas catarsis, cervezas, y charlas. Tantas palabras de ánimo, tantas tristezas y tantas alegrías compartidas. Tantos nervios, historias, viajes...¡¡tanto aguante!! y ahora cada una en un punto distinto del país... ¡Que el trio motoneta no muera nunca, las quiero!

A toda la gente del CIMA, y en especial a mis compañeros de la Unidad 5, Caro, JuanMa, Sansi y Flor. Gracias por las horas compartidas en el subsuelo. Tantos ensayos, crías de larvas, salidas de campo, congresos y reuniones compartidas. Gracias por hacer más ameno el trabajo codo a codo, con música y mates de por medio. ¡¡Y compartiendo nuestro amor por este bellissimo grupo de vertebrados!!!

Un agradecimiento especial a Damián Marino por su colaboración en la medición de las soluciones stock y las soluciones de ensayo utilizadas en esta tesis.

A toda la gente del IIB-INTECH-Chascomús, especialmente a la gente de UBP: Han sabido formar un grupo muy lindo y auténtico y espero que nunca pierdan ese espíritu. Gracias por hacerme sentir una más del grupo, por la buena onda y el inmenso compañerismo, por ayudarme desinteresadamente ¡TANTAS VECES! Por las charlas, las risas, los almuerzos, los mates, los abrazos y festejos en cada PCR que salía bien y porque me llevo amigos de esta hermosa interacción! Gracias! A Oswal, Ane, Brian, Pame, Angie, y Christian. ¡Los voy a extrañar!

A Cari, por la ayuda INMENSA! por haberme enseñado todo lo que sé acerca de la histología. Por ayudarme a procesar muestras cuando las papas quemaban y los deadline apuraban. Por transmitirme con tanta paciencia tus conocimientos y por compartir conmigo charlas y mates. En fin, por facilitarme el tránsito por este camino. Mil gracias Cari!

Un especial agradecimiento a Leo Miranda, por su amabilidad y ayuda, por nuestras charlas sobre los anfibios y por los artículos facilitados!

¡A mi compañeros de viaje! Leo, Fede, Vale y Maru. Sin ustedes mis viajes no hubieran sido lo mismo. Gracias por divertirse con mis historias y desventuras y por hacerme reír de mis desgracias! Gracias por compartir conmigo horas de ruta, historias de vida y mates amargos rumbo al trabajo. ¡¡Y sobre todo por esperarme cada vez que me quedaba dormida!!

Un agradecimiento MUY ESPECIAL a mis Ayudantes de Campo! Rodrigo Bahamondez-Ardizi, Ayelen Alberti, Guido Belsito, Fede Oser, Emilia Arruti y el Gremlin. Muchas gracias por el esfuerzo durante los muestreos, las noches de verano en las charcas, los cielos estrellados y los momentos compartidos, han hecho más fácil y ameno mi trabajo de campo. Fue un gusto compartir con ustedes!

A mis amigos del “Centro”, por darme un lugar en sus vidas y por compartir la Fe conmigo. Especialmente a Lou, Agus, Noe, Marisel, Belu y Emi. Por tenerme presente y ¡por la paciencia cada vez que me tocaba decir que NO a cualquier plan que me proponían! Y a toda la familia del CSI: Gracias por su cariño, apoyo, y por la amistad construida, por las peñas, las charlas, las cenas, las juntadas... ¡Va a ser difícil encontrar amigos como ustedes! ¡Los voy a extrañar!

Al P. Elbio por sus consejos y por su guía que fueron fundamentales durante estos años. Por su paciencia, su tiempo, sus oraciones y ¡por aceptarme así de impuntual!

También quiero agradecer a mis tutores de tesis, el Dr. Javier Goldberg y la Dra. Lucrecia Ferrari. Por sus consejos, ayuda, y por compartir su experiencia en la temática.

Finalmente a los Jurados de Tesis, Dra. Leda Gianuzzi, Prof. Jorge Williams y Dra. Gladys Hermida. Por el tiempo tomado en la lectura y corrección de este manuscrito.

Publicaciones durante el desarrollo del doctorado

Publicaciones en revistas internacionales

1. **Bach Nadia**; Natale Guillermo; Somoza Gustavo y Ronco Alicia. 2016. Effect on growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American common frog, *Leptodactylus latrans*. *Environmental Science and Pollution Research*; 23:23959-23971. DOI 10.1007/s11356-016-7631-z.
2. Militello M.; **Bach N.**; Pérez-Iglesias J.M. 2017. *Lithobates catesbeianus* (American Bullfrog). Argentina, Buenos Aires. *Geographic distribution. Herpetological Review*; 48:807.
3. **Bach N.C.**; Gullo B.; Pérez Iglesias J.M. 2016 y Natale G.S. 2017. *Rhinella fernandezae* (garden toad). Eggs and embryos predation by leeches. Natural History Notes. *Herpetological Review*; 49(2):309.
4. **Bach N.**; Marino D.J.; Natale G.S.; Somoza G.M. (2018). Effects of Glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the Neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (Amphibia: Anura). *Chemosphere*; 202:289-297. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.110

En actas de Congresos Internacionales

1. Rodríguez Fernández Silvia, **Bach Nadia**, Natale S. Guillermo, Carriquiriborde Pedro. 2015. Biological responses of the “Rana Criolla” (*Leptodactylus latrans*) inhabiting a sewage-effluent receiving aquatic ecosystem of Argentina. Libro de resúmenes del SETAC Europe 25th annual meeting.
2. **N.C. Bach**; López G.C.; Natale G.S.; Ronco A.E. & Somoza G.M. 2015. Effects of Glyphosate and Roundup® Ultramax formulation on liver histology of *Leptodactylus latrans* tadpoles (Amphibia: Anura). Libro de resúmenes del SETAC Latin América 11th biennial meeting.

En actas de congresos Nacionales

1. **Bach N. C.**, Herrera R. A. Isaldo D. I. & Natale G. S. 2012. Mortalidad de *Odontophrynus americanus* en una comunidad de anfibios. Libro de Resúmenes del XII Congreso Argentino de Herpetología.

2. **Bach N.C.**, Natale G.S., Somoza G.M., Ronco A.E. 2013. Efectos letales y subletales del herbicida atrazina sobre larvas de *Leptodactylus latrans*. Libro de resúmenes del XIV Congreso Argentino de Herpetología.
3. **Bach N.C.**, Natale G.S., Somoza G.M., Ronco A.E. 2013. Efectos letales y subletales del herbicida glifosato y formulado RoundUp@Ultramax sobre larvas de *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae). Acta Toxicologica Argentina. Libro de Resúmenes del XVIII Congreso Argentino de Toxicología. ISSN/ISBN: 0327-9286.
4. **Bach N.C.**, Bahamondez Ardizzi R., Somoza G.M. & Natale G.S. 2014. Variables morfométricas relacionadas con la condición reproductiva en una población de *Leptodactylus latrans* de la provincia de Buenos Aires. Libro de resúmenes del XV Congreso Argentino de Herpetología.
5. **Nadia C. Bach**, Guillermo S. Natale, Gustavo M. Somoza, Alicia E. Ronco. 2014. Efectos letales y subletales de glifosato y Roundup Ultramax en renacuajos de *Leptodactylus latrans*. Libro de resúmenes del V Congreso Argentino de Sociedad de Toxicología y Química Ambiental.
6. Jesica Sansiñena, **Nadia Bach**, Juan M. Pérez Iglesias, Damián J. Marino, Pedro Carriquiriborde, Guillermo S. Natale. 2014. Empleo de tres especies de anuros autóctonos como bioindicadores de la calidad ambiental en agroecosistemas con diferente intensidad agrícola. Libro de resúmenes del V Congreso Argentino de Sociedad de Toxicología y Química Ambiental.
7. **Bach NC**, Natale GS, Ronco AE & Somoza GM. 2015. Diferenciación morfológica gonadal en larvas y juveniles de *Leptodactylus latrans*. Libro de resúmenes del XVI Congreso Argentino de Herpetología.

ÍNDICE

Glosario	1
Resumen	5
Abstract.....	10
<i>Introducción general</i>	15
La expansión de la actividad agrícola.....	16
La problemática ambiental en el marco de la Ecotoxicología	19
Los bioensayos de toxicidad	21
Los anfibios como modelos de estudio en ecotoxicología	21
Los anfibios como bioindicadores de contaminación ambiental.....	23
Desarrollo gonadal en anfibios anuros	26
Objetivos.....	29
<i>Capítulo I</i>	1
“ <i>Biología reproductiva de Leptodactylus latrans.</i> ”	1
Introducción.....	38
La especie estudiada: Leptodactylus latrans	38
Inducción hormonal de la reproducción	43
Variables morfométricas como predictores del estado reproductivo	46
Hipótesis y objetivos	48
Metodología.....	49
Área de estudio	49
Monitoreo de poblaciones de anfibios y variables morfométricas asociadas a la reproducción	51
Inducción hormonal de la reproducción por método AMPHIPLEX	54
Análisis estadístico	60
Resultados	61
Monitoreo de poblaciones de anfibios y variables morfométricas asociadas a la reproducción	61
Inducción hormonal de la reproducción por método AMPHIPLEX	67
Discusión	75
<i>Capítulo II:</i>	81
“ <i>Desarrollo Gonadal de Leptodactylus latrans</i> ”	81
Introducción.....	82
Cría de anuros en cautiverio	82

Desarrollo gonadal en anfibios	85
Genes relacionados con la diferenciación sexual en anuros	90
Hipótesis y objetivos	92
<i>Metodología</i>	93
Obtención y cría de <i>Leptodactylus latrans</i> en cautiverio	93
Ensayos de supervivencia	93
Cría de <i>L. latrans</i> en cautiverio para el estudio del desarrollo gonadal	97
Técnicas para evaluación histológica de las gónadas	98
Caracterización del ADNc de genes indicadores de la diferenciación sexual de <i>L. latrans</i>	102
Análisis Estadístico	105
<i>Resultados</i>	106
Ensayos de supervivencia	106
Análisis morfo-histológico de las gónadas	113
Proporción de sexos en cada estadio	118
Secuencias de genes relacionados con la diferenciación sexual en anuros ...	123
<i>Discusión</i>	127
<i>Capítulo III:</i>	133
<i>“Efectos del glifosato sobre larvas de <i>Leptodactylus latrans</i>.”</i>	133
<i>Introducción</i>	134
El Glifosato	134
El glifosato en Argentina y el mundo	137
Efectos del glifosato en biota no blanco	137
Hipótesis y objetivos	142
<i>Metodología</i>	144
Bioensayos de Toxicidad	144
Preparación de las soluciones de exposición	144
Obtención de larvas de <i>L. latrans</i>	145
Diseño experimental: bioensayos de Toxicidad	145
Puntos finales letales	147
Puntos finales subletales	147
Análisis Estadístico	150
<i>Resultados</i>	152
Análisis Químico	152

Efectos letales agudos	152
Efectos subletales	155
<i>Discusión</i>	165
<i>Conclusiones finales</i>	176
BIBLIOGRAFIA	182
ANEXO I	213
ANEXO II. Planillas de relevo en campo	215
ANEXO III	220

Glosario

#ACC: número de acceso en GenBank (NCBI).

°C: grados centígrados

µg/g: microgramo/gramo

µg/L: microgramos/Litro

µl: microlitro

µm: micrómetros

µS/cm: microSiemens/centímetro

16L:8O: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad

A1: alimento balanceado para peces omnívoros en escamas (Shulet® Carassius)

A2: lechuga licuada

A3: solución de levadura en polvo (Levex®)

A4: hígado vacuno

A5: clara de huevo

A6: corazón vacuno

A7: mezcla de cada ítem alimenticio en partes iguales

ADNc: ADN copia

AMPA: ácido aminometilfosfónico

ARNm: ARN mensajero

c/a: con alimentación

CaCO₃: Carbonato de calcio

CE₅₀: Concentración efectiva para el 50% de la población

CG: peso de los cuerpos grasos

CL₁₀: Concentración letal para el 10% de la población

CL₅₀: concentración letal 50

CL₉₀: Concentración letal para el 90% de la población

cm: centímetros

Cond: conductividad en el agua de cada tanque reproductivo en mS/cm.

C-R: curvas concentración-respuesta

D1: 1 individuo/litro

D10: 10 individuos/litro

D15: 15 individuos/litro

D20: 20 individuos/litro

D30: 30 individuos/litro

D5: 5 individuos/litro

D50: 50 individuos/litro

DIOE: distancia inter-ocular externa

DV: diámetro del vientre

EPSPS : 5-enolpiruvilshykimato-3-fosfato sintasa

ES1: Ensayo de supervivencia N° 1

ES2: Ensayo de supervivencia N° 2

ES3: Ensayo de supervivencia N° 3

ES4: Ensayo de supervivencia N° 4

ES5: Ensayo de supervivencia N° 5

ES6: Ensayo de supervivencia N° 6

F0: sin alimentación

F1: alimentación cada 24 h

F2: alimentación cada 48 h

F3: alimentación cada 72 h

F4: alimentación una vez por semana

g/id: gramos por individuo

g: gramos

GC: grupo control

GLY: glifosato grado técnico 95,1% de pureza (Gleba)

GM: genéticamente modificados

GnRH-A: Análogo de la hormona liberadora de gonadotropina (des-Gly10, D-Ala6, Pro-LHRH)

Gs: Estadio según Gosner

h: horas

H: peso del hígado

i.a: ingrediente activo
ICG: índice de cuerpos grasos
ICR: índice de condición reproductiva
Id/L: individuos/Litro
IGS: índice gonadosomático
IHS: índice hepatosomático
IPTG: β -galactosidasa
J (1), (3) y (4): juveniles de 1, 3 y 4 semanas respectivamente
K: factor de condición corporal
L. latrans: *Leptodactylus latrans*
L: litros
LB: Medio Luria Broth
LC: Longitud del cuerpo (=LHC)
LC95%: Límites de confianza el 95%
LCI 95%: límite de confianza inferior del intervalo al 95%
LC-MS: cromatografía líquida-espectrometría de masas
LHC: longitud hocico-cloaca
LOEC: concentración más baja que produce efecto
LT: longitud total
m: metros
mg e.a./L: mg de equivalentes ácidos por litro
mg/kg: microgramos/kilogramo
mg/L: miligramos/Litro
min: minuto
ml: mililitros
mm: milímetros
mm²: milímetros cuadrados
MMC/mm²: centros de melanomacrófagos por milímetro cuadrado
MMc/mm²: melanomacrófagos por milímetro cuadrado
MMC: centros de melanomacrófagos
MMc: melanomacrófagos

mS/cm: miliSiemens/centímetro

N° de ID: Número de identificación asignado a cada ejemplar de *L. latrans*

NaCl: Cloruro de Sodio

NaOH: hidróxido de sodio

ND: efectos no detectados

NI: 0,01 g/individuo

NII: 0,02 g/individuo

NIII: 0,04 g/individuo

NOEC: concentración más alta que no produce efecto

OD: Oxígeno disuelto en el agua de cada tanque reproductivo

pb: pares de bases

PC: peso corporal

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PG: peso de la gónada

POEA: polioxietilen-alkil amina

Post-rep: Post-reproductivo

Rep: Reproductivo

RU: Roundup Ultramax® (Monsanto Argentina)

s/a: sin alimentación

Soja RR: Soja Roundup-Ready

StAR: proteína reguladora aguda esteroideogénica

T Agua: temperatura del agua

T Aire: temperatura del aire

Tanque Rep.: Tanque reproductivo.

TRB: receptor β de la hormona tiroidea

U.I.: Unidades de Insulina

v/v: Volumen en volumen

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Resumen

En los últimos años, la expansión de la frontera agrícola de la mano de la “nueva revolución verde” condujo a la adopción de nuevas tecnologías por parte de los productores agrícolas. La fragmentación del hábitat y la contaminación de los recursos por la aplicación de plaguicidas tienen efectos sobre la biodiversidad nativa, afectando sus poblaciones. Los anfibios anuros se encuentran en retroceso numérico y han sido clasificados como organismos bioindicadores de la calidad ambiental. Es conocido que algunos plaguicidas producen efectos en las gónadas de los anfibios, afectando de manera directa su reproducción, aspecto esencial para la supervivencia de las especies. En este contexto, el objetivo del presente trabajo de tesis doctoral fue estudiar el efecto del herbicida glifosato sobre la diferenciación gonadal de *Leptodactylus latrans*. En el primer capítulo, se desarrolló el estudio de la biología reproductiva de *L. latrans* con el objetivo de poner a punto el método de inducción artificial de la reproducción en esta especie. Para ello, se realizó un monitoreo continuo durante noviembre de 2013 y febrero de 2016, en cinco sitios de estudio previamente seleccionados con escasa perturbación. Con la intención de conocer la variación en las variables e índices morfométricos externos como predictores de la condición reproductiva, se colectaron machos y hembras adultos de *L. latrans* diferenciando en épocas reproductiva y post-reproductiva. Se registraron longitud hocico-cloaca (LHC), distancia inter-ocular externa (DIOE), diámetro del vientre (DV), peso corporal (PC), peso de la gónada (PG), de los cuerpos grasos (CG) y del hígado (H). Con estas variables, se calcularon los índices de condición corporal ($K = P/LHC^3$), de condición reproductiva ($ICR = DV/DIOE$), gonadosomático ($IGS = (G/P)*100$), de cuerpos grasos ($ICG = CG/P$), e índice hepatosomático ($IHS = (H/P)*100$). Asimismo, y con el objetivo de caracterizar y actualizar algunas condiciones propias del microhábitat de desove, así como parámetros de los nidos de espuma en poblaciones locales de *L. latrans*, se registró la profundidad del agua, forma, diámetro mayor y menor del nido, diámetro del orificio central, volumen del nido y número de huevos por desove (fecundidad). Se colectó un total de 102 individuos, 47 machos y 55 hembras. Los índices morfométricos externos que mostraron diferencias significativas entre hembras en condición reproductiva y post-reproductiva fueron el ICR ($p < 0,0001$) y el K ($p = 0,045$); aunque éste último con menor grado de significancia que el primero. De acuerdo a estos resultados, se determinó al valor promedio del ICR en el grupo reproductivo ($ICR = 2,53$), como el mínimo valor al cual las hembras se encuentran maduras para reproducirse, y en el cual la inducción hormonal de la reproducción podría resultar efectiva. No se observaron diferencias significativas al comparar las variables e índices morfométricos de los machos en condición reproductiva y post-reproductiva ($p > 0,005$). Se estudiaron un total de 36 nidos de espuma, de los cuales se obtuvo que los mismos son depositados en cuerpos de agua a una profundidad promedio de $10,24 \pm 3,91$ cm, y una temperatura de $25,61 \pm 1,2$ °C. Los nidos presentaron distinta morfología, resultando predominante la amorfa (68,75% de ocurrencia). El diámetro mayor promedio fue de $42,77 \pm 15,09$ cm, y el volumen promedio registrado de $880 \pm 775,6$ ml. La fecundidad promedio resultó de 23.236 ± 10.874 huevos. Como resultado adicional de los monitoreos, se puede destacar el hallazgo de nidos comunales y la actividad de machos satélite. Si bien el hallazgo de

machos satélite ya había sido previamente documentado en esta especie, los nidos comunales representan una novedad para la biología reproductiva de la especie, e incluso para el género *Leptodactylus*.

Con el objetivo de poner a punto el método de inducción hormonal de la reproducción en *L. latrans*, se realizaron cinco experimentos de inducción, en época estival, con individuos colectados de los sitios de estudio. Se utilizaron para los mismos distintos volúmenes de agua y naturaleza del sustrato, y se varió la utilización o no de un cebado previo a la inyección hormonal, que se realizó de acuerdo al método AMPHIPLEX. Las parejas fueron monitoreadas diariamente 1 a 3 veces por día, durante 96 horas, registrándose como variables biológicas la emisión del canto nupcial, observación de amplexos y presencia de desove o nido de espuma. Asimismo, se registraron variables fisicoquímicas dentro de los tanques reproductivos (temperatura del aire y del agua, concentración de oxígeno disuelto, conductividad, pH). Como resultado, se observó una inducción efectiva en los machos de *L. latrans* en los experimentos 1, 3 y 4, con una frecuencia de entre el 25 y 100%; mientras que para las hembras resultó efectiva solo en el experimento 4, con una ocurrencia del 25%, observándose un único evento de desove. El ICR de la hembra en que la inducción resultó efectiva fue de 2,67, lo que coincide con el rango de valor promedio de ICR en hembras reproductivas estudiadas en la naturaleza. Las condiciones físico-químicas en el desove coincidieron con las condiciones promedio registradas en la naturaleza (prof: 10 cm, Tagua: 26 °C). En resumen, en este primer capítulo, los monitoreos de campo permitieron determinar y actualizar algunas condiciones propias del micro-hábitat de desove, y parámetros de los nidos de espuma, que resultaron de utilidad para poner a punto el método de inducción artificial de la reproducción. El ICR permitió distinguir entre hembras reproductivas y no-reproductivas en *L. latrans*. Los valores de ICR, permitieron seleccionar hembras en condición reproductiva, resultando en una inducción exitosa en una hembra con ICR en el rango del promedio. Finalmente, estos resultados representan el punto de partida para la puesta a punto de la inducción hormonal de la reproducción en cautiverio.

En el capítulo II, se propuso caracterizar el proceso de desarrollo gonadal de *L. latrans* desde el punto de vista morfológico, e histológico. En ese sentido, fue necesario establecer un método de mantenimiento para la especie en cautiverio. Se realizaron 6 experimentos evaluando distintas densidades, tipos de alimento, frecuencia de alimentación y cantidad de alimento per cápita. Como puntos finales se evaluó la supervivencia, crecimiento y desarrollo. Los resultados indicaron que la mayor supervivencia se observó en las densidades de 5 y 10 individuos/L (id/L) ($p < 0,05$), mientras que densidades de 1 id/L resultaron con mortalidad a las pocas horas de iniciados los experimentos. El alimento balanceado para peces (Shulet®), en cantidad de 0,04 g/individuo y la frecuencia de alimentación cada 24 horas, fueron las condiciones que mostraron en una mayor supervivencia ($p < 0,05$). Las condiciones que resultaron en un mayor crecimiento de los individuos fueron el alimento balanceado para peces y una densidad de 5 id/L ($p < 0,05$), mientras que para el desarrollo, las diferencias se observaron solamente en el factor densidad, con un mayor desarrollo en los individuos mantenidos en la condición de 5 id/L ($p < 0,05$). Estos resultados permitieron establecer un protocolo de mantenimiento de la especie en cautiverio

para llevar a cabo el estudio del desarrollo gonadal desde etapas tempranas del desarrollo, considerando el punto de vista morfológico e histológico. Para tal fin, se realizaron extracciones de porciones de nidos de espuma de *L. latrans* en los sitios de estudio previamente mencionados. Una vez eclosionadas las larvas, fueron mantenidas bajo condiciones controladas en densidad de 10 Id/L, como alimento se suministró lechuga licuada y alimento balanceado para peces en escamas. La frecuencia alimentaria fue cada 24 h y se realizaron recambios del agua una vez por semana. Una vez que las larvas alcanzaron el estadio 42 de Gosner (Gs42), fueron transferidas a bateas conteniendo un fondo de agua y colocadas en pendiente. A partir de este estadio, se eliminó el suministro de alimento. En el Gs45, los individuos fueron transferidos a cámaras individuales con un fondo de agua, donde permanecieron hasta el estadio de juvenil. En el Gs46 se reanuda la alimentación, suministrando larvas de *Tenebrio molitor*. Se extrajeron muestras periódicas de larvas con el fin de obtener individuos (N=10) de cada estadio larval. Las larvas extraídas fueron anestesiadas en solución de benzocaína, decapitadas, fijadas en solución Bouin y conservadas en etanol 70°. Previo a la eutanasia se registraron peso, LHC, LT y Gs. Se disecó complejo riñón-gónada, el cual fue procesado mediante técnicas de histología clásica y cortado serialmente. Se procesaron un total de 89 individuos entre los estadios de Gs25 hasta juveniles de 4 semanas post-metamorfosis. A nivel microscópico, se pudo determinar un estado de gónada indiferenciada desde el Gs25 hasta el Gs35 inclusive. A partir del Gs36 comenzó a observarse la delimitación de una región cortico-medular, correspondiéndose con una diferenciación ovárica, mientras que las gónadas que no muestran esta diferenciación permanecieron como gónadas indiferenciadas (testículo presuntivo). En el Gs40 se observó el primer indicio de diferenciación testicular, como una medula de células germinales, sin corteza, que comienzan a agruparse formando cistos. Los lóbulos seminíferos se hacen evidentes en juveniles de 4 semanas post-metamorfosis. En resumen, *L. latrans* resultó una especie gonocórica con un patrón de diferenciación sexual de tipo “indiferenciado”. La tasa de diferenciación del ovario de *L. latrans* fue de tipo acelerada, mientras que la tasa de diferenciación testicular fue de tipo retardada. La proporción de sexos observada fue de aproximadamente 50:50, con variaciones en algunos estadios.

En el capítulo III se estudiaron los efectos del herbicida glifosato sobre larvas de *L. latrans*. En tal sentido, se realizaron bioensayos de toxicidad aguda (96 h de exposición) con el objetivo de evaluar los efectos letales y subletales del herbicida Roundup Ultramax (RU) y del glifosato grado técnico (GLY) en larvas de *L. latrans* en dos estadios del desarrollo, Gs25 y Gs36. Se colectaron nidos de espuma, que fueron mantenidos bajo condiciones controladas hasta alcanzar el estadio requerido para el inicio de los experimentos. Para el Gs25, se evaluaron 23 concentraciones de RU (0,0007-9,62 mg e.a./L) y 7 concentraciones de GLY (3-300 mg/L), más un grupo control. Todos los tratamientos se evaluaron con dos variantes, con y sin alimentación. Para el Gs36, se evaluaron 7 concentraciones de RU (0,37-9,62 mg e.a./L) y 7 de GLY (3-300 mg/L), más un grupo control. Las larvas Gs36 no fueron alimentadas durante el bioensayo. Todos los tratamientos, tanto para Gs25 como Gs36, se evaluaron por cuadruplicado, bajo una densidad de 10 id/L. Como puntos finales se evaluó la mortalidad y actividad natatoria (cada 24 h), crecimiento (LHC), desarrollo (Gs),

anormalidades morfológicas e histopatología hepática (a las 96 h). Como resultado, se pudo observar que las larvas Gs25 del bioensayo sin alimentación no superaron las 72 horas de exposición, en ninguno de los tratamientos (incluido el control); por lo que el alimento resulto un factor clave para el desarrollo de los experimentos en *L. latrans*. Las CL50 a las 24, 48, y 72 h de RU para larvas Gs25 con y sin alimentación no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$), lo que indica que el suministro de alimento no interfiere con la toxicidad del compuesto en los tiempos evaluados. La CL50 (96 h) de RU para larvas Gs25 fue de 3,26 (3,04-3,43) mg e.a./L; mientras que para Gs36 fue de 8,67 (8,12-9,28) mg e.a./L. Asimismo, se observó que en larvas Gs25 la concentración letal incipiente de RU se alcanzó a las 72h de exposición. Por otro lado, el GLY no mostro efectos letales en ninguno de los bioensayos, tanto con larvas Gs25 como Gs36. Finalmente, el formulado RU resulto ligeramente tóxico (clase III), y el GLY como prácticamente no tóxico (clase IV) según categorías de toxicidad para organismos acuáticos de la US EPA. En lo que respecta a los efectos subletales, pudo observarse que para larvas Gs25 el RU indujo aceleración del desarrollo y crecimiento a partir de los 0,007 y 0,37 mg e.a./L, respectivamente. Ambos tipos de efectos también fueron observados en larvas Gs25 expuestas a GLY, a partir de 15 mg/L, ambos. Asimismo, se observaron efectos de anormalidades morfológicas por exposición a RU y GLY en ambos estadios larvales, a partir de los 2,96 mg e.a./L de RU para Gs25 y 2,22 mg e.a./L de RU para Gs36. Por otra parte, para el caso del GLY, las anormalidades se observaron a partir de los 30 mg/L en ambos estadios larvales. A nivel general, las anormalidades observadas fueron la presencia de edemas y anormalidades orales (pérdida de la mandíbula inferior o superior, anormalidades en crestas dentarias y la pérdida de queratodontes). Finalmente, también se observaron efectos en la actividad natatoria en larvas de Gs36 expuestas a RU, a partir de los 5,18 mg e.a./L. Los resultados de la histopatología hepática con larvas Gs36 mostraron un aumento en el número de melanomacrófagos/área en la concentración más baja de RU (0,37 mg e.a./L) y las dos concentraciones más altas de GLY (75 y 300 mg/L). Por otro lado, el número de centros de melanomacrófagos/área resulto significativamente elevado en las concentraciones de 0,37 y 0,74 mg e.a./L de RU y en la concentración de 300 mg/L de GLY. Finalmente, se observaron otras patologías hepáticas como la infiltración, congestión y lipidosis en larvas expuestas a ambos compuestos, observándose diferencias significativas a partir de los 2,22 mg e.a./L de RU para la congestión y lipidosis. El aumento MMc y MMC indican un aumento en la actividad fagocítica y un aumento en la actividad citoprotectora de la melanina. Además, MMc y MMC muestran una curva dosis-respuesta no-monótona y desaparición de efectos a concentraciones de RU elevadas, con aparición de daño hepático.

Con el objetivo de explorar los posibles efectos de perturbación endócrina (Ej: alteración en la proporción de sexos) producidas por la exposición de larvas de *L. latrans* al herbicida RU y a GLY, se realizó un bioensayo de toxicidad con larvas Gs34 a dos concentraciones subletales de 0,37 mg e.a./L de RU y 100 mg/L de GLY, más un grupo control. Todos los tratamientos fueron evaluados por triplicado y bajo una densidad de 10 id/L. El tiempo de exposición fue de 14 días, durante los cuales las larvas fueron alimentadas con alimento balanceado para peces (Shulet®) cada 24 h, previo a la renovación del medio de ensayo. Los puntos finales evaluados fueron

crecimiento (LHC y PC), desarrollo (Gs) e histología gonadal (relación sexos), determinándose cuatro estados de diferenciación sexual: Macho, Hembra, Intersexo y gónada indiferenciada. Los resultados no mostraron efectos ($p > 0,05$) en el crecimiento ni desarrollo de las larvas tratadas respecto al grupo control. En lo que respecta a la relación de sexos por histología gonadal, se pudo observar en el grupo control una relación de sexos 50:50 (macho/hembra), en el grupo tratado con GLY una relación de 40:60 y en el grupo tratado con RU de 30:70. Si bien estos datos no resultaron estadísticamente significativos ($p > 0,05$), pudo observarse una tendencia a la feminización en los grupos expuestos a glifosato bajo ambas formas, siendo más pronunciado en el caso del RU. Estos resultados podrían ser indicadores de un posible efecto estrogénico por parte del RU y del GLY sobre las larvas de anfibios. En este sentido, sería necesario ampliar los estudios de este trabajo de Tesis, incluyendo las mediciones de la expresión génica de genes obtenidos para su utilización como biomarcadores de diferenciación sexual en ensayos ecotoxicológicos.

Abstract

In recent years, the expansion of the agricultural frontier in the hand of the "new green revolution" led to the adoption of new technologies by agricultural producers. Habitat fragmentation and pollution of resources by the application of pesticides have effects on biodiversity, affecting their populations. Amphibian's populations are in numerical regression and have been classified as bioindicators of environmental quality. It is known that some pesticides produce effects in the gonads of amphibians, affecting their reproduction, an essential aspect for the survival of the species. In this context, the aim of the present doctoral thesis was to study the effect of glyphosate herbicide on the gonadal differentiation of *Leptodactylus latrans*.

In the first chapter, the study of the reproductive biology of *L. latrans* was developed in order to fine-tune an artificial induction of reproduction method in this species. For this, continuous monitoring was carried out during November 2013 and February 2016, in five previously selected study sites with little disturbance. With the intention of knowing the variation in the external morphometric variables and indices as predictors of the reproductive condition, adult males and females of *L. latrans* were collected in reproductive and post-reproductive periods. The snout-venth length (LHC), external inter-ocular distance (DIOE), belly diameter (DV), body weight (PC), gonad weight (PG), fatty bodies weight (CG) and liver weight (H) were recorded. With these variables, the indices of body condition ($K = P / LHC^3$), of reproductive condition (ICR) = $DV / DIOE$, gonadosomatic index (IGS) = $(G / P) * 100$, fat body index (ICG) = CG / P , and hepatosomatic index (IHS) = $(H / P) * 100$, were calculated. Likewise, and with the aim of characterizing and updating certain conditions of the spawning micro-habitat, as well as parameters of the foam nests in local populations of *L. latrans*, the water depth, shape, major and minor diameter of the nest, diameter of the central hole, volume of the nest and number of eggs per spawning (fecundity) were recorded. A total of 102 frogs, 47 males and 55 females were collected. The external morphometric indices that showed significant differences between females in reproductive and post-reproductive condition were the ICR ($p < 0.0001$) and K ($p = 0.045$); although the latter with a lower degree of significance than the first. According to these results, the average value of the ICR in the reproductive group (ICR = 2.53) was determined as the minimum value at which the females are mature to reproduce, and in which the hormonal induction of reproduction could be effective. No significant differences were observed when comparing the morphometric variables and indices of males in reproductive and post-reproductive condition ($p > 0.005$). A total of 36 foam nests were studied, from which it was obtained that they are deposited in bodies of water at an average depth of 10.24 ± 3.91 cm, and a temperature of 25.61 ± 1.2 ° C. The nests presented different morphology, the amorphous being predominant (68.75% of occurrence). The average largest diameter was 42.77 ± 15.09 cm, and the average recorded volume of 880 ± 775.6 ml. The average fecundity resulted from $23,236 \pm 10,874$ eggs. As an additional result of the monitoring, we can highlight the finding of communal nests and the activity of satellite males. Although the finding of satellite males had already been previously documented in this species, communal nests represent a novelty for the reproductive biology of the

species, and even for the genus *Leptodactylus*.

In order to fine-tune the method of hormonal induction of reproduction in *L. latrans*, five induction experiments were carried out in summer, with individuals collected from the study sites. During the experiments, different volumes of water and nature of the substrate were used, plus the implementation or not of a priming prior to hormonal injection, which was performed according to the AMPHIPLEX method. The experimental couples were monitored daily 1 to 3 times per day, for 96 hours, registering as biological variables: emission of reproductive vocalizations, observation of amplexes and presence of spawning or foam nest. Likewise, physicochemical variables were recorded within the reproductive tanks (air and water temperature, dissolved oxygen concentration, conductivity, pH). As a result, an effective induction was observed in *L. latrans* males in experiments 1, 3 and 4, with a frequency between 25 and 100%; while for females it was effective only in experiment 4, with an occurrence of 25%, observing a single spawning event. The ICR of the female in which the induction was effective was 2.67, which corresponds to the average value range of ICR in reproductive females studied in the wild. The physicochemical conditions in the experimental spawning coincide with the average conditions recorded in nature (depth: 10 cm, water temperature: 26 ° C). In summary, in this first chapter, the field monitoring allowed to determine and update some conditions typical of the micro-habitat of spawning, and parameters of the foam nests, which were useful for tuning the method of artificial induction of reproduction. The ICR allowed to distinguish between reproductive and non-reproductive females in *L. latrans*. The ICR values, allowed to select females in reproductive condition, resulting in a successful induction of spawning in a female with ICR in the average range. Finally, these results represent the starting point for the tuning of the hormonal induction of reproduction of *L. latrans* in captivity.

In chapter II, it was proposed to characterize the process of gonadal development of *L. latrans* from the morphological and histological point of view. In that sense, it was necessary to establish a maintenance method for the species in captivity. Six experiments were carried out evaluating different densities, types of food, feeding frequency and quantity of food per capita. As endpoints, survival, growth and development were evaluated. The results indicated that the greatest survival was observed in the densities of 5 and 10 individuals/L (id/L) ($p < 0.05$), while densities of 1 id/L resulted in mortality within a few hours from the beginning of the experiments. The balanced fish feed (Shulet®), in an amount of 0.04 g/individual and the feeding frequency every 24 hours, were the conditions that showed a greater survival ($p < 0.05$). The conditions that resulted in a higher growth of the larvear were balanced fish feed and a density of 5 id/L ($p < 0.05$), while for the development, the differences were observed only in the density factor, with a greater development in larvae maintained in the condition of 5 id/L ($p < 0.05$). These results allowed establishing a protocol for the maintenance of the species in captivity to carry out the study of gonadal development from early stages of development, considering the morphological and histological point of view. To that end, extractions of portions of *L. latrans* foam nests were performed at the aforementioned study sites. Once the larvae hatched, they

were kept under controlled conditions at a density of 10 Id/L, as food was supplied liquefied lettuce and balanced feed for fish (Shulet®). The food frequency was every 24 hours and water changes were made once a week. Once the larvae reached Gosner stage 42 (Gs42), they were transferred to plastic chambers containing a bottom of water and placed on a slope. From this stage, the food supply was eliminated. In Gs45, the individuals were transferred to individual chambers with a water bottom, where they remained until the juvenile stage. In the Gs46 the feeding restarted, supplying larvae of *Tenebrio molitor*. Periodic samples of larvae and juveniles were extracted in order to obtain individuals (N=10) from each larval stage. The extracted larvae were anesthetized in benzocaine solution, decapitated, fixed in Bouin solution and preserved in 70 ° ethanol. Prior to euthanasia, weight, LHC, LT and Gs were recorded. Kidney-gonad complex was dissected, which was processed using classical histology techniques and were serially cutted. A total of 89 individuals were processed between stages of Gs25 until juveniles of 4 weeks post-metamorphosis. At the microscopic level, an undifferentiated gonad state could be determined from Gs25 to Gs35 inclusive. From the Gs36 the delimitation of a cortico-medullary region began to be observed, corresponding to an ovarian differentiation, while the gonads that do not show this differentiation remained as undifferentiated gonads (presumptive testis). In Gs40, the first sign of testicular differentiation was observed, as a core of germ cells, without cortex, which begin to cluster forming cysts. The seminiferous lobes become evident in juveniles of 4 weeks post-metamorphosis. In summary, *L. latrans* was a gonocoric species with a pattern of "undifferentiated" sexual differentiation. The differentiation rate of the *L. latrans* ovary was accelerated, while the testicular differentiation rate was delayed. The sex ratio observed was approximately 50:50, with variations in some stages.

In Chapter III the effects of the herbicide glyphosate on *L. latrans* larvae were studied. In this sense, bioassays of acute toxicity (96 hours of exposure) were performed with the objective of evaluate the lethal and sublethal effects of the herbicide Roundup Ultramax (RU) and of technical grade glyphosate (GLY) in *L. latrans* larvae in two stages of development, Gs25 and Gs36. Foam nests portions were collected, which were kept under controlled conditions until reaching the stage required for the start of the experiments. For Gs25, 23 concentrations of RU (0.0007-9.62 mg a.e./L) and 7 concentrations of GLY (3-300 mg/L), plus a control group were evaluated. All treatments were evaluated with two variants, with and without feeding. For Gs36, 7 concentrations of RU (0.37-9.62 mg a.e./L) and 7 of GLY (3-300 mg/L), plus a control group were evaluated. The Gs36 larvae were not fed during the bioassay. All treatments, for both Gs25 and Gs36, were evaluated in quadruplicate, under a density of 10 id/L. As endpoints, mortality and swimming activity (every 24 h), growth (LHC), development (Gs), morphological abnormalities and liver histopathology (at 96 h) were evaluated. As a result, it was observed that the Gs25 larvae of the bioassay without feeding did not survive the 72 hours of exposure, in any of the treatments (including control); reason why the food was a key factor for the development of the experiments in *L. latrans*. The LC50 at 24, 48, and 72 h of RU for Gs25 larvae with and without feeding showed no significant differences ($p > 0.05$), indicating that food supply does not interfere with the toxicity of the compound in the times evaluated. The LC50_(96 h)

of RU for Gs25 larvae was 3.26 (3.04-3.43) a.e./L; while for Gs36 it was 8.67 (8.12-9.28) mg a.e./L. Likewise, it was observed that in Gs25 larvae the incipient lethal concentration of RU was reached at 72 h of exposure. On the other hand, GLY did not show lethal effects in any of the bioassays, with both Gs25 and Gs36 larvae. Finally, the RU formulated resulted slightly toxic (class III), and the GLY as practically non-toxic (class IV) according to toxic categories for aquatic organisms of the US EPA. With regard to the sublethal effects, it could be observed that for Gs25 larvae the RU induced acceleration of development and growth from 0.007 and 0.37 mg a.e./L, respectively. Both types of effects were also observed in Gs25 larvae exposed to GLY, starting at 15 mg/L, both. In addition, effects of morphological abnormalities were observed by exposure to RU and GLY in both larval stages, starting at 2.96 mg a.e./L of RU for Gs25 and 2.22 mg a.e./L of RU for Gs36. On the other hand, in the case of GLY, abnormalities were observed starting at 30 mg/L in both larval stages. In general, the abnormalities observed were the presence of edemas and oral abnormalities (loss of the lower or upper jaw, abnormalities in dental ridges and the loss of keratodonts). Finally, effects on swimming activity were also observed in Gs36 larvae exposed to RU, starting at 5.18 mg a.e./L. The results of hepatic histopathology with Gs36 larvae showed an increase in the number of melanomacrophages/area in the lowest concentration of RU (0.37 a.e./L) and the two highest concentrations of GLY (75 and 300 mg/L). On the other hand, the number of melanomacrophage centers/area was significantly elevated in the concentrations of 0.37 and 0.74 mg a.e./L of RU and in the concentration of 300 mg/L of GLY. Finally, other liver pathologies were observed such as infiltration, congestion and lipidosis in larvae exposed to both compounds, with significant differences observed from 2.22 mg a.e./L of RU for congestion and lipidosis. The increase MMc and MMC indicate an increase in phagocytic activity and in the cytoprotective activity of melanin. In addition, MMc and MMC show a non-monotonic dose-response curve and disappearance of effects at high concentrations of RU, in which liver damage effects appeared.

In order to explore the possible effects of endocrine disturbance (alteration in the sex ratio) produced by the exposure of *L. latrans* larvae to the herbicide RU and to GLY, a toxicity bioassay with Gs34 larvae was performed at two sublethal concentrations of 0.37 mg a.e./L of RU and 100 mg/L of GLY, plus a control group. All treatments were evaluated in triplicate and under a density of 10 id/L. The exposure time was 14 days, during which the larvae were fed with balanced fish feed (Shulet®) every 24 h, prior to the renewal of the test medium. The endpoints evaluated were growth (LHC and PC), development (Gs) and gonadal histology (sex ratio), determining four states of sexual differentiation: Male, Female, Intersex and undifferentiated gonad. The results showed no significant effects ($p > 0.05$) on the growth or development of the treated larvae with respect to the control group. Regarding the sex ratio by gonadal histology, a 50:50 sex ratio (male/female) was observed in the control group, in the group treated with GLY a ratio of 40:60 male/female was observed, and in the treated group with RU a ratio of 30:70 male/female. Although these data were not statistically significant ($p > 0.05$), a tendency to feminization could be observed in the groups exposed to glyphosate in both forms, being more pronounced in the case of the RU formulation. These results could be indicators of a possible estrogenic effect by RU and GLY on

amphibian larvae. In this sense, it would be necessary to expand the studies of this thesis, including measurements of gene expression of genes obtained for use as biomarkers of sexual differentiation in ecotoxicological tests.

Introducción general

La expansión de la actividad agrícola

La actividad agropecuaria en la República Argentina hasta fines la década del '80 estuvo basada fundamentalmente en el cultivo de maíz, trigo y girasol, así como en la producción de carne vacuna. Hasta ese momento, los avances tecnológicos se habían centrado sobre todo en el mejoramiento de las tareas más que en los rendimientos; por ejemplo, la cosecha ya se había mecanizado, pero la utilización de fertilizantes era poco frecuente (Reboratti 2010). La llamada “revolución verde” trajo entonces nuevos adelantos tecnológicos, principalmente la utilización de nuevas variedades con mayor rendimiento y la aplicación de agroquímicos, que mejoró sobre todo, la producción de trigo y maíz (Obstchatko 1988; Evenson 2003).

A partir de la década del 90 y hasta el año 2006, se registró un aumento de la superficie total cultivada en Argentina de aproximadamente un 45%, en coincidencia con la gran expansión del cultivo de soja, que fue paulatinamente reemplazando al trigo como cultivo dominante (Aizen y col. 2009). El cultivo de soja se siguió expandiendo en los últimos años en detrimento de la ganadería, debido entre otras cosas, a los altos precios internacionales y a la demanda creciente de aceite, alimento para animales y harina, por parte de algunos países europeos y asiáticos. La reciente aparición de un mercado para los biocombustibles fortaleció aún más el precio de la soja (Reboratti 2010; Carrasco y col. 2012).

La expansión sojera acarrió consigo la adopción de nuevas tecnologías por parte de los productores agrícolas. Particularmente, la llamada “nueva revolución verde” introdujo la implementación de semillas genéticamente modificadas (transgénicas), la labranza cero y la siembra directa (Evenson y Gollin 2003; Bindraban y col. 2009; Atlin y col. 2017). El modelo sojero fue desarrollado, fundamentalmente, por grandes empresas transnacionales con filiales en los principales países productores, proveedoras del “paquete tecnológico” (semillas transgénicas denominadas “soja RR”, o “Roundup-Ready”, resistentes al glifosato) y los insumos (herbicidas y fertilizantes) necesarios para el cultivo. Los productores argentinos adoptaron esta tecnología rápidamente, y en pocos años, casi el 90% de la soja que se cultivaba en el país era del tipo RR, constituyendo el porcentaje más alto de adopción en todo el mundo (Reboratti 2010). Entre las empresas transnacionales proveedoras del paquete tecnológico se destacan Monsanto, DuPont, Bayer, Nidera, y la semillera argentina Don Mario (Carrasco y col. 2012).

Este tipo de producto transgénico no ha ido disminuyendo, sino que propende a incrementar el consumo de agroquímicos en general y de herbicidas en particular. Para el caso de la “soja RR”, este aumento en el consumo se debe por un lado, al incremento del área sembrada, pero también al aumento de la tolerancia o resistencia al glifosato por parte de las malezas, situación que obligaría de por sí a incrementar la dosis para sostener el control (Pengue 2002). En este sentido, se ha visto que el consumo de glifosato en nuestro país siguió un aumento sostenido con 58, 100, 130, 150 millones de litros entre los años 2001-2005 (Pengue 2005), tendencia que continúa en la actualidad, según indican los valores de área cosechada de soja por el Sistema de Información del Mercado Agropecuario de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO-AMIS 2017). La misma registra un área cosechada de 19,10 millones de hectáreas en el año 2017, lo que representa aproximadamente el 184% del área cosechada de soja en el año 2000.

La expansión sojera en Argentina se ha producido por una serie de procesos con claras repercusiones sobre la calidad del ambiente. El primero, la deforestación y el reemplazo de sistemas naturales o semi-naturales por plantaciones de soja (en monocultivo), lo que implica una pérdida directa de biodiversidad nativa. La segunda, la intensificación en el uso de la tierra, que acelera distintos procesos de degradación ambiental, particularmente de erosión y pérdida de nutrientes del suelo. Finalmente, la homogeneización del paisaje agrícola, asociada al reemplazo del área sembrada con una variedad cultivos, y de área ganadera, por el monocultivo de soja, conduciendo a una pérdida de diversidad agroecosistémica (Grau y col. 2005; Aizen y col. 2009). Originalmente, la adopción del paquete tecnológico de la soja transgénica en Argentina se llevó a cabo en la Región Pampeana, núcleo histórico de la producción agro-exportadora, que abarca las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba y La Pampa. Sin embargo, en los últimos años, la producción se ha expandido más allá de este núcleo, en las provincias del norte del Chaco, Santiago del Estero y Salta (Figura 1; Leguizamón 2014). Por ejemplo, entre los años 1998 y 2002 se desmontaron 118.000 ha para la producción de soja en Chaco, 160.000 en Salta, y 223.000 en Santiago del Estero (Altieri y Pengue 2006).

En la actualidad, Argentina es el tercer productor de soja a nivel mundial, luego de Estados Unidos y Brasil (Benbrook 2016); y según la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE 2012), el glifosato (asociado a la siembra de soja RR) constituye el herbicida más comúnmente utilizado en el país, estando el herbicida atrazina en el segundo lugar.



Figura 1. Mapa de la República Argentina, mostrando la Región Pampeana y el área de producción de soja RR. Modificado de Leguizamón y col. (2014).

Debido a la creciente preocupación por la posible contaminación de los recursos a causa del uso de plaguicidas, se han realizado numerosas investigaciones tendientes a determinar los niveles de agroquímicos presentes en las distintas matrices ambientales en nuestro país desde el año 1990 (Colombo 1990, Janiot y col. 1992; Luco y col.1992; Miglioranza y col. 1999; 2003, 2004; Menone y col. 2001; Rovedatti y col. 2001; Antón y col. 2003; Baudino y col. 2003; Andrade y col. 2005; Jergentz y col. 2005; Marino y Ronco 2005; Peruzzo y col. 2008; Gonzalez y col. 2010; Arias y col. 2011; de Gerónimo y col. 2014; Lupi y col. 2015; Ronco y col. 2016). Por ejemplo, para el caso de la atrazina, se han detectado valores en aguas superficiales de hasta 1,4 µg/L para las provincias de Buenos Aires, Misiones y Tucumán (de Gerónimo y col. 2014), mientras que para el caso del glifosato, se han encontrado en sitios cercanos a áreas de práctica agrícola valores de 0,035 hasta 8,105 mg/kg en suelos de las provincia de Buenos Aires y Entre Ríos (Aparicio y col. 2013; Primost y col. 2017); valores de 0,0005-0,7 mg/L en aguas superficiales y de 0,01-5,0 mg/kg en sedimentos de las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes, Santa Fe, Chaco y Formosa (Peruzzo y col. 2008; Aparicio y col. 2013; Primost 2013; Lupi y col. 2015; Ronco y col. 2016; Primost y col. 2017).

La problemática ambiental en el marco de la Ecotoxicología

La ecotoxicología fue definida por primera vez en 1977 como la rama de la toxicología relacionada con el estudio de los efectos tóxicos, causados por contaminantes naturales y sintéticos, a los componentes de los ecosistemas: animales (incluidos los humanos), vegetales y microbianos, en un contexto integrado (Truhaut 1977). Sin embargo, con el correr de las décadas y cada vez más en la actualidad, este contexto convencional de individuo → población → comunidad → ecosistema discreto, se está extendiendo necesariamente a la metacomunidad → ecosistema → paisaje → ecorregión → continente → hemisferio → biosfera. Necesariamente, debido a que el contexto convencional en el que nació la ecotoxicología se ha vuelto gradualmente insuficiente para abarcar todos los temas pertinentes de la actualidad (Newman 2015). De este modo, la definición de la ecotoxicología se ha reformulado hacia una versión más holística, como la ciencia de los contaminantes en la biosfera y sus efectos sobre los componentes de la misma, incluidos los humanos (Newman y Unger 2003; Newman 2015).

Ciertamente, la ecotoxicología es una ciencia de síntesis, ya que reúne ideas y métodos de muchas disciplinas. Por ejemplo, intenta explicar los efectos de los contaminantes a nivel molecular (por ejemplo, la inactivación enzimática por un contaminante), a nivel de población (por ejemplo, las extinciones locales), y a nivel de organización biológica de la biosfera (por ejemplo, el calentamiento global). Las cuestiones de destino y transporte de los contaminantes se abordan desde el punto de vista del producto químico (por ejemplo, especiación de metal disuelto) hasta el hábitat (por ejemplo, acumulación de contaminantes en hábitats de depósito) y a los niveles de escala física de la biosfera (por ejemplo, destilación global de plaguicidas volátiles) (Fig.2; Newman 2015).

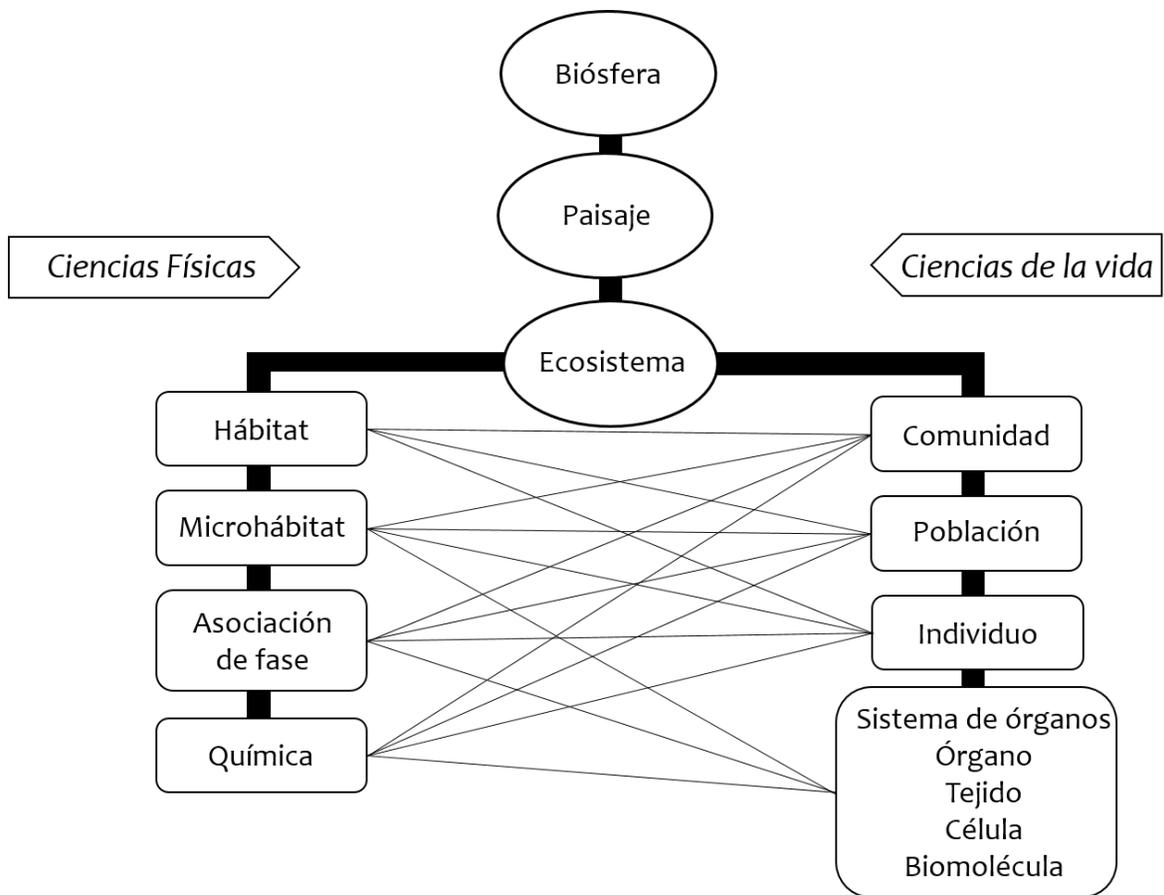


Figura 2. Organización jerárquica de los temas abordados por la ecotoxicología. Las disciplinas que contribuyen a la comprensión de las interacciones abióticas se enumeran en el lado izquierdo del diagrama y las que contribuyen a la comprensión de las interacciones bióticas se enumeran a la derecha. Las interacciones importantes, denotadas por líneas que conectan componentes, ocurren entre componentes bióticos y abióticos. Modificado de Newman (2015).

Los bioensayos de toxicidad

Una de las herramientas más ampliamente utilizadas en la ecotoxicología son los bioensayos de toxicidad. Éstos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre los organismos de prueba, bajo condiciones experimentales específicas y controladas (USEPA 2002a; Ronco y col. 2004). Los resultados de los bioensayos sobre los organismos de prueba y bajo condiciones previamente determinadas, pueden indicar niveles de peligrosidad que pueden ser extrapolados a organismos que forman parte de los sistemas naturales y la biocenosis (Ronco y col. 2004). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en este tipo de experimentos existen limitaciones a la hora de hacer extrapolaciones sobre efectos en los ecosistemas, ya que hay ciertos factores que no son considerados, justamente con la idea de realizar experimentos en condiciones sumamente controladas y “normalizar” este tipo de procedimientos en protocolos estándar. Por ejemplo, a nivel de lo que Newman (2015) denomina como *escala física de la biósfera*, los bioensayos no explican el efecto de la especiación química en el ambiente, la cinética y la absorción de sustancias químicas al sedimento, así como tampoco pueden explicar ciertos ítems más complejos de *los niveles de organización biológica de la biosfera*, como la acumulación a través de cadenas alimentarias y los modos de acción tóxica (Shugart y col. 1992). No obstante, y a pesar de sus limitaciones para la extrapolación en el ecosistema, los bioensayos constituyen las fuentes de información predominantes para la evaluación de los efectos de los contaminantes sobre algunos componentes de la biota (Ronco y col. 2004).

Los anfibios como modelos de estudio en ecotoxicología

En principio, se debe considerar que no existe ningún organismo ni biocenosis que pueda ser usado para evaluar todos los efectos posibles sobre el ecosistema bajo las diversas condiciones abióticas y bióticas presentes. En la práctica, solamente unas pocas especies (especies modelo o especies para pruebas), que representen funciones ecológicas relevantes, pueden ser ensayadas, y se han establecido protocolos para ello (Ronco y col. 2004). Para seleccionar un organismo determinado como modelo para bioensayos ecotoxicológicos, deben tenerse en cuenta ciertas características específicas. Por ejemplo, su disponibilidad durante todo el año, ya sea de fuentes comerciales o naturales,

su fácil manipulación en el laboratorio, sus patrones de reproducción y desarrollo (relacionados con la posibilidad de criarlo en laboratorio), la sensibilidad a los contaminantes, su distribución geográfica y ecológica, y poder llegar a ser identificado hasta el nivel de especie (USEPA 1977; 2002b).

Sparling y col. (2010) analizaron la bibliografía existente en el marco de la ecotoxicología de vertebrados, y encontraron que de unas 17.375 publicaciones examinadas, en el 66,7% se utilizó como organismo de ensayo los peces, en el 19,9% se utilizó mamíferos, en el 8,8% se utilizó aves, en el 3,8% se utilizó anfibios y en el 0,8% se utilizó reptiles. Resultados similares fueron hallados previamente por Sparling y col. (2000), pudiéndose observar que esta tendencia continúa una década después. En conclusión, solo una fracción muy pequeña de la literatura sobre ecotoxicología de vertebrados fue realizada sobre anfibios o reptiles. En cuanto a los anfibios, existen unos pocos protocolos estandarizados que proponen especies de anfibios anuros como modelos de estudio en ecotoxicología, por ejemplo, el protocolo FETAX: Frog Embryo Teratogenic Assay-*Xenopus* (ASTM 1991) con la especie *Xenopus laevis* como modelo de estudio, entre otros protocolos que también proponen a *X. laevis* como especie modelo (USEPA 2011; Bantle y col. 1996). En nuestro país, también se desarrolló el protocolo denominado AMPHITOX para estudios ecotoxicológicos estandarizados con embriones de *R. arenarum*, una especie autóctona de la región (Herkovitz y Perez-Coll 2003).

En este sentido, una materia de gran importancia que un investigador debe conocer a la hora de trabajar o proponer un organismo como especie modelo, corresponde al ciclo de vida y la biología reproductiva de la especie (por ejemplo, la temperatura óptima de desove, el número de huevos, el tipo de desove o puesta, el tiempo de eclosión, el tiempo a la metamorfosis, etc). Esta información básica es esencial para la selección de las especies modelo y la utilización de las distintas etapas del desarrollo de la especie en bioensayos de toxicidad. Con fines reproductivos, es necesario poder identificar hembras grávidas en el campo, o en ciertos casos, hacer convenios con criaderos autorizados en caso que sea posible (USEPA 1977). De este modo, se hace más sencillo cumplir con los requerimientos de disponibilidad durante todo el año, y de cría de organismos en laboratorio para alcanzar el estadio de vida deseado en el diseño experimental de bioensayos de toxicidad. Se han realizado estudios y propuesto métodos de reproducción en cautiverio para cumplimentar con los requerimientos previamente mencionados, ya sea dentro de protocolos estándar para estudios ecotoxicológicos (ASMT 1991, Herkovitz y

Perez-Coll 2003) como utilizando métodos de reproducción en cautiverio en el área de la conservación, con un posterior empleo en bioensayos de toxicidad (Trudeau y col. 2010; Salgado Costa 2016; Salgado Costa y col. 2018). De este modo, se evita además, la extracción sistemática de individuos de los ecosistemas naturales, lo que resulta de una importancia imperativa, sobre todo a partir del conocimiento de la disminución numérica de las poblaciones de anfibios a escala global (Houlahan y col. 2000; Lavilla y col. 2001; Alford y col. 2001; Stuart y col. 2004; Young y col. 2004).

Los anfibios como bioindicadores de contaminación ambiental

Los anfibios son especialmente sensibles a cambios en el medio ambiente debido a distintas características particulares: una fuerte dependencia del medio en el que habitan, la falta de migraciones, una piel desnuda con gran permeabilidad cutánea, huevos sin cáscara, la imposibilidad de regular su temperatura corporal (ectotérmicos), y un ciclo de vida bifásico dependiente tanto del medio acuático como del medio terrestre. Estas características propias le han otorgado al grupo gran relevancia, al ser considerados como buenos bioindicadores de la calidad ambiental por numerosos investigadores (Rabb 1990; Duellman y Trueb 1994; Blaustein y Kiesecker 2002; Blaustein y col. 2003).

Desde fines de la década del '80, y a partir de la realización del Primer Congreso Mundial de Herpetología, la comunidad científica y herpetológica comenzó a llamar la atención sobre la situación de algunas poblaciones de anfibios en todo el mundo que estaban mostrando reducciones drásticas y hasta en ciertos casos habían llegado a desaparecer (Houlahan y col. 2000; Lavilla y col. 2000; Alford y col. 2001; Stuart y col. 2004; Young y col. 2004). Desde ese momento, se llevaron a cabo numerosas investigaciones con el objeto de conocer el estado de conservación de las especies de anfibios a nivel mundial (Stuart y col. 2004; Andreone y col. 2005; Grenyer y col. 2006; Brooks y col. 2007; Bielby y col. 2008). Según la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza (IUCN 2016), existen en el mundo alrededor de 6.200 especies de anfibios, de las cuales cerca de un tercio (32,4%) están en vías de extinción o se encuentran amenazadas, representando 2.030 especies. Otras 2.697 (43,1%) especies se encuentran bajo las clasificaciones de “Casi Amenazada” o “Preocupación menor”, mientras que las 1.533 especies restantes (24,5%) no cuentan con datos suficientes para conocer su estado. Particularmente para

nuestro país, una investigación llevada a cabo por los miembros de la Asociación Herpetológica Argentina (AHA) (Vaira y col. 2012) arrojó que, de un total de 175 especies de anfibios, 51 especies estaban incluidas en la lista roja (8 especies catalogaron como “En Peligro”, 11 como “Amenazadas” y 32 como “Vulnerables”), 21 especies se encontraban “Insuficientemente Conocidas” y 103 especies se incluían como “No Amenazadas”. Con respecto a la evaluación previa realizada por la AHA (Lavilla y col. 2001) para la República Argentina, la evaluación de 2012 reflejó un incremento en el número de especies “En Peligro” y “Amenazadas”, así como una disminución de casi el 10% en el número de especies poco conocidas y un incremento del 10% de los taxones “No Amenazados”.

Se han llevado a cabo también numerosas investigaciones con el objetivo de identificar la causa de la disminución numérica global de las poblaciones de anfibios y se han propuesto varios factores como responsables de esta problemática. Entre estos factores podemos mencionar: a) la introducción de especies exóticas, b) el cambio climático, c) la radiación UV-B, d) la modificación y fragmentación del hábitat, e) las enfermedades emergentes, f) el comercio de especies, y g) la contaminación ambiental, particularmente el uso de plaguicidas (Davidson y col. 2001; Young y col. 2001; Collins y Storfer 2003; Lavilla 2001). Según la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza (IUCN 2016) los factores que mayor contribución aportan a esta disminución son, en primer lugar, la pérdida del hábitat, y en segundo lugar, la contaminación ambiental (Figura 3)

En nuestro país, algunas investigaciones han detectado la existencia de estos factores y proponen que podrían estar actuando a nivel local como factores perjudiciales para las poblaciones y comunidades de anfibios (Lavilla 2001; Lavilla y Heatwole 2010). Entre ellos, podemos mencionar la pérdida de hábitats naturales o semi-naturales por conversión en áreas agrícola-ganaderas y la contaminación química por metales pesados, productos farmacéuticos y agroquímicos (Paruelo 2006; Jofré y col. 2011; Elorriaga y col. 2013; Ronco y col. 2016); la introducción de peces (Úbeda y Grigera 2007; Barrionuevo y Ponssa 2008) y anfibios exóticos (Pereyra y col. 2006; Barrasso y col. 2009; Akmentins y Cardozo 2010; Sanabria y col. 2011; Millitelo y col. 2017); y finalmente la presencia de enfermedades infecciosas emergentes, entre ellas ranavirus (Fox y col. 2006) y quitridiomycosis (Herrera y col. 2005; Arellano y col. 2009; Delgado y col. 2012; Ghirardi y col. 2011; 2014; Agostini 2015 a y b).

En este contexto, cualquier factor que afecte la reproducción de una determinada especie, puede llevar a la disminución numérica de sus poblaciones, y en última instancia a su extinción (Sparling y col. 2010). La alteración de la relación de sexos y anomalías a nivel de las gónadas, son ejemplos de manifestaciones inducidas por perturbaciones hormonales, posiblemente durante el período larval (Mann y col. 2009).

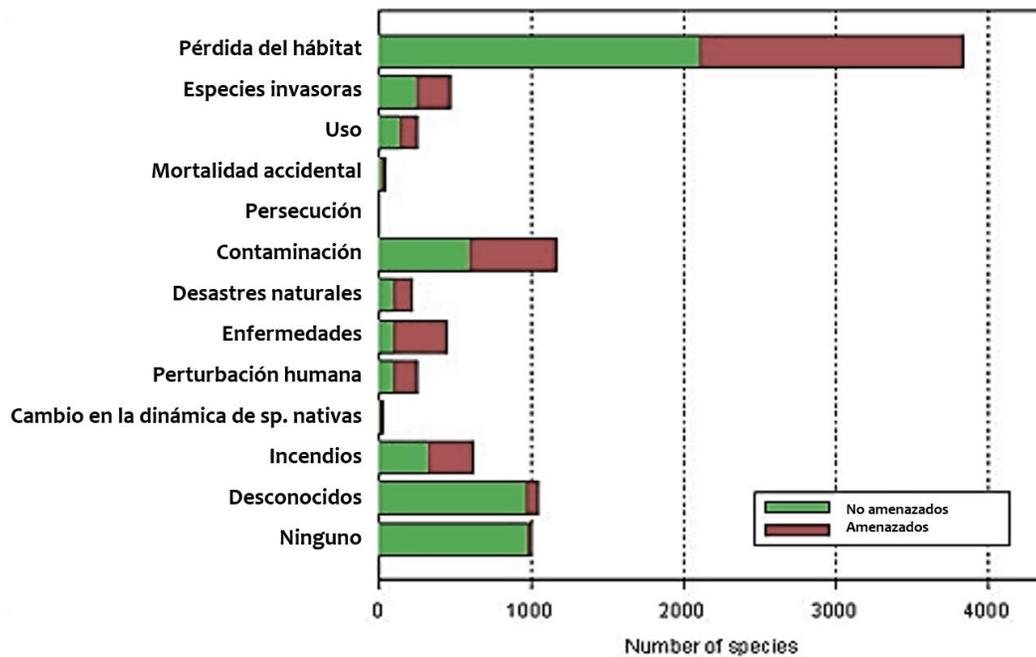


Figura 3. Principales amenazas para la conservación de los anfibios. Modificado de <http://www.iucnredlist.org/initiatives/amphibians/analysis/major-threats>

Desarrollo gonadal en anfibios anuros

En anfibios, el proceso de determinación sexual está predeterminado genéticamente (Sugita y col. 2001; Nakamura 2009; Yoshimoto e Ito 2011; Miura 2017). Algunas especies de anfibios son heterogaméticas masculinas (machos con cromosomas sexuales diferentes o XY) mientras que otras son heterogaméticas femeninas (hembras con cromosomas sexuales diferentes del tipo ZW). Sin embargo, aproximadamente sólo el 4% de los anfibios estudiados tienen cromosomas sexuales morfológicamente diferenciados, o heteromórficos (Norris y López 2011; Miura 2017). Se conoce además, que factores ambientales como la temperatura y los contaminantes, pueden influir en el proceso de diferenciación sexual en algunas especies de anfibios, resultando en desviaciones de la proporción 1:1 de sexos (Hayes 1998; Wallace y col. 1999; Bögi y col. 2002; Eggert 2004; Duarte-Guterman y col. 2009; Nakamura 2009; 2010; Langlois y col. 2010; Sarre y col. 2011; Flament 2016; Lambert y col. 2016; Bai y col. 2017).

La diferenciación sexual de anfibios anuros desde el punto de vista morfo-histológico ha sido estudiada en numerosas especies: *Xenopus laevis*, *Bombina orientalis*, *Pelophylax ridibundus*, *Rugosa rugosa*, *Clinotarsus curtipes*, *Lithobates catesbeianus*, *Bufo bufo*, *Xenopus tropicalis*, *Euphlyctis cyanophlyctis* (Duellman y Trueb 1986; Takase 1998; McDiarmid y Altig 1999; Gramapurohit y col. 2000; Falconi y col. 2007; El Jamil y col. 2008; Phuge y Gramapurohit 2013). En especies autóctonas se conocen ciertos aspectos del proceso de diferenciación sexual en *Pleurodema cinereum*, *Ceratophrys ornata*, *Rhinella arenarum*, *Phyllomedusa sauvagii*, *Phyllomedusa boliviana*, *Pleurodema borellii*, *Scinax fuscovarius* y *Dendropsophus molitor* (Rengel y Pisanó 1981; Rengel y col. 1991; 1995; Duellman y Trueb 1994; Goldberg 2014; Pinto-Eraza y col. 2016). De este modo, se puede generalizar que las gónadas masculinas y femeninas de los anuros se diferencian durante la etapa larvaria, antes del clímax metamórfico (McDiarmid y Altig 1999; Ogielska y Kotusz 2004; El Jamil y col. 2008; Goldberg 2014). Desde el punto de vista molecular, se han identificado algunos genes que intervienen en el proceso de diferenciación testicular, como *dmrt1* (Shibata y col. 2002; Eggert 2004; Yoshimoto y col. 2010; Piprek y col. 2013) y *cyp17* (Iwade y col. 2008; Maruo y col. 2008; Sakurai y col. 2008; Nakamura 2009; 2012; Suda y col. 2011; Navarro Martin y col. 2012); y también en la diferenciación ovárica, como *cyp19a*, que se encuentra fuertemente asociada a la diferenciación del ovario (Maruo y col. 2008; Nakamura 2009; 2012; Okada y col. 2009; Oshima y col. 2009; Norris y López 2011; Navarro Martin y col. 2012), y *foxl2*, que podría estar regulando la expresión de

cyp19a en las hembras de anfibios, resultando de un papel crucial en la diferenciación de los ovarios (Nakamura 2009; Oshima y col. 2008; Navarro Martin y col. 2012).

Es bien conocido que los esteroides gonadales modulan el proceso de diferenciación gonadal en larvas de anfibios, y experimentalmente, se han producido fenotipos intersexo, o directamente la inversión del sexo genotípico, luego de la exposición a esteroides exógenos, como el estradiol y la testosterona (Hayes 1998; Wallace y col. 1999; Saidapur y col. 2001); así como a otras sustancias químicas con actividad estrogénica o androgénica de origen antrópico, como el Bisfenol A, el etinilestradiol, el levonorgestrel, los PCBs y el tetrabromoetilciclohexano (Carr y col. 2003; Levy y col. 2004; Pettersson y col. 2006; Pettersson y Berg 2007; Hogan y col. 2008; Jofré y Karasov 2008; Tompsett y col. 2012; Säfholm y col. 2015; Orton y Tyler 2015; Liu y col. 2017). También se ha demostrado que los inhibidores de aromatasa, como el Fadrozol, e inhibidores de enzimas en la ruta androgénica, como el Finasteride, alteran el proceso de diferenciación gonadal de diversas especies de anuros (Olmstead y col. 2009, Duarte-Guterman y col. 2009).

Debido a que en general, la diferenciación gonadal se produce antes del clímax metamórfico, las especies que habitan en agroecosistemas y que están expuestas a contaminantes durante el desarrollo larval, poseerían riesgos de sufrir efectos sobre el desarrollo gonadal, la diferenciación sexual, anormalidades gonadales o fisiológicas, entre otros efectos conocidos, como alteraciones en el crecimiento, el desarrollo y el comportamiento, por mencionar algunos. Efectos de este tipo se han encontrado en anfibios expuestos a plaguicidas. Por ejemplo, Harris y col. (2000) encontraron alteraciones en la proporción de sexos (100% hembras) en *Lithobates pipiens*, recientemente metamorfoseados, que habían sido expuestos a mancozeb. También se ha estudiado el efecto de la atrazina en el período larval. En general, la atrazina es aplicada en primavera, momento en que los anuros comienzan a reproducirse y los renacuajos se encuentran atravesando etapas tempranas del desarrollo (Norris y López 2011). En este contexto, existen evidencias que demuestran que la atrazina altera la relación de sexos, incrementando la incidencia de individuos con gónadas intersexo en *Xenopus laevis* (Carr y col. 2003) y *Lithobates pipiens* (Hayes y col. 2003), así como incrementa la proporción de hembras, en *X. laevis* (Oka y col. 2008), *L. pipiens* (Langlois y col. 2010) y *Acris blanchardi* (Hoskins y col. 2017). Además, es sabido que exposiciones a dosis subletales de este herbicida inducen la actividad de la enzima aromatasa (que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos), siendo posiblemente ésta, la razón de su efecto sobre la

diferenciación gonadal (Fig. 4; Hayes 2004; Fan y col. 2007; Gunderson y col. 2011). De esta forma, los efectos de la atrazina en la diferenciación sexual de anfibios, pueden afectar negativamente a sus poblaciones, contribuyendo de este modo, a la declinación numérica (Hayes y col. 2006).

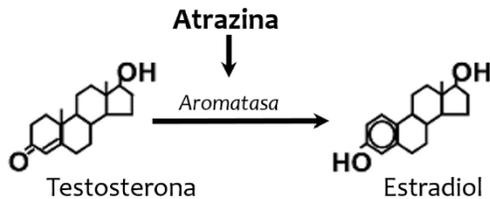


Figura 4. Mecanismo de acción propuesto para los efectos de la atrazina en anfibios. La inducción de aromatasa por la atrazina, estimularía la pérdida de testosterona como sustrato para la formación de estradiol. Modificado de Hayes y col. (2004)

Otro agroquímico con posibles efectos sobre la diferenciación sexual en anuros es el glifosato, que como ya se ha mencionado anteriormente, es un herbicida ampliamente utilizado, asociado al cultivo de soja genéticamente modificada y que en nuestro país representa el herbicida más comercializado del mercado. En este sentido, Howe y col. (2004) informaron la presencia de individuos de *Lithobates pipiens* con gónadas intersexo luego de la exposición a concentraciones subletales de los formulados comerciales Roundup Original®, Roundup Transorb® y POEA, aunque este efecto no fue observado en larvas expuestas al principio activo. Asimismo, Orton y Routledge (2011) encontraron individuos de *Bufo bufo* con gónadas intersexo en ambientes donde se realiza agricultura. Específicamente para nuestro país, existen unos pocos y recientes casos de anomalías gonadales observadas en sitios asociados a cultivos de soja. Si bien fue observado en un único individuo, y por lo tanto, podría estar representando un caso patológico, vale destacar el hallazgo de hermafroditismo bilateral en un renacuajo de *Scinax fuscovarius* (Goldberg 2013), y anomalías testiculares en individuos adultos de *Rhinella fernandezae* y *Dendrosophus sanborni* (Sánchez y col. 2014) colectados en humedales asociados al monocultivo de soja. Sin embargo, es aún prematuro asociar estas anomalías al efecto inequívoco de estos herbicidas, por lo que se necesitan más estudios.

Objetivos

Sobre la base de estos antecedentes, la expansión de la frontera agrícola, que avanza destruyendo y fragmentando hábitats y generando contaminación por la aplicación de plaguicidas; los efectos directos que esto produce en el ecosistema, como la pérdida de biodiversidad nativa, con la disminución numérica de las poblaciones de anfibios; que los plaguicidas posean efectos perjudiciales sobre la biota, y en especial sobre los anfibios, por ser bioindicadores de calidad ambiental; que algunos plaguicidas produzcan además, efectos en las gónadas de los anfibios, afectando de manera directa su reproducción, y considerando que este es un aspecto esencial para la supervivencia de las especies; se plantean los siguientes objetivos a ser desarrollados a lo largo del presente trabajo de tesis doctoral, que tuvo como objetivo general:

- ❖ Estudiar el efecto del herbicida glifosato sobre la diferenciación gonadal de *Leptodactylus latrans* (como especie representativa de los anuros autóctonos que habitan en agroecosistemas de la Región Pampeana), evaluando parámetros morfológicos, histológicos, bioquímicos y moleculares.

Los objetivos específicos planteados están divididos en dos etapas. La Primer Etapa pretende abordar el estudio de la diferenciación sexual considerando como modelo experimental a *Leptodactylus latrans* (la rana criolla). La segunda, con un enfoque más aplicado, aborda la determinación de efectos en el desarrollo gonadal y la diferenciación sexual por exposición a plaguicidas.

En el marco de la Primer Etapa los objetivos fueron:

- ✓ Poner a punto el método de inducción artificial de la reproducción en *Leptodactylus latrans*, con la finalidad de obtener larvas en los momentos del año que sea necesario (Capítulo I).
- ✓ Caracterizar el proceso de desarrollo gonadal desde el punto de vista morfológico, e histológico, determinando el estadio de vida en el que ocurre la diferenciación sexual y la proporción de sexos observada por camada, en condiciones controladas de laboratorio (Capítulo II).
- ✓ Caracterizar 4 genes implicados en la diferenciación sexual de anfibios: *drmt1*, *cyp17*, *cyp19*, y *foxl2* (Capítulo II).

En el contexto de la Segunda Etapa se plantearon los siguientes objetivos:

- ✓ Determinar los efectos producidos por la exposición a herbicidas de interés regional (glifosato), sobre el desarrollo gonadal y la diferenciación sexual de la especie seleccionada, con bioensayos de toxicidad en laboratorio (Capítulo III).

Capítulo I

“Biología reproductiva de Leptodactylus latrans.”

Introducción

La especie estudiada: *Leptodactylus latrans*

Clasificación taxonómica de la especie:

Phyllum: Chordata

Clase: Amphibia

Subclase: Lissamphibia

Orden: Anura

Familia: Leptodactylidae

Subfamilia: Leptodactylinae

Género: *Leptodactylus*

Especie: *Leptodactylus latrans*

Leptodactylus latrans (Steffen, 1815), comúnmente conocida como “rana criolla”, es una especie perteneciente a la familia Leptodactylidae (Amphibia: Anura) (Frost 2016). Su distribución abarca una gran extensión en Sudamérica ocupando los territorios de Surinam, Guyana Francesa, Venezuela, Colombia, Brasil, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina, teniendo a la provincia de Neuquén como límite Sur (Figura 5; Heyer y col. 2010). Son ranas de gran tamaño llegando a tener una longitud hocico-cloaca de hasta 120 mm en hembras y hasta los 140 mm en el caso de los machos (Ceí 1980). En el estado adulto presentan dimorfismo sexual ya que los machos tienen, en general, mayor tamaño corporal que las hembras, hecho que representa una excepción al patrón más generalizado en anuros, en donde las hembras son más grandes que los machos. Los machos cuentan, además, con caracteres sexuales secundarios estacionales, como la presencia de un único saco vocal, el cual suele encontrarse pigmentado y la hipertrofia de los miembros anteriores y de los pectorales, que van acompañados con el desarrollo de espinas córneas tanto en miembros anteriores (en el dedo 1) como en el centro del pecho, garganta y brazos. Además, presentan glándulas con puntas córneas negras sobre los lados del cuerpo

(Figura 6), y el reflejo del abrazo, especialmente desarrollados en la época reproductiva (Ceí 1948; Ceí 1980).



Figura 5. Distribución geográfica de *Leptodactylus latrans*. Fuente: IUCN 2016. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2016.1.

Se han realizado numerosos estudios en distintos países evaluando el tipo de dieta de *L. latrans*. Strüssmann y col. (1984), Teixeira y col. (2003), y Solé y col. (2009) han analizado el contenido estomacal de adultos de *L. latrans* en distintas regiones de Brasil; Maneyro y col. (2004) en Uruguay; mientras que Gallardo (1974); Lajmanovich (1996) y Sanabria y col. (2005) hicieron estudios similares con poblaciones de Argentina. Los investigadores coinciden en que *L. latrans* es una especie generalista y oportunista, que se alimenta de artrópodos terrestres y acuáticos, y pequeños vertebrados. Los artrópodos más comúnmente consumidos son coleópteros, isópteros e himenópteros (principalmente formicidos), y dentro de los vertebrados, otros anfibios anuros, aunque también es frecuente el consumo de pequeños roedores y aves.

La larva de *L. latrans* se caracteriza por poseer un cuerpo ovoide y deprimido, de color negro con reflejos azulados. Cuenta con una musculatura caudal bien desarrollada, que se encuentra soportando grandes aletas (Figura 7; Gallardo 1974; Cei 1980). Las investigaciones existentes sobre su dieta describen su alimentación como fitófaga, detritívora, integrada mayoritariamente por algas pardas (con notable relevancia las diatomeas) y verdes, además de detritus y restos vegetales (Gallardo 1974; Lajmanovich 1994).

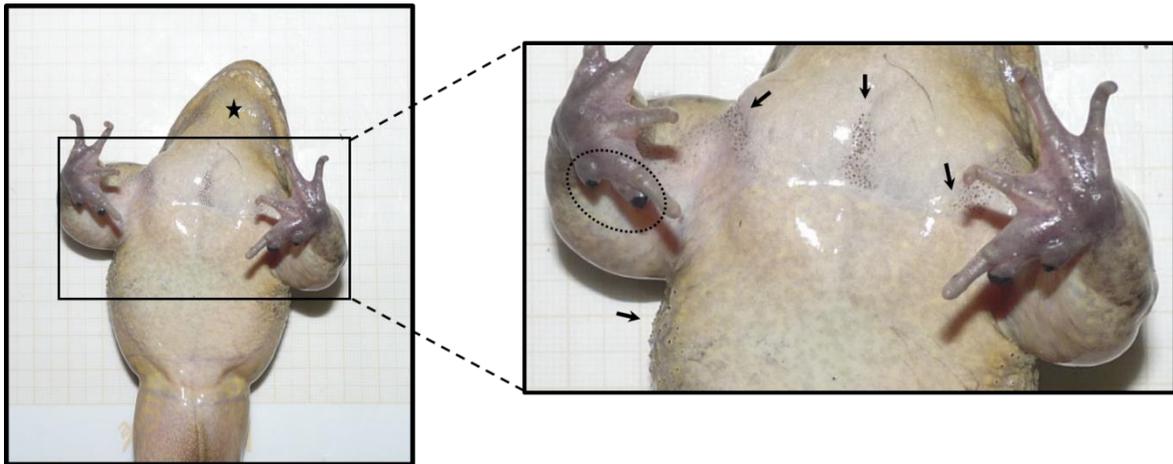


Figura 6. Caracteres sexuales secundarios de un macho adulto de *L. latrans* en condición reproductiva. a) Vista ventral de un macho adulto de *L. latrans*. La estrella indica la posición del saco vocal oscurecido. El recuadro indica la presencia de pectorales y brazos hipertrofiados. b) Detalle de la zona ventral de un macho de *L. latrans*. Las flechas indican la posición de las espinas córneas en la zona pectoral y en los flancos del cuerpo. La elipse indica la posición de las espinas córneas en el dedo 1.

El período reproductivo de esta especie coincide con el comienzo de las lluvias de primavera/verano y el aumento de la temperatura, por lo que abarca desde fines de agosto hasta fines de abril, constituyendo así, un modo de reproducción de tipo discontinuo (Gallardo 1974; Lavilla y Rouges 1992). La reproducción está fundamentalmente asociada a las grandes lluvias con precipitaciones de 65 a 75 mm, siendo este factor climático el elemento más importante en el desencadenamiento de la actividad reproductiva, ya que el llenado de las charcas, asociado al aumento de la temperatura juegan un rol importante en el desencadenamiento de la reproducción (Ceí 1948). En el momento de la reproducción, los individuos se congregan en los cuerpos de agua, en donde los machos emiten vocalizaciones (canto nupcial), generalmente eligiendo las zonas que reciben iluminación durante largos períodos. Vocalizan de día y de noche y este comportamiento dura aproximadamente de 3 a 4 días. Cuando las hembras llegan al sitio reproductivo y se acercan a un macho que se encuentra vocalizando, el macho la abraza y se produce el amplexo dentro del cuerpo de agua, el que dura hasta concluida la oviposición. La oviposición ocurre durante la formación de un nido de espuma que se adhiere a la vegetación, el cual se forma mediante la secreción de sustancias producidas por el oviducto que, al ser batidas con los miembros posteriores del macho y la hembra, forman una espuma blanca que flota. Ambos miembros de la pareja en amplexo sumergen la cabeza y realizan movimientos de giro en sentido de las agujas del reloj (Figura 8), mientras la hembra expulsa sus ovocitos y el macho los fecunda, y de esta forma los huevos van siendo incluidos en el nido de espuma en formación (Gallardo 1974; Lavilla y Rouges 1992). Tales nidos de espuma son de color blanco y poseen una forma circular con un hueco en el centro (en donde generalmente permanece la hembra cuidando el nido), llegan a medir 25 a 30 cm de diámetro y 5 cm de alto y permanecen flotando en la superficie del agua (Ceí 1948). Recientemente se ha documentado la presencia de “machos satélite” en las proximidades de los nidos de espuma, cuya función no fue del todo resuelta, pero parecería tener algún rol en la competencia de los machos de esta especie (Laufer 2014).

Leptodactylus latrans es una de las especies de anuros que presenta cuidado parental, y como se dijera en el párrafo precedente, las hembras son las que cuidan de los huevos y las larvas, que forman cardúmenes (Ceí 1948; Gallardo 1974; Lavilla y Rouges 1992). Estos cardúmenes presentan un comportamiento allelomimético, y suelen producir sonidos al batir el agua, los que pueden ser oídos a una distancia de hasta 5 m. Los renacuajos

separados del conjunto hacen pocos movimientos natatorios, lo que contrasta con la actividad de los cardúmenes. Otra característica de estos cardúmenes es el comportamiento epimelético en el que los renacuajos rodean a la hembra y raspan con sus bocas la piel de su dorso (Gallardo 1974; Vaz-Ferreira y Gerhau 1975).

A pesar que *L. latrans* es una especie comúnmente cazada con fines culinarios, ha sido considerada como especie “No Amenazada” por Vaira y col. (2012) y como especie de “Preocupación Menor” (“Least Concern”) por la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza (IUCN 2016); y no se encuentra incluida en el apéndice CITES 2015. Sin embargo, a pesar de su gran distribución, presencia e importancia, hay aspectos de su biología que llamativamente al momento de inicio de esta tesis, no habían sido estudiados.

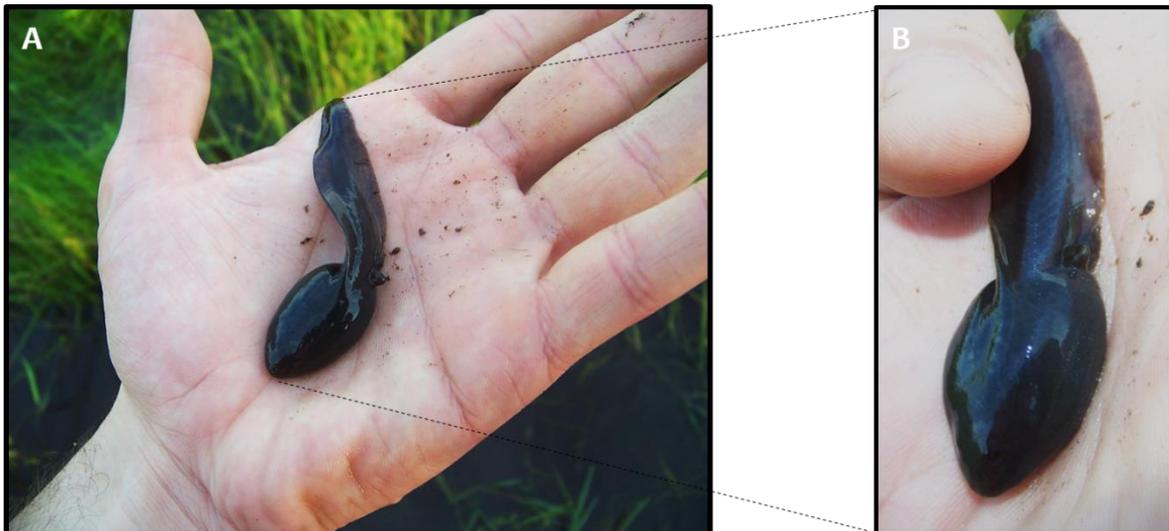


Figura 7. a) Larva de *L. latrans* observada en uno de los sitios de estudio. b) Detalle de la larva de *L. latrans* donde se observan sus característicos reflejos azulados y el gran desarrollo de la musculatura caudal.



Figura 8. Formación del nido de espuma en *Leptodactylus latrans*. a: Amplexo de *L. latrans* en el centro del nido de espuma en formación; b: sumergimiento del amplexo en el agua, donde se evidencian los miembros posteriores fuera del agua realizando los movimientos de batido de las sustancias liberadas por la cloaca; c: emergimiento de la pareja en amplexo luego de sumergirse. Nótese el giro realizado en dirección de las agujas del reloj entre la imagen a y c.

Inducción hormonal de la reproducción

La reproducción en cautiverio es una meta de difícil alcance por herpetólogos conservacionistas, que intentan criar en cautiverio diferentes especies de anuros. Además de reproducir las condiciones básicas para mantener a los individuos en cautiverio con éxito (reproducir el nicho ecológico fundamental), el paso más importante es inducir la reproducción. En este sentido, es de vital importancia recurrir a técnicas de inducción artificial para lograr la reproducción de los individuos en cautiverio (Clulow y col. 2014). Entre los métodos de reproducción artificial para anfibios, se destacan aquellos que simulan las condiciones ambientales naturales, las que actúan como desencadenantes de la reproducción (ej. tanques de lluvia artificial, Natale 2006), hasta metodologías que incluyen la inducción de la maduración final de los ovocitos y los espermatozoides, a través de la administración hormonal, seguida de una fecundación artificial (Browne y Zippel 2007). En este sentido, uno de los aspectos más importante que tratan de alcanzar este tipo de técnicas, es tratar de evitar el sacrificio de los reproductores. Entre las diferentes hormonas utilizadas con este fin, se pueden destacar la administración de hormonas heterólogas con actividad biológica sobre la especie receptora, como la *Gonadotropina Coriónica Humana* ó HCG (Licht 1979; Herkovits y Pérez Coll 1991), o la administración de variantes sintéticas de la *Hormona Liberadora de la Gonadotropinas*, LHRH o GnRH (Licht 1979; Licht y Porter 1987).

Los avances recientes incluyen no sólo la inducción hormonal de hembras y machos, sino también, el almacenamiento de huevos y espermatozoides, la fecundación artificial, y la cría de larvas en altas densidades hasta la metamorfosis (Browne et al. 2002; Buchholz et al. 2004; Sargent and Mohun 2005). Estas prácticas resultan en general poco exitosas, debido principalmente a dificultades en el desove y a las bajas tasas de supervivencia de las larvas. En muchas ocasiones, además, los ejemplares colectados recientemente resultan difíciles de reproducir en cautiverio, aunque se encuentren en buenas condiciones de salud y alimentación aparentes (Browne y Zippel 2007). Aunque se ha logrado con éxito inducir la ovulación con la administración de hormonas en varias especies de anuros, los protocolos existentes requieren de hembras con ovocitos maduros, cuya producción depende principalmente de distintas señales ambientales, las cuales son específicas para las diferentes especies de anuros (Whitaker 2001). En consecuencia, la combinación de un buen manejo de la reproducción natural y artificial es el mejor método para el mantenimiento a largo plazo de los anfibios en cautiverio (Browne y col. 2006). En el año 2010, Trudeau y col. diseñaron un nuevo método de inducción hormonal de la reproducción que saltea el paso de la fecundación artificial (*in vitro*) hacia un proceso en donde la cópula ocurre normalmente. El nombre de dicho método deriva de la combinación de dos palabras en inglés que significan anfibios y amplexo, siendo conocido como AMPHIPLEX. En este caso, luego de la administración hormonal, macho y hembra son depositados en el mismo recinto a la espera de que el evento reproductivo ocurra, sin necesidad de una nueva intervención por parte del hombre. Este método se basa en la inyección combinada de un agonista superactivo de GnRH y un antagonista de la dopamina, y la base fisiológica de dicha combinación se basa en el hecho de que en vertebrados, GnRH induce la liberación de la hormona luteinizante (LH) por parte de la hipófisis y que la dopamina inhibe tónicamente la liberación de esta hormona tanto a nivel hipofisario como hipotalámico (Dufour y col. 2005; Figura 9). De esta forma, posibilita la liberación de las gonadotropinas endógenas evitando la posible falta de respuesta ante la administración de gonadotropinas heterólogas (Figura 9). Esta técnica ha sido probada con éxito en varias especies de anuros autóctonos como *Ceratophrys ornata*, *C. cranwelli*, *Odontophrynus americanus*, *Rhinella fernandezae* y *Lepidobatrachus llanensis*, demostrando ser efectivo en, al menos, tres familias de anfibios anuros: Ceratophryidae, Odontophrynidae y Bufonidae (Trudeau y col. 2010; Salgado Costa 2016).

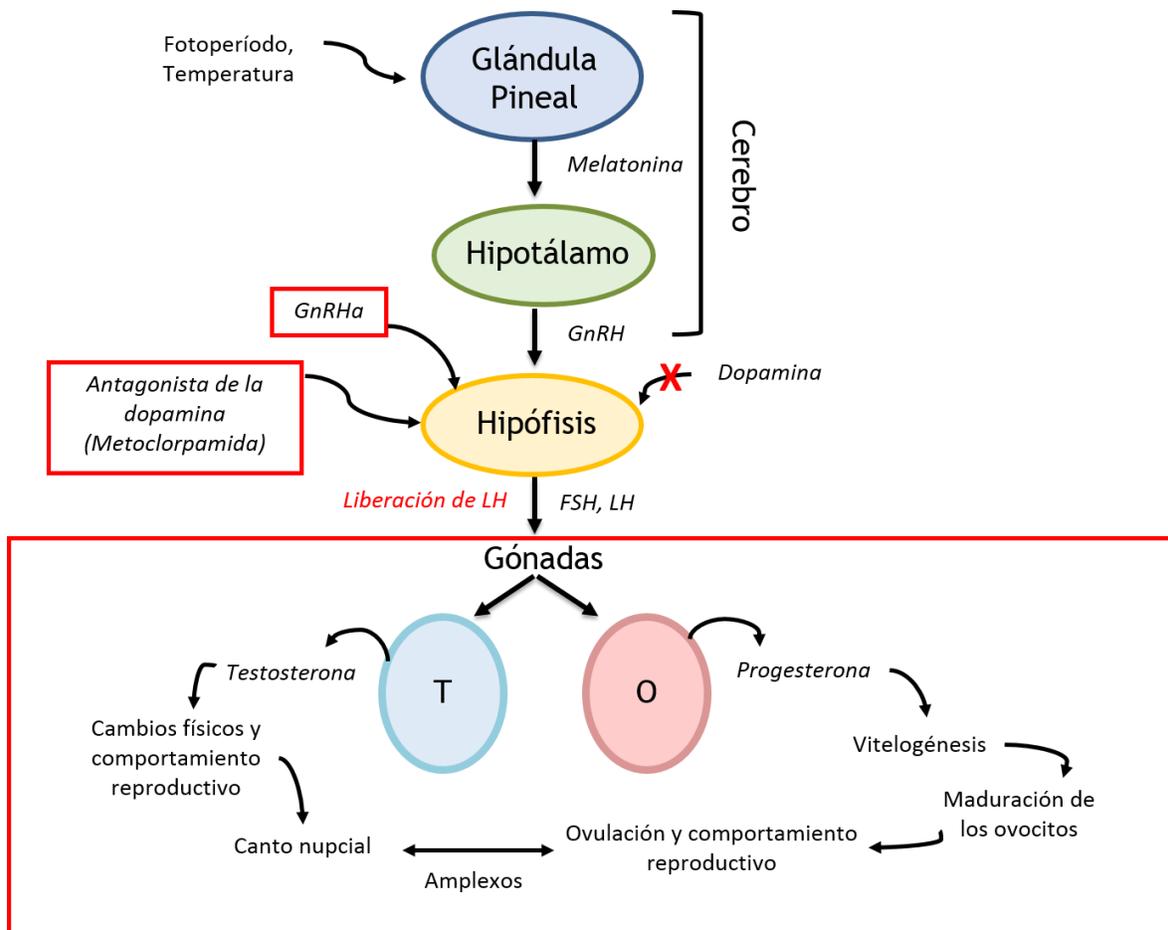


Figura 9. Vías hormonales en anfibios. Las señales ambientales inician la producción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el cerebro. La influencia de GnRH o la inyección de GnRha estimulan a la hipófisis para producir gonadotropinas. Es posible que el sistema dopaminérgico central bloquee esta vía a través de la dopamina. La inyección de un antagonista (metoclorpamida) bloquea la acción de la dopamina. Las gonadotropinas estimulan los testículos para producir testosterona y los folículos para producir progesterona. La testosterona promueve la producción de espermatozoides y el comportamiento reproductivo en los machos, y la progesterona promueve la maduración de los ovocitos y la ovulación en las hembras. Los nombres de las hormonas se indican en *italica*. LH: hormona luteinizante. FSH: hormona folículo estimulante. T: testículo; O: ovario. En recuadros y letras rojas se indican las vías de la inducción artificial. Modificado de Browne y Zippel (2007).

Variables morfométricas como predictores del estado reproductivo

Si bien existen diversos protocolos de inducción hormonal de la reproducción para anfibios anuros en laboratorio y con diferentes metodologías (Licht 1979; Licht y Porter 1987; Herkovits y Pérez Coll 1991; Browne y Zippel 2007; Trudeau y col. 2010), un factor que es clave y merece especial atención, es caracterizar el estadio reproductivo (o de madurez gonadal) de las hembras previo al suministro hormonal, ya que los ovocitos deben haber completado su maduración. Se ha visto en algunos casos que hormonas utilizadas para inducir la ovulación (o la espermiación) con éxito en ciertas especies de anuros, resultan ineficaces en otras especies, ó también puede ocurrir que resulten efectivas en los machos, pero no sean efectivas en las hembras de la misma especie (Culley y col. 1982). Esta falta de efectividad al aplicar los procedimientos propuestos, está directamente relacionada con la dificultad de realizar una adecuada selección de las hembras, es decir, seleccionar correctamente aquellas hembras que posean ovocitos en condiciones preovulatorias en sus ovarios (Dumont 1972; Penkala 1978; Whitaker 2001).

Las hembras de *L. latrans* no cuentan con caracteres sexuales secundarios estacionales que permitan conocer el estado reproductivo, tal como ocurre en los machos de esta especie (Ceï 1948). Sin embargo, se conoce que en anfibios, el grado de madurez aumenta en forma proporcional al incremento del peso de la hembra (Browne y Zippel 2007) y a la longitud hocico-cloaca (LHC, Lüddecke 2002). De esta forma, algunas variables morfométricas podrían ser de utilidad a la hora de predecir la condición reproductiva. Asimismo, se ha visto que la fecundidad: N° de ovocitos maduros en el ovario (Crump 1974), se correlaciona positivamente con el tamaño (LHC) de las hembras en especies con hábitos más terrestres que acuáticos (Perotti y col. 1997), aunque otros autores reportaron la ausencia de correlación entre esos parámetros (Schaefer y col. 2006). De lo antedicho se evidencia la importancia de estudiar las relaciones entre dichas variables como predictores de las condiciones internas, ya sea a través de morfometría geométrica, o de manera más sencilla, confeccionando índices morfométricos simples (con relaciones de pocas variables). Un claro ejemplo está representado por la utilización del índice de condición corporal de Fulton (Fulton 1904; Lüddecke 2002; Gendron y col. 2003; Stevenson y Woods 2006), el cual se determina por la relación entre el peso corporal/LHC³; y que es un indicador del bienestar general de los individuos. Este índice de condición somática, en las hembras de *Dendropsophus labialis*, está relacionado con el número de ovocitos

que se ovularán en el próximo desove y en la capacidad de canalizar la energía en el crecimiento del huevo (Lüddecke 2002).

Estrechamente relacionada con la idea de determinar la condición reproductiva de las hembras en función de variables externas, Culley y col. (1982) realizaron una investigación con hembras de *Lithobates catesbeianus* con el objetivo de generar un índice morfométrico que permita predecir la condición reproductiva de las hembras de esa especie. De este modo, generaron un índice de condición reproductiva (ICR), el cual se calcula mediante la relación entre el diámetro del vientre (medido en el área más ancha del vientre, justo antes de la vértebra sacra) de las hembras (mm)/diámetro interocular externo (mm). Este índice permitió establecer, para las hembras de *Lithobates catesbeianus*, un valor umbral al cual existe un porcentaje de ovocitos maduros que permite la ovulación por inducción hormonal (Culley y col. 1982).

En particular para *L. latrans*, existen datos de inducción artificial de la espermiación por administración hormonal de GnRH α (Pereira y col. 2013), pero no se conocen hasta el momento, datos de inducción artificial de la reproducción con resultados positivos en hembras.

En este marco conceptual, el objetivo de este capítulo fue analizar la relación entre distintas variables morfométricas en hembras de *L. latrans*, con la intención de encontrar un índice que permita realizar selecciones de hembras en condición preovulatoria para lograr inducciones de la reproducción exitosas. Además, se intentó actualizar la información de algunas características de la biología reproductiva de la especie que resultan de relevancia a la hora de plantear la inducción de la reproducción y la cría de una especie en cautiverio, como las características del micro-habitat de desove y parámetros morfométricos de los nidos de espuma, así como el número de huevos por desove (fecundidad).

Hipótesis y objetivos

En este marco se plantean las siguientes hipótesis:

- ☞ El índice que mejor infiere el estado reproductivo en las hembras es el Índice de Condición Reproductiva propuesto por Culley y col. (1982).
- ☞ El método AMPHIPLEX permite inducir la reproducción con éxito en ejemplares adultos de *L. latrans* en cautiverio.

Como objetivo de este capítulo se propone:

- ☞ Determinar las variables e índices morfométricos a partir de caracteres externos, que permitan inferir de manera no invasiva el estado reproductivo de hembras y machos adultos de *L. latrans*.
- ☞ Explorar, determinar y actualizar algunas condiciones propias del micro-hábitat de desove (temperatura, profundidad, asociación con la vegetación), así como parámetros de los nidos de espuma (tamaño, volumen, número de huevos) en poblaciones locales de *L. latrans*.
- ☞ Poner a punto el método de inducción artificial de la reproducción AMPHIPLEX para *L. latrans*, con la finalidad de obtener larvas en los momentos del año que sea necesario.

Metodología

Área de estudio

Se seleccionaron como sitio de estudio 5 charcas situadas en las afueras de la ciudad de La Plata, en áreas rurales con escasa perturbación antrópica (Figura 10) para realizar las actividades de monitoreo de las poblaciones y colecta de ejemplares adultos de *L. latrans*. Los sitios 1, 2, 3 y 4 (Figura 10 A-D) pertenecen a la planicie de inundación del arroyo El Pescado en su tramo medio por lo que sufren la inundación periódica con formación de charcas temporarias, donde se realizaron los monitoreos y colecta de ejemplares. En el sitio 1 (Estancia San Rafael; 35° 1'25.96"S, 57° 51'18.41"O; Figura 10 A) se desarrolla la actividad de cría de ganado por pastoreo, y no existen a la fecha, actividades de cultivo. El sitio 2 (Establecimiento Santa Ana; 35° 1'15.99"S, 57° 51'25.23"O; Figura 10 B) es un establecimiento donde se realiza cría de ganado por pastoreo y suele realizarse la siembra de pasturas. No cuenta con actividades antrópicas asociadas en los sectores más cercanos al arroyo, donde recibe los aportes de las crecidas del mismo y del agua proveniente de las lluvias (Figura 10 B). El sitio 3 (El Edén; 35° 1'6.79"S, 57° 51'43.61"O; Figura 10 C), es un establecimiento en el que se desarrolla la actividad de cría de ganado por pastoreo y cuenta con un sitio inundable donde se acumulan los aportes de las crecidas del arroyo y del agua proveniente de las lluvias (Figura 10 C). El sitio 4 (Guille-Gremblin; 34° 59'10.70"S, 57° 49'22.28"O; Figura 10 D), es un establecimiento en el que no se realizan actividades de tipo agropecuario ni ningún otro tipo de actividad antrópica. Cuenta con un área deprimida donde se acumula agua de las crecidas del arroyo y de las lluvias (Figura 10 D). El sitio 5 (Charca Ángel; 34° 59'42.50"S, 57° 51'46.03"O; Figura 10 E), se encuentra localizado en el Barrio Parque Sicardi, La Plata, provincia de Buenos Aires. Es un establecimiento en el cual se desarrollaba la cría de ganado por pastoreo, pero que a la fecha de comienzo de los monitoreos tal actividad había sido abandonada, y con posterioridad a la finalización de los mismos, se procedió al loteo y venta del predio (que hoy es un vecindario en construcción). El sitio contaba con un área deprimida donde se acumulaba agua de lluvia, formándose charcas temporarias (Figura 10 E).



Figura 10. Sitios de estudio seleccionados para la realización de monitoreos y coleta de ejemplares adultos, huevos y larvas de *L. latrans*. A: Sitio 1 (Estancia San Rafael). B: Sitio 2 (Establecimiento Santa Ana). C: Sitio 3 (Charca El Edén). D: Sitio 4 (Charca Guille-Gremblin). E: Sitio 5 (Charca Ángel).

Monitoreo de poblaciones de anfibios y variables morfométricas asociadas a la reproducción

Para lograr una inducción hormonal efectiva utilizando el método AMPHIPLEX es necesario conocer diversas características de la biología reproductiva de la especie. Entre ellas, el lugar del sitio reproductivo desde donde cantan, el tipo de ambiente (la necesidad o no de sustrato), como realizan el amplexo, el tipo de amplexo, la profundidad a la que realizan el mismo, el modo en el que realizan la puesta, el tipo de puesta, si la misma se encuentra adherida a algún tipo de sustrato específico, entre otras características que constituyen el modo reproductivo de la especie. Además, es fundamental conocer las características externas que nos permitan reconocer y seleccionar machos y hembras en condición reproductiva. Concretamente para lograr una reproducción exitosa, es necesario conocer la relación existente entre distintas variables morfométricas externas e internas, y los valores (y variaciones) de las mismas en animales adultos a lo largo del ciclo reproductivo, y asociado con los eventos reproductivos de poblaciones naturales.

Para obtener y registrar estos valores se planteó realizar un monitoreo continuo de las poblaciones que habitaban en los 5 sitios de estudio entre noviembre 2013 y febrero 2016. Con el objetivo de cumplir con las reglamentaciones y leyes vigentes, se solicitó un permiso de colecta de huevos, larvas y adultos de *L. latrans* en la Dirección de Flora y Fauna, Ministerio de Asuntos Agrarios de la provincia de Buenos Aires (Expte. 22500-33442/16, Disposición N° 54) y se comenzó con los monitoreos según se detalla en el ANEXO I.

Por otra parte, con la intención de conocer la variación en las variables morfométricas e índices como predictores de la condición reproductiva, se colectaron machos y hembras en cada estación del año. El inicio de la época reproductiva se determinó de acuerdo al registro de vocalizaciones (canto nupcial) en los sitios de estudio. A los individuos colectados en esta etapa se los determinó como individuos “en condición reproductiva”. Una vez ocurrida la reproducción, la que se determinó mediante la observación de amplexos y/o presencia de nidos de espuma (o de larvas en su defecto) en los sitios de estudio, se colectaron individuos denominados “en condición post-reproductiva”, prefiriendo aquellos que se hallaban dentro o en las cercanías de los nidos.

Cada uno de estos animales fue fotografiado, capturado, se le asignó un número de identificación único y se lo trasladó al laboratorio en bolsas plásticas según Angulo y col.

(2006), en donde se realizaron mediciones de las siguientes variables: longitud hocico-cloaca (LHC), distancia inter-ocular externa (DIOE), diámetro del vientre (DV), peso corporal (PC), peso de la gónada (PG), de los cuerpos grasos (CG) y del hígado (H). A partir de estos datos, se calcularon los siguientes índices: factor de condición corporal ($K = P/LHC^3$), índice de condición reproductiva ($ICR = DV/DIOE$), índice gonadosomático ($IGS = (G/P)*100$), índice de cuerpos grasos ($ICG = CG/P$), e índice hepatosomático ($IHS = (H/P)*100$) (Loumbourdis y Vogiatzis 2002; Stevenson y Woods 2006; Maitra y col. 2007; Freitas y col. 2011; Brodeur y col. 2012; Othman y col. 2016). La variable peso del cuerpo fue determinada en gramos mediante una balanza digital portátil de 0,01 g de precisión marca Scout Pro (Ohaus, EEUU de América). Los diferentes órganos fueron pesados en gramos en balanza digital de 0,001 g de precisión marca Acculab (Grupo Sartorius, EEUU de América). Las otras medidas fueron tomadas en milímetros mediante un calibre digital de 0,01 mm marca UPM modelo 111-811Y (China).

Se registraron además, variables *in situ* y *ex situ* (en el laboratorio) de los nidos de espuma con el objetivo de caracterizar el micro-habitat de desove y describir ciertas características de los nidos de espuma y otros parámetros relevantes a la hora de plantear la reproducción y cría en cautiverio de una especie. Las variables relevadas fueron: profundidad del agua, forma, diámetro mayor y menor del nido, y diámetro del orificio central (para nidos de forma anular, Figura 11); volumen y número de huevos por desove (fecundidad). Las medidas morfométricas tomadas *in situ* fueron realizadas con un calibre tipo Vernier de 0,01mm de precisión. Para el registro de las variables *ex situ*, se colectaron porciones de cada nido de espuma, las cuales podían variar entre un 1/8 a 1/4 del nido (o de modo aproximado, un 10-25%), de acuerdo al tamaño de los mismos, debido a la imposibilidad de extraer porciones menores a 1/4 en nidos de tamaño pequeño. Las porciones colectadas se colocaron en bolsas plásticas, con abundante agua del lugar y una porción equivalente de aire, y fueron llevadas al laboratorio (Angulo y col. 2006). El volumen de la porción colectada del nido de espuma se determinó utilizando una probeta de vidrio de 1000 ml y el número de huevos colectados por conteo individual con una pipeta plástica. Estos datos fueron registrados sobre la porción colectada, una vez trasladada al laboratorio, y con ellos se estimó el valor aproximado de la totalidad del nido.

Todos los datos, tanto del microhabitat de las puestas, como de las variables morfométricas relevadas en campo y laboratorio, fueron registrados en planillas previamente preparadas para facilitar y unificar el trabajo (Ver Anexo II) confeccionadas según Natale (2006) con modificaciones menores.



Figura 11. Monitoreo de poblaciones naturales de *L. latrans*. a) Sitio 1, uno de los sitios reproductivos estudiados. b) nido de espuma de *L. latrans*. c) colecta de una porción del nido de espuma para su posterior estudio en laboratorio. d) monitoreo de variables morfométricas externas en adultos reproductivos *in situ*.

Inducción hormonal de la reproducción por método AMPHIPLEX

Método Amphiplex

El método AMPHIPLEX (Trudeau y col. 2010) consiste en la inyección intraperitoneal de una mezcla de 0,4 µg/g de peso corporal de des-Gly10, D-Ala6, Pro-LHRH (desde ahora GnRH-A) + 10 µg/g de peso corporal de Metoclopramida (Clorhidrato de metoclopramida, antagonista dopaminérgico) disueltos en solución salina (0,7% NaCl). La inyección se realiza una sola vez, en ambos sexos, y al mismo tiempo.

Priming o cebado

El “priming” o “cebado” consiste en la utilización de dosis secuenciales (anovulatorias) de hormonas para inducir la ovulación. La dosis anovulatoria generalmente es mucho más baja (10-50%) que la dosis ovulatoria y se ha comprobado que induce la maduración de los ovocitos en *X. laevis*. Estas dosis suelen administrarse entre 12 a 72 horas antes de la dosis ovulatoria. La dosis variará según la especie, su madurez y las influencias ambientales (Browne y col. 2006; Browne y Zippel 2007).

Inducción de la reproducción en *L. latrans*

Entre los años 2012 y 2016, se realizaron 5 experimentos de inducción hormonal de la reproducción. Los 5 experimentos de reproducción se realizaron en época estival con individuos colectados en los sitios de estudio previamente mencionados en las secciones anteriores. En algunos casos se utilizaron además, individuos adultos provenientes de los sitios de estudio mencionados y mantenidos en cautiverio durante un periodo de tiempo de hasta dos años. Previo a la colecta, se prepararon los tanques de reproducción, los cuales consistieron en 4 tanques de fibra de vidrio o polietileno (Figuras 12a y 13) de 1000L de capacidad y de 1m de diámetro. Cada tanque fue preparado con un volumen de agua (ver detalle en cada experimento) y algún tipo de sustrato, el cual podía ser de origen natural (vegetación) o artificial (Figura 13). En todos los experimentos, los tanques fueron ubicados al aire libre y tapados con media sombra negra para evitar el ingreso de predadores y el exceso de luz solar (Figura 12a). No se utilizaron grupos control en los experimentos de inducción de la reproducción, con la idea de maximizar el N de parejas inyectadas en cada evento. Una vez realizada la colecta de los ejemplares adultos, se registraron las variables morfométricas, y las hembras en posible condición reproductiva fueron elegidas en función del tamaño, prefiriendo aquellas que presentaron mayor PC y

LHC, con el objetivo de asegurar el trabajo con individuos adultos. Los machos fueron elegidos teniendo en cuenta la presencia de caracteres sexuales secundarios estacionales. Finalmente, cada pareja fue armada seleccionando machos y hembras de similar tamaño. En cada experimento se colocó una única pareja por tanque de reproducción, contando con entre dos a cuatro réplicas dependiendo del experimento (Tabla 2), inyectándose un total de 12 parejas entre los 5 experimentos. Una vez formadas las parejas, se le asignó un número a cada una y se las depositó en los tanques de reproducción según diseño experimental (Tabla 2), durante al menos 48 horas, para su aclimatación y para descartar la eventual reproducción por causas naturales. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a la inducción hormonal mediante el método AMPHIPLEX. Para la inyección de los individuos, se utilizaron jeringas de insulina de 100 U.I. y la inyección se ajustó a un volumen de $5\mu\text{l}/100\text{ g}$ de peso corporal por individuo (Figura 12). En algunos experimentos (ver detalle en sección siguiente) y debido a no observarse desove en los experimentos previos, se utilizó además, una dosis anovulatoria (“priming”), 24 horas antes de la inyección ovulatoria, con el objetivo de inducir la maduración de los ovocitos. La dosis de priming administrada fue de $0,04\ \mu\text{g}/\text{g}$ de peso corporal de GnRH-A disuelto en solución salina (0,7% NaCl), y sólo en caso de no haberse registrado desove, se procedió a la inyección mediante el método AMPHIPLEX 24 h después.

Las parejas fueron monitoreadas diariamente de 1 a 3 veces por día, durante 96 horas, con el objetivo de determinar el efecto sobre las siguientes variables: canto nupcial por parte de los machos, observación de amplexos y presencia de desove o nido de espuma. Además se registraron variables físico-químicas del medio: temperatura del aire dentro de los tanques, temperatura del agua concentración de oxígeno disuelto, conductividad y pH. Una vez finalizados los experimentos los animales fueron retirados de los tanques reproductivos con el objetivo de registrar las siguientes variables (PC, LHC, DV, DIOE, K, ICR) luego de la reproducción. Además, se tomaron los datos morfométricos del nido: Diámetro mayor, diámetro menor, forma del nido de espuma, volumen y número de huevos, con el objetivo de determinar si los parámetros de los nidos de espuma obtenidos de la inducción hormonal diferían de los observados en condiciones naturales.

Experimento #1:

El primer experimento se llevó a cabo entre los días 20 y 23 de octubre de 2012. El día 18 de octubre, se seleccionaron individuos macho y hembra que habían sido colectados en

campo y mantenidos en cautiverio durante un mes y medio. Se registró el peso de los individuos y se armaron 3 (tres) parejas, las cuales permanecieron 48 horas en las cámaras de reproducción hasta el día del experimento. En este caso, las cámaras de reproducción fueron tanques de fibra de vidrio de 1000 L de capacidad y 1 m de diámetro con un volumen de agua de bioensayo de 30 cm, y que tenía un sector sin agua, con granito partido previamente lavado (Figura 13a). La solución de inducción según método AMPHIPLEX se preparó en el momento. En este caso se utilizó GnRH-A (L4513, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) y Metoclopramida (M0763, Sigma-Aldrich Corporation). La inyección se realizó a las 13.00 h y en este caso no se utilizó “priming”. Se registraron diariamente los siguientes indicadores de actividad reproductiva: emisión de canto nupcial, observación de amplexos y/o nidos de espuma, sustrato sobre el que se encuentran los individuos, temperatura del aire y temperatura del agua. Como los tanques de reproducción estaban ubicados al aire libre, se registró la presencia de fenómenos climáticos como por ejemplo, la ocurrencia de precipitaciones.

Experimento #2:

El segundo experimento de inducción comenzó el día 23 de octubre de 2012 y finalizó el 26 de octubre del mismo año. En esta oportunidad, se volvió a inyectar las 3 parejas que no habían desovado en el experimento #1. Se utilizaron las mismas cámaras de reproducción que habían sido utilizadas con anterioridad, pero fueron modificadas mediante el agregado de sustrato natural (vegetal), además del artificial que ya poseía, constituyéndose en este caso un tipo sustrato de mixto (Figura 13b). La solución de inducción hormonal fue preparada en el momento pero en este caso el GnRH-A utilizado tuvo otro origen comercial (H-4070, Bachem®). Los individuos fueron inyectados según el método AMPHIPLEX (sin “priming”) a las 13:30 h. Diariamente se registraron los parámetros biológicos y bioquímicos mencionados en el Experimento #1.

Experimento #3:

Se llevó a cabo entre el 21 y 24 de diciembre de 2013. El día 19 de diciembre se seleccionaron 4 (cuatro) parejas que se colocaron en las cámaras de reproducción. Éstas consistieron en tanques de polietileno de 1000 L de capacidad y aproximadamente 1 m de diámetro, preparados con agua de red filtrada y declorinada (15 cm de profundidad), un sustrato artificial (granito partido) y abundante vegetación acuática (Figura 13b). Los individuos fueron en su mayoría procedentes de los sitios de estudio mencionados con

anterioridad y mantenidos en cautiverio durante más de un año, excepto por dos hembras que fueron colectadas 48 horas antes del experimento en el Sitio 1. A cada uno de los individuos se le tomaron las variables morfométricas previamente mencionadas (PC, LHC, DV, DIOE, K, ICR). El criterio de selección de los machos en posible condición reproductiva fue el mismo que en los experimentos anteriores, pero en el caso de las hembras se eligieron aquellas que tuvieron valores del diámetro del vientre mayores. El día 21 de diciembre a las 19:30 se inyectó el “priming” y el 22 de diciembre a la misma hora se inyectó solución de inducción hormonal según método AMPHIPLEX preparada como en el Experimento #2. Se registraron diariamente las mismas variables que en los experimentos #1 y #2.

Experimento #4:

Se realizó entre los días 19 y 23 de febrero de 2016. El día 17 de febrero se seleccionaron los individuos y se armaron 4 (cuatro) parejas, las cuales fueron ubicadas en los tanques de reproducción. La selección de los machos en condición reproductiva se realizó de acuerdo al método utilizado en los experimentos anteriores, la selección de las hembras se realizó teniendo en cuenta los valores de ICR en base a resultados obtenidos de los monitoreos de poblaciones naturales. Las cámaras de reproducción consistieron en tanques de polietileno de 1000 L de capacidad y aproximadamente 1m de diámetro, las cuales estaban preparadas con agua de red filtrada y declorinada (10 cm de profundidad) y abundante vegetación acuática (Figura 13c). El 19 de febrero a las 20:00 horas se inyectó la dosis de “priming” y el 20 de febrero en el mismo horario los individuos fueron inyectados con solución de inducción hormonal según método AMPHIPLEX. Las soluciones fueron preparadas en el momento utilizando los reactivos preparados como para los experimentos #2 y #3. Se registraron diariamente las variables biológicas previamente mencionadas. A las 48 horas de iniciado el experimento se registraron además las siguientes variables fisicoquímicas en el agua: temperatura, oxígeno disuelto, conductividad y pH así como la temperatura del aire. Una vez terminado el experimento, se sacrificaron los individuos de las parejas 1, 2 y 3, registrándose las variables morfométricas externas e internas.

Experimento #5:

Se realizó entre los días 25 y 29 de febrero de 2016. El día 23 de febrero se seleccionaron 2 (dos) individuos colectados del campo, de acuerdo a los criterios empleados en el

experimento #4 para la selección de machos y hembras en condición reproductiva. Se formó entonces una pareja, y además se volvió a inducir la pareja 4 del experimento anterior, ubicándose ambas parejas en sendos tanques de reproducción. Se utilizaron los mismos tanques de reproducción que habían sido utilizados en el experimento #4 (Figura 13c). El 25 de febrero a las 20:00 h los individuos fueron inyectados con “priming” y el 26 de febrero en el mismo horario, fueron inyectados con solución de inducción hormonal según método AMPHIPLEX. Las soluciones fueron preparadas en el momento utilizándose los reactivos preparados como para los experimentos #2, #3 y #4. Se registraron diariamente las variables biológicas previamente mencionadas. El 29 de febrero se relevaron las condiciones fisicoquímicas del agua y aire del mismo modo que se realizó en el experimento #4 y se dio por terminado el experimento. Finalmente, los individuos fueron sacrificados registrándose las variables morfométricas externas e internas, con el objetivo de conocer el estado reproductivo de los individuos.



Figura 12. Inducción hormonal AMPHIPLEX en *L. latrans*. a) Tanques de reproducción de polietileno. b) Inyección intraperitoneal en un ejemplar macho de *L. latrans*. c) Inyección intraperitoneal en un ejemplar hembra de *L. latrans*.



Figura 13. Detalle del interior de los tanques de reproducción utilizados en los experimentos de inducción hormonal. a) Tanque de reproducción utilizado en experimento 1. b) Tanque de reproducción utilizado en experimentos 2 y 3. c) Tanque de reproducción utilizado en experimentos 4 y 5.

Análisis estadístico

Los datos de monitoreos de poblaciones naturales, específicamente los datos morfométricos utilizados para determinar diferencias entre individuos en condiciones reproductiva y post-reproductiva fueron seleccionados aplicando los siguientes criterios: (1) Filtrado por fechas: se seleccionaron aquellos individuos colectados en las estaciones de primavera y verano (Septiembre a Febrero) para asegurar el análisis con individuos en condiciones reproductivas. (2) Por tamaño mínimo. En este caso se filtraron los individuos en condición reproductiva y postreproductiva cuyos valores de LHC estaban por debajo del límite de confianza inferior (LCI 95%) del set de datos, como medida para asegurar el trabajo con ejemplares maduros. Se discriminó en este caso el set de datos de machos y de hembras, debido al conocido dimorfismo sexual que tiene en cuenta el tamaño del animal. Posteriormente, se realizó una Prueba *t* de Student con cada variable e índice calculados, entre los grupos en condición reproductiva y post-reproductiva para identificar aquellas variables e índices que mejor permitieran diferenciar entre ambos grupos. En aquellos casos que los datos no superaron los supuestos de normalidad, se realizó el test no paramétrico de Mann-Whitney. Asimismo, se determinó la variable interna PG como indicadora de madurez gonadal y se realizó un análisis de correlación entre las variables e índices calculados y el peso de la gónada, con el objetivo de identificar aquella que mayor información aporta para conocer el estado reproductivo de las hembras. Los resultados de los experimentos de reproducción mediante el método AMPHIPLEX, y de las variables morfométricas de machos y hembras utilizados en los experimentos, fueron analizados mediante estadística descriptiva. Para la realización de todas las pruebas estadísticas se utilizó el programa GraphPad Prism® y se eligió un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ según Zar (2010).

Resultados

Monitoreo de poblaciones de anfibios y variables morfológicas asociadas a la reproducción

Adultos en condición reproductiva y post-reproductiva

Se colectó un total de 102 individuos, 47 machos y 55 hembras, entre noviembre de 2013 y febrero de 2016. Los resultados de la estadística descriptiva aplicada a los datos colectados en campo dieron como resultado: para la LHC de las hembras un LCI 95% = 8,12 cm. Las hembras en condición reproductiva y post-reproductiva con un valor de LHC inferior a 8,12 cm fueron eliminadas del set de datos (N° de ID: 3, 4, 6, 7, 9, 11, 21, 34, 57, 70, 91, 101). En el caso de los machos se determinó un LCI 95% = 9,37 cm, eliminándose del set de datos a los individuos con un LHC inferior a 9,37 cm (N° ID: 8,19, 29, 33, 35, 37, 77, 100).

Los índices que estadísticamente mostraron diferencias significativas entre hembras en condiciones reproductivas y post-reproductivas fueron un índice morfométrico externo, el ICR (Fig. 14 a; $t = 4,92$; $df = 34$; $p < 0,0001$), y un índice morfométrico interno, el IGS (Fig. 14 b; $t = 13,12$; $df = 34$; $p < 0,0001$). El Índice externo K también permitió diferenciar entre ambos grupos de hembras ($t = 2,08$; $df = 34$; $p = 0,045$), aunque con menor grado de significancia. Por otro lado, el ICG no mostró diferencias entre los dos grupos de hembras evaluados ($U = 103$; $p = 0,144$) al igual que los resultados observados para el IHS ($t = 0,39$; $df = 34$; $p = 0,697$).

Otras variables que merecen mencionarse fueron el PG ($t = 7,13$; $df = 34$; $p < 0,0001$) y el DV ($t = 4,64$; $df = 34$; $p < 0,0001$). El PC también permitió establecer diferencias entre ambos grupos de hembras ($t = 2,44$; $df = 34$; $p = 0,020$) observándose diferencias significativas. El resto de las variables no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre hembras en condición reproductiva y post-reproductiva. Se estableció entonces al peso de la gónada como la variable indicativa directa de madurez gonadal. Los resultados del análisis de correlación entre los índices morfométricos externos y el PG indicaron que el ICR es el índice externo que muestra una mejor correlación ($p < 0,0001$; $r = 0,64$; $N = 36$), aunque el índice K también mostró una correlación positiva ($p = 0,0002$; $r = 0,58$; $N = 36$).

De acuerdo a estos resultados, se determinó al valor promedio del ICR en el grupo reproductivo ($ICR = 2,53$), como el mínimo valor al cual las hembras se encuentran maduras para reproducirse, y en el cual la inducción hormonal de la reproducción podría resultar efectiva. Estos datos fueron utilizados a la hora de seleccionar hembras en condición reproductiva en los experimentos de inducción hormonal de la reproducción #4 y #5 que veremos en la siguiente sección. Los datos morfométricos para hembras en condición reproductiva y post-reproductiva se resumen en la Tabla 1.

No se observaron diferencias significativas al comparar las variables e índices morfométricos de los individuos machos en condición reproductiva y post-reproductiva ($p > 0,005$). Los datos morfométricos para machos en condición reproductiva y post-reproductiva se resumen en la Tabla 1.

Datos biológicos de los nidos de espuma

Como producto de los monitoreos se registró un total de 36 nidos de espuma. Los resultados de los análisis realizados mostraron que el 100% de los nidos fueron depositados sobre el agua y adheridos a la vegetación. La temperatura promedio del agua a la que fueron depositados los nidos fue de $25,61 \pm 1,2$ °C y la profundidad promedio de $10,24 \pm 3,91$ cm.

Los nidos fueron encontrados presentando distinta morfología; la forma predominante resultó ser la amorfa (Figura 15a) con un 68,75% de ocurrencia; luego la forma anular (Figura 15b), que fue observada en un 25% de los casos; y finalmente la forma circular (Figura 15c) observada en un 6,25%. El diámetro mayor promedio de los nidos fue de $42,77 \pm 15,09$ cm, y el diámetro menor promedio de $26,83 \pm 10,67$ cm. En los nidos que contaban con un orificio central, el diámetro promedio del mismo fue de $4,21 \pm 1,07$ cm. El volumen promedio registrado en los nidos de espuma fue de $880 \pm 775,6$ ml y el número de huevos contados en los nidos tuvo un valor promedio de 23.236 ± 10.874 huevos.

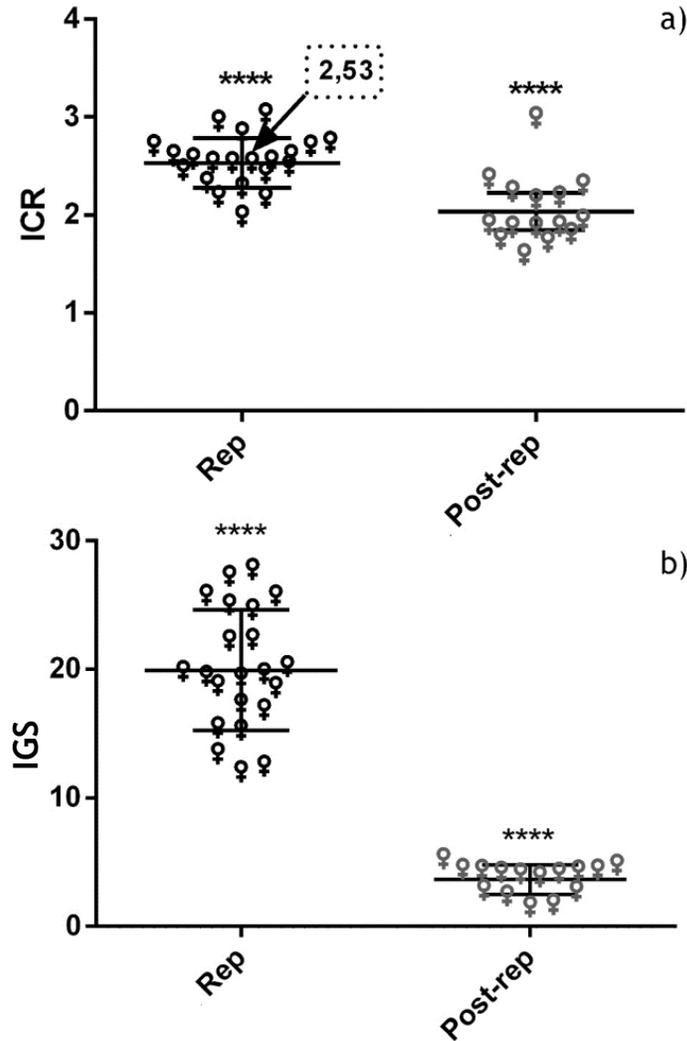


Figura 14. Índices morfométricos en hembras en condición reproductiva y post-reproductiva. a) Índice de condición reproductiva (ICR) en hembras en condición reproductiva y post-reproductiva. b) Índice gonadosomático (IGS) en hembras en condición reproductiva y post-reproductiva. Rep: valores de los índices en hembras en condición reproductiva. Post-rep: valores de los índices en hembras en condición post-reproductiva. Flecha y recuadro indican el valor promedio del ICR. **** indica una diferencia $p < 0,0001$ entre las hembras en condición reproductiva y post-reproductiva.

Tabla 1. Variables e índices morfométricos en hembras y machos en condición reproductiva y post-reproductiva.

Variable	Hembras		Machos	
	Rep	Post-rep	Rep	Post-rep
PC	81,63 ± 23,14	65,56 ± 12,49	93,45 ± 21,24	98,74 ± 36,07
LHC	9,25 ± 0,71	9,006 ± 7,39	9,95 ± 1,62	9,62 ± 1,12
K	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,04	0,11 ± 0,01
DIOE	19,82 ± 1,85	20,12 ± 1,49	NA	NA
DV	50,02 ± 5,84	40,78 ± 5,97	NA	NA
ICR	2,53 ± 0,26	2,04 ± 0,35	NA	NA
H	1,76 ± 0,79	1,37 ± 0,33	1,87 ± 0,56	1,67 ± 0,70
IHS	2,03 ± 0,69	2,10 ± 0,42	1,96 ± 0,67	1,69 ± 0,37
PG	16,43 ± 7,56	2,39 ± 0,86	0,21 ± 0,09	0,20 ± 0,07
IGS	19,95 ± 4,70	3,64 ± 1,15	0,22 ± 0,07	0,21 ± 0,06
CG	0,88 ± 1,25	0,79 ± 0,66	1,28 ± 1,09	1,33 ± 1,44
ICG	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
N	21 ± 0,00	15 ± 0,00	25 ± 0,00	17 ± 0,00

Valores expresados como la media ± desvío estándar. PC: peso del cuerpo (g). LHC: longitud hocico-cloaca (cm). K: índice de condición corporal. DIOE: distancia interocular externa (mm). DV: diámetro del vientre (mm). ICR: índice de condición reproductiva. H: Peso del hígado (g). IHS: índice hepatosomático. PG: peso de la gónada (g). IGS: índice gonadosomático. CG: peso de los cuerpos grasos (g). ICG: índice de cuerpos grasos.



Figura 15. Nidos de espuma de *Leptodactylus latrans*. a: forma amorfa; b: forma anular; c: forma circular.

Resultados adicionales producto de los monitoreos

Como resultado adicional de los monitoreos, se puede destacar el hallazgo de nidos comunales (Figura 16a y b) y la actividad de machos satélite (Figura 16c y d). Estas observaciones se produjeron el día 06 de noviembre de 2014, entre las 21:00 y 23:00 h en el Sitio 5. La temperatura media de ese día fue de 18,4°C alcanzando una temperatura máxima de 23°C según datos aportados por el Servicio Meteorológico Nacional. Este evento reproductivo fue precedido por una serie de precipitaciones de casi una semana de duración entre los días 28/10 y 3/11/2014 registrándose 176 mm acumulados según datos aportados por el Servicio Meteorológico Nacional. En el sitio de estudio se evidenciaron grandes extensiones de terreno inundado y un gran coro de machos vocalizando que superaba los 50 individuos. Los nidos comunales, eran nidos de gran tamaño, de forma amorfa y donde se podía observar más de una pareja en actividad, o incluso varios machos vocalizando (Figura 16 a y b). Los machos satélite, se describen como machos que permanecen pasivos en las cercanías de un macho vocalizando, a una distancia inferior a 1 m, sin emitir vocalizaciones (Arak 1988). Incluso, se pudo observar que al retirar una pareja del nido de espuma para ser trasladada al laboratorio, el nido era ocupado en cuestión de minutos por otra pareja, la que continuaba con amplexo y desove la actividad que había comenzado la pareja precedente. Asimismo, los machos satélite, eventualmente, se sumergían por debajo del nido, llegando en ocasiones a separar la pareja en plena actividad reproductiva, y hasta pudiéndose observar escenas de pelea entre los machos, quienes trababan sus cuerpos en lucha, agarrándose con sus grandes patas anteriores y con su zona ventral en contacto entre sí, a la par que intentaban sumergir la cabeza del “contrincante” en el agua.



Figura 16. Nidos comunales y observación de machos satélite en *L. latrans*. a y b: nidos comunales donde se puede observar 3 machos en un nido de espuma. b y c: observación de machos satélite en la periferia de los nidos de espuma. Los números en negro indican la posición y número de machos en el nido de espuma. Las flechas blancas señalan la posición de los machos satélite. La estrella blanca indica la posición de una hembra.

Inducción hormonal de la reproducción por método AMPHIPLEX

Los datos de variables morfométricas de las parejas experimentales se resumen en la Tabla 2, mientras que los datos de variables fisicoquímicas del agua y aire se resumen en la Tabla 3.

Los resultados de las variables biológicas evaluadas diariamente en cada experimento se detallan a continuación:

Experimento #1:

20/10/12:

- 13:00 h. Se administra inyección hormonal según método AMPHIPLEX (sin “priming”).
- 19:38 h.
 - Registro auditivo de canto nupcial. No se pudo corroborar de que macho procedía.
- 21:25 h.
 - Pareja 1: ♂ en agua, ♀ sobre el sustrato artificial.
 - Pareja 2: Se registra amplexo sobre el sustrato artificial (Figura 17a).
 - Pareja 3: ♂ en agua, ♀ sobre el sustrato artificial.

21/10/12.

- 11:30 h.
 - Pareja 1 y 3: Sin amplexos. ♂ y ♀ fuera del agua, sobre las piedras.
 - Pareja 2: Persiste el amplexo fuera del agua.
- 21:10 h.
 - Pareja 1 y 3: Sin amplexo.
 - Pareja 2: Sin amplexo. ♂ y ♀ se soltaron.

22/10/12

- 9:30 h.
 - Pareja 1, 2 y 3: Sin amplexos. ♂ y ♀ fuera del agua, sobre las piedras.

23/10/12

- 9:30 h.

- Pareja 1 y 2: Sin amplexos. ♂ y ♀ fuera del agua, sobre las piedras.
- Pareja 3: En amplexo, dentro del agua y sobre las piedras, asomados.

Experimento #2:

23/10/12:

- Hora de inyección 13:30. Se administra inyección hormonal según método AMPHIPLEX (sin “priming”).
- Hora 19:08.
 - Pareja 1, 2 y 3: ♂ dentro del agua, apoyado sobre las piedras. ♀ sobre las piedras, bajo la vegetación.

24/10/12

- 9:20 h.
 - Pareja 1, 2 y 3: Igual que el día anterior.
- 18:00 h.
 - Pareja 1, 2 y 3: mismas condiciones que a la mañana.

25/10/12

- 9:00 h.
 - Pareja 1, 2 y 3: Igual que el día anterior.
- 20:00 h.
 - Pareja 1, 2 y 3: mismas condiciones que a la mañana.

26/10/12

- 9:00 h.
 - Pareja 1, 2 y 3: Igual que el día anterior.

Experimento #3:

21/12/13

- 19:30 h. Se inyectan las parejas con “priming”
- 20:10 h. Registro auditivo de canto nupcial sin identificar el macho del cual proviene.

22/12/13

- 12:30 h. No se registran nidos de espuma ni amplexos en ninguna cámara reproductiva.
- 20:00 h. Se inyecta solución hormonal según método AMPHIPLEX.

23/12/13

- 11:00 h. No se registran amplexos ni nidos de espuma.
 - Pareja 1: ♂ y ♀ permanecen dentro del agua, escondidos bajo la vegetación.
 - Pareja 2: ♂ asomado entre las plantas. ♀ no se la ve.
 - Pareja 3: ♂ y ♀ asomados entre la vegetación.
 - Pareja 4: ♂ asomado entre las plantas. ♀ no se la ve.

24/12/13

- 17:20 h.
 - Pareja 1, 2, 3 y 4: Mismas condiciones que el día anterior

Experimento #4:

19/02/16

- 20:00 h. Se inyecta priming.

20/02/16

- 20:00 h.
 - Pareja 1: Registro auditivo de canto nupcial.
 - Pareja 2: Registro auditivo de canto nupcial.
 - Pareja 3: Se registra la presencia de nido de espuma totalmente formado con presencia de huevos (Figura 17b).

Las parejas 1 y 2 son inyectadas con solución hormonal según método AMPHIPLEX. La pareja 3 es retirada de la cámara de reproducción para registro de variables morfométricas (Tabla 4). Además se registraron los parámetros del nido (diámetro, forma, profundidad, etc) y se extrajo una porción de aproximadamente 25%, la cual fue llevada al laboratorio para conteo de número de huevos. Se incluyó además, una nueva pareja (4), que es inyectada con priming.

21/02/16

- 18:00 h.

- Pareja 1, 2 y 4: No se registran canto nupcial, ni amplexos, ni nidos de espuma.
- 20:00 h.
 - Se inyecta solución hormonal según método AMPHIPLEX en pareja 4.

22/02/16

- 20:00 h.
 - Pareja 1, 2 y 4: No se registran canto nupcial, ni amplexos, ni nidos de espuma.

23/02/16

- 21:00 h.
 - Pareja 1, 2 y 4: Mismas condiciones que el día anterior.

Experimento #5:

25/02/16

- 20:00 h.
 - Se inyecta solución hormonal según método AMPHIPLEX (sin priming) en las parejas 1 y 4.

26/02/16

- 18:00 h.
 - Pareja 1 y 4: Sin registro de canto nupcial, ni amplexos, ni desoves.

27/02/16

- 19:00 h.
 - Pareja 1 y 4: Mismas condiciones que el día anterior.

28/02/16

- 20:00 h.
 - Pareja 1 y 4: Mismas condiciones que el día anterior.

29/12/16

- 20:00 h.
 - Pareja 1 y 4: Mismas condiciones que el día anterior.

EXPERIMENTO	PAREJA	INDIVIDUO	PROCEDENCIA	PC	LHC	K	DV	DIOE	ICR
1	1	♂ ₁₄	cautiverio	122,22	-	-	-	-	-
		♀ ₁₅	cautiverio	82,10	-	-	-	-	-
	2	♂ ₁₇	cautiverio	98,00	-	-	-	-	-
			Molfesa	72,50	-	-	-	-	-
		♀	cautiverio	105,80	-	-	-	-	-
			Molfesa	85,90	-	-	-	-	-
2	1	♂ ₁₄	cautiverio	122,22	-	-	-	-	-
		♀ ₁₅	cautiverio	82,10	-	-	-	-	-
	2	♂ ₁₇	cautiverio	98,00	-	-	-	-	-
			Molfesa	72,50	-	-	-	-	-
		♀	cautiverio	105,80	-	-	-	-	-
			Molfesa	85,90	-	-	-	-	-
3	1	♂ ₂₀	cautiverio	83,90	9,29	0,10	-	-	-
		♀ ₁₆	cautiverio	59,80	9,34	0,07	44,52	21,21	2,10
	2	♂ _{4/5}	cautiverio	140,50	10,14	0,13	-	-	-
		♀	San Rafael	84,60	9,85	0,09	48,32	22,97	2,10
	3	♂ ₁₉	cautiverio	125,50	10,18	0,12	-	-	-
		♀	San Rafael	47,60	8,09	0,09	42,45	18,16	2,34
	4	♂ ₅	cautiverio	145,70	10,84	0,11	-	-	-
		♀ ₆	cautiverio	82,50	9,99	0,08	53,01	21,31	2,49
4	1	♂ ₉₆	Angel	114,50	11,46	0,08	-	-	-
		♀ ₁₀₁	Angel	83,10	9,43	0,10	55,45	19,70	2,81
	2	♂ ₉₇	Angel	143,30	11,67	0,09	-	-	-
		♀ ₁₀₀	Angel	116,60	9,99	0,12	63,26	21,98	2,88
	3	♂ ₉₈	Angel	128,60	11,86	0,08	-	-	-
		♀ ₁₀₂	Angel	88,90	9,43	0,11	54,70	20,48	2,67
	4	♂ ₁₀₄	Angel	136,70	11,17	0,10	-	-	-
		♀ ₁₀₆	Angel	104,10	10,17	0,10	63,49	21,04	3,02
5	1	♀ ₁₀₅	Angel	82,00	9,64	0,09	57,71	20,42	2,83
		♂ ₁₀₇	Angel	111,90	10,35	0,10	-	-	-
	♀	♀ ₁₀₉	Angel	86,30	9,63	0,10	50,04	20,07	2,49
		♀ ₁₁₀	Angel	77,10	8,71	0,12	53,58	19,90	2,69
	4	♂ ₁₀₄	Angel	136,70	11,17	0,10	-	-	-
		♀ ₁₀₆	Angel	104,10	10,17	0,10	63,49	21,04	3,02

Tabla 2. Variables morfométricas de los individuos tratados por el método AMPHIPLEX en cada experimento. PC: Peso en gramos. LHC: longitud hocico-cloaca en cm. K: índice de condición corporal. DV: diámetro del vientre en mm. DIOE: distancia interocular externa en mm. ICR: índice de condición reproductiva.

Experimento	Tanque Rep.	Fecha	Hora	T Aire	T Agua	pH	OD	Cond.
1	2	21/10/2012	14:00		15	-	-	-
	2	22/10/2012	09:30		13	-	-	-
	2	23/10/2012	09:30	24	13,5	-	-	-
2	2	23/10/2012	19:08	18,5	15	-	-	-
	2	24/10/2012	09:20	13	13	-	-	-
	2	24/10/2012	18:00	18,5	16,5	-	-	-
	2	25/10/2012	09:00	15	13,5	-	-	-
	2	25/10/2012	20:00	28	17,5	-	-	-
	2	26/10/2012	09:00	17	16	-	-	-
3	3	22/12/2013	12:30	37	-	-	-	-
	1	23/12/2013	20:40	27	27,33	-	-	-
	2	23/12/2013	20:40	-	27,43	-	-	-
	3	23/12/2013	20:40	27	27,23	-	-	-
	4	23/12/2013	20:40	-	27,5	-	-	-
	3	24/12/2013	17:20	32,5	-	-	-	-
4	1	21/02/2016	18:00	29	26	6,92	3,3	1593
	2	21/02/2016	18:00	26	26	6,95	1,4	1694
	3	21/02/2016	18:00	26,5	26	6,92	1,8	1627
	4	21/02/2016	18:00	25,5	26,5	6,81	2,1	1563
5	1	29/02/2016	18:00	-	22,6	7,2	1,9	1560
	2	29/02/2016	18:00	-	22,5	7,11	1,8	1780
	3	29/02/2016	18:00	-	22,1	7,05	2,2	1686
	4	29/02/2016	18:00	-	23	6,81	0,9	1577

Tabla 3. Variables fisicoquímicas registradas en cada cámara reproductiva durante los experimentos de inducción hormonal.

Tanque Rep.: Tanque reproductivo. T Aire: temperatura del aire en °C. T Agua: temperatura del agua en °C. OD: Oxígeno disuelto en el agua de cada tanque reproductivo en mg/L. Cond: conductividad en el agua de cada tanque reproductivo en mS/cm.

En el caso de los machos, la inducción resultó efectiva en la estimulación del comportamiento reproductivo, ya sea por el registro de cantos nupciales, como por la formación de amplexos con o sin formación de nido de espuma. En el experimento #4 la inducción resultó efectiva en el 100% de los machos, mientras que en el experimento #1 resultó efectiva en el 60% de los machos y en el experimento #3 fue efectiva en el 25% de los machos. En total se observó una efectividad de la inducción hormonal de los machos en el 60% de los experimentos.

Para el caso de las hembras, la única manera de evaluar estímulo reproductivo fue a través del desove y formación del nido de espuma. Uno solo de los experimentos (experimento #4) arrojó resultados positivos en la inducción de las hembras, representando este caso una efectividad del 25% (pareja 3). Los datos morfométricos del macho y la hembra de la pareja en que resultó efectiva la inducción, previos y posteriores al evento reproductivo se resumen en la Tabla 4.

Todos los caracteres reproductivos evaluados durante los experimentos fueron monitoreados durante las 48 horas previas de aclimatación en las cámaras de reproducción, descartándose la presencia de todo tipo de comportamiento reproductivo previo a la inyección.

El nido de espuma registrado en el experimento #4 por la pareja 3, resultó ser un nido de espuma típico, de forma anular, depositado en un sector de la cámara reproductiva de 9,5 cm de profundidad y adherido a la vegetación. El diámetro mayor fue de 30 cm y el diámetro menor fue de 25 cm. El orificio central midió 5 cm de diámetro. El número de huevos registrado fue de 7.880.

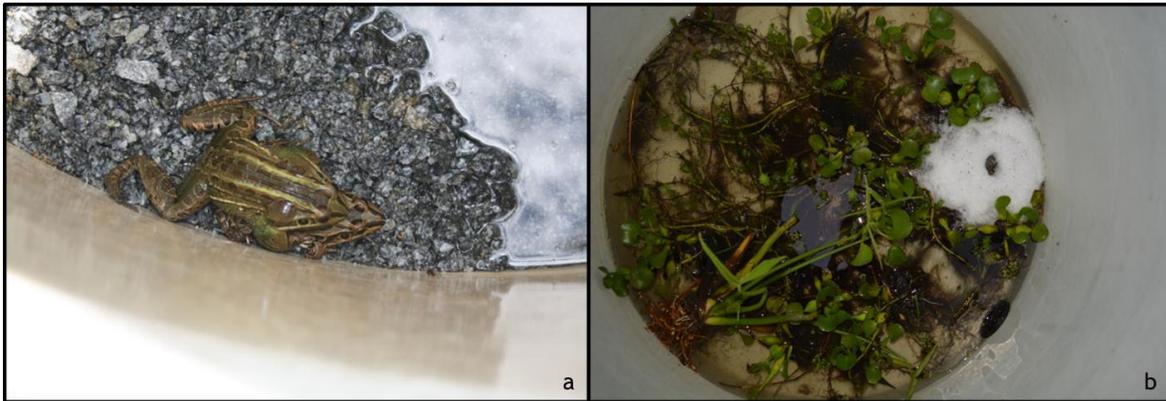


Figura 17. Comportamiento reproductivo observado tras la inducción hormonal de la reproducción. a) amplexo formado por la pareja 2 en el experimento #1. b) nido de espuma formado por la pareja 3 en el experimento #4.

Experimento	Pareja	Inducción	Individuo	PC	LHC	K	DV	DIOE	ICR
4	3	Pre	♂ ₉₈	128,60	11,86	0,08	-	-	-
			♀ ₁₀₂	88,90	9,43	0,11	54,70	20,48	2,67
		Post	♂ ₉₈	127,9	11,88	0,08	-	-	-
			♀ ₁₀₂	72	9,49	0,08	47,08	20,02	2,35

Tabla 4. Variables morfométricas registradas en una pareja antes y después de la reproducción inducida por método AMPHIPLEX. Pre: valores registrados previos a la inducción hormonal. Post: valores registrados posteriormente a la inducción hormonal y reproducción. PC: peso en gramos. LHC: longitud hocico-cloaca en cm. K: índice de condición corporal. DV: Diámetro del vientre en mm. DIOE: distancia interocular externa en mm. ICR: índice de condición reproductiva.

Discusión

Al inicio de este capítulo, se propuso como objetivo: (1) Determinar las variables e índices morfométricos a partir de caracteres externos, que permitan inferir de manera no invasiva el estado reproductivo de hembras y machos adultos de *L. latrans*. (2) Explorar, determinar y actualizar algunas condiciones propias del micro-hábitat de desove (temperatura, profundidad, asociación con la vegetación), así como parámetros de los nidos de espuma (tamaño, volumen, número de huevos) en poblaciones locales de *L. latrans*. (3) Poner a punto el método de inducción artificial de la reproducción AMPHIPLEX para *L. latrans*, con la finalidad de obtener larvas en los momentos del año que sea necesario.

En ese sentido y en relación al primer objetivo propuesto se pudo determinar que las variables morfométricas e índices seleccionados permitieron diferenciar hembras en condición reproductiva y post-reproductiva. La idea principal fue buscar alguna variable externa que permitiera diferenciar hembras maduras sexualmente, y si fuera posible, en condición preovulatoria. De este modo, de los índices morfométricos externos, el ICR fue el que mejor permitió distinguir entre hembras con diferente estado reproductivo, lo que indica que el ICR propuesto por Culley y col. (1982) para *Lithobates catesbeianus*, es aplicable también para hembras de *L. latrans*. A pesar de ser variables internas, y tal vez resultar obvio, resultaron de especial importancia en la diferenciación de hembras en condición reproductiva y post-reproductiva el IGS y el PG. Como se pudo observar, estas variables se relacionaron muy bien con el estado de madurez gonadal, lo que podría explicarse debido a que los ovocitos, al ir madurando, van aumentando significativamente de tamaño, y de este modo podrían traducirse en un mayor peso de la gónada (Dumont 1972; Penkala 1978; Carr 1984). De aquí, que estas dos variables son además, un indicativo directo del estado de madurez gonadal, sin embargo, implican el sacrificio del individuo por lo que no son útiles para el trabajo de campo. De esta forma, nuestra idea fue centrarnos en las variables morfológicas externas. Entre ellas, una variable que aportó información a la hora de la diferenciación entre hembras en condición reproductiva y post-reproductiva, fue el PC, que concuerda con los estudios realizados por Browne y Zippel (2007). Sin embargo, el DV mostro una mayor significancia con respecto al PC, resultando un mejor indicador de la diferenciación del estado reproductivo femenino. A diferencia

de lo esperado según los estudios de Lüddecke (2002) y Perotti y col. (1997), la variable LHC no aportó información a la hora de diferenciar hembras en condición reproductiva y post-reproductiva, lo que concuerda con el estudio realizado por Schaefer y col. (2006) en *L. chaquensis*. También, y a diferencia de lo observado por Lüddecke (2002) en hembras de *D. labialis*, el índice K, no resultó una buena herramienta a la hora de diferenciar el estado reproductivo de las hembras en *L. latrans*, sobre todo al compararlo con otros índices como el ICR. Por lo tanto, el ICR (Culley 1982) es el índice que mayor información aporta al momento de reconocer hembras de *L. latrans* en estado reproductivo, con un valor promedio de 2,53 para las hembras reproductivas.

En el caso de los machos de *L. latrans*, también en relación al primer objetivo de este capítulo, los resultados fueron distintos a los obtenidos con las hembras; ya que las variables morfométricas e índices seleccionados, no permitieron diferenciar machos en condición reproductiva y post-reproductiva. De esto se desprende que la condición reproductiva en los machos de *L. latrans*, en el rango etario evaluado, no afecta significativamente ninguna variable morfométrica externa, al menos entre las que nosotros hemos considerado en este estudio. Sin embargo, esto no planteó una dificultad mayor ya que para los machos de *L. latrans* se puede recurrir a los caracteres sexuales secundarios estacionales (Ceï 1980, Ceï 1948) como caracteres indicativos de madurez gonadal, los cuales son claramente distinguibles, a diferencia de lo que ocurre en las hembras de la misma especie (Ceï 1948).

En relación al segundo objetivo del presente capítulo de tesis, se pudieron determinar y cuantificar las características de algunas condiciones propias del micro-habitat que eligen para el desove (temperatura, profundidad, asociación con la vegetación). Sin embargo, es importante señalar que algunos de los parámetros de los nidos de espuma no concuerdan con los datos bibliográficos consultados. Según Ceï (1948), los nidos de espuma de *L. latrans* pueden llegar a contener hasta 1000 huevos. Los datos obtenidos en el presente trabajo indican un número promedio de huevos de 23.236 ± 10.874 . Esta diferencia en el número de huevos observados entre ambos estudios, puede deberse a variaciones naturales entre poblaciones ubicadas en localidades distantes: San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina (Ceï 1948) y La Plata, Buenos Aires, Argentina (este estudio); o bien, a diferencias en las metodologías de conteo empleadas. Es interesante destacar además,

el registro de machos satélite y de nidos de espuma comunales en *L. latrans*, que podrían además contribuir al número de huevos observado durante este estudio.

Como se dijera anteriormente, los machos satélite, son machos que permanecen pasivos en las cercanías de un macho que se encuentra vocalizando (a una distancia inferior a 1 m) y que se mantiene sin emitir vocalizaciones (Arak 1988). Wells (1977) propuso dos hipótesis (no excluyentes) para explicar el comportamiento de los machos satélites en los anuros: (1) los machos satélite están esperando que el sitio en el que está el otro macho vocalizando quede disponible; o (2) intentan interceptar a las hembras en condición pre-ovulatoria que se acercan atraídas por el canto de los machos que emiten las vocalizaciones. De este modo, utilizan una alternativa reproductiva mediante la cual aprovechan los esfuerzos reproductivos de otros machos conespecíficos para lograr formar pareja (Wells 2007). Este comportamiento fue denominado también parasitismo sexual por Forester y Lykens (1986). Según el modelo de Waltz (1982) los machos satélites deben asociarse con los “machos vocalizantes” que ocupan los sitios de vocalización más deseables o emiten las vocalizaciones nupciales más atractivas (Forester y Lykens 1986). En algunos casos, los machos satélite son de menor tamaño o incluso son más jóvenes que los que se encuentran vocalizando (Arak 1988; Wells 2007), pero en otras ocasiones el tamaño no tiene relevancia, y hasta incluso los roles de los machos pueden ir rotando entre machos satélite y vocalizantes (Forester y Lykens 1986; Haddad 1991; Wells 2007). La observación de machos satélite fue previamente reportada para *L. latrans* por Laufer y col. (2014), quienes también observaron, al igual que en el presente estudio, la ocupación de un nido de espuma por un macho satélite, al quedar vacante por el retiro del macho vocalizante, corroborándose de este modo la primer hipótesis propuesta por Wells (1977). Sin embargo, Laufer y col. (2014) sugieren que los machos satélite de *L. latrans* jugarían un papel activo en la competencia intrasexual, y que aprovecharían alguna oportunidad de amplexar a la hembra ya sea (1) desalojando al macho en amplexo, (2) mediante un amplexo múltiple, o (3) mediante la aparición de machos más pequeños insertándose entre un par en amplexo. En el presente trabajo de tesis, pudimos comprobar que los machos satélite de *L. latrans* juegan un papel activo de hecho en la competencia intrasexual, intentando separar la pareja en amplexo, y en ocasiones llegándose a realizar verdaderas peleas cuerpo a cuerpo. Observaciones similares han sido previamente reportadas para la especie *L. chaquensis* (Praddo y Haddad 2003). Estas observaciones demuestran además, que *L. latrans* puede llegar a reproducirse mediante la estrategia de

desove multiparental, como ya se ha visto en otras especies del mismo género (Praddo y Haddad 2003; Wells 2007).

Otra estrategia reproductiva la constituyen los nidos de espuma comunales, que son aquellos que están compuestos por al menos dos nidos individuales que se encuentran en contacto entre sí, y que fueron construidos en la misma noche (Arzabe 1999; Giaretta y Menin 2004). El significado funcional de las puestas comunales tiene al menos dos ventajas: (1) las puestas comunales pueden generar un efecto de "rebaño egoísta", por lo que la progenie individual es menos propensa a ser predada, y (2) posiblemente puedan mejorar los efectos termorreguladores y disminuir la posibilidad de desecación (Hödl 1992; Giaretta y Menin 2004; Zina 2006). Nuestras observaciones demuestran la presencia de nidos de espuma comunales en *L. latrans*, donde se han podido observar hasta 5 parejas, con poca distancia de separación entre sí, que realizan simultáneamente nidos de espuma dando lugar a nidos comunales de mayor tamaño. Si bien la presencia de nidos comunales ya había sido registrada en otras especies de la familia Leptodactylidae (Hödl 1992; Barreto y Andrade 1995; Rodríguez y col. 2004; Zina 2006; Andrade de Lacerda y col. 2009; Schaefer y Kehr 2010; Valetti y col. 2013), éste constituye el primer registro para la especie e incluso para el género *Leptodactylus*.

Podemos concluir además, que estos dos fenómenos, (la presencia de machos satélite y la formación de nidos comunales), han ocurrido de manera simultánea, es decir, observándose nidos comunales que además son parasitados por machos satélite, lo que complejiza aún más la estrategia reproductiva, en comparación con otras especies. Finalmente, la existencia de estos fenómenos, podría ayudar a explicar los valores tan variables observados en el número de huevos de los nidos de espuma entre los reportes previos y este estudio.

El método AMPHIPLEX resultó efectivo en los machos de *L. latrans* en el 60% (canto nupcial) y en el 40% (registro de amplexos) de los experimentos realizados en el presente trabajo de tesis. En este sentido, nuestros datos parecen concordar con las observaciones realizadas por Pereira y col. (2013), quienes lograron la espermiación de machos de *L. latrans* mediante el suministro diario de GnRH-A durante 7 días. Sin embargo, en nuestro caso no realizamos una inspección de espermatozoides en la cloaca. La inducción hormonal en el caso de las hembras no resultó efectiva hasta el 4^{to} experimento (a pesar de tener baja eficiencia) y requirió, como era lógico, del estudio adicional de indicadores externos predictores de la condición de madurez ovocitaria. Es interesante distinguir que

datos previos de inducciones hormonales (experimentos #1 a #3) de la reproducción por el método AMPHIPLEX en *L. latrans* no habían arrojado resultados positivos en las hembras, observándose emisión de canto nupcial por parte de los machos y amplexos en algunos casos, pero sin producirse el desove. Precisamente los valores de ICR de las hembras del experimento 3 fueron inferiores al valor promedio de ICR determinado para hembras en condición reproductiva de poblaciones naturales (Tabla 1 y 2). Esto podría explicar la ausencia de éxito en este experimento de inducción hormonal. A pesar del bajo número de datos, la hipótesis de ICR mínimo pudo ser corroborada en el caso del experimento 4, que resultó efectivo para la pareja 3, y en el cual la hembra tenía un valor de ICR = 2,67. Luego del desove se observó una disminución en el ICR a un valor de 2,35 (Tabla 4), constituyendo otro elemento que estaría dando soporte a la hipótesis de ICR mínimo. Finalmente, los valores de ICR de las hembras inducidas en el experimento 4 que no resultaron en desove, fueron superiores a 2,7, encontrándose en el rango de 2,81-3,00 (Tabla 1). En este sentido pueden plantearse dos posibilidades: o bien las hembras han completado la vitelogénesis pero no se ha producido la maduración final del oocito, o bien el confinamiento, asociado al estrés pudo haber iniciado algún proceso de regresión gonadal. En este sentido, Culley y col. (1982), comprobaron que hembras de *L. catesbeianus* con un ICR > 3 y un peso mayor a 400 g, podían llegar a no responder frente a la inducción hormonal por presentar gran porcentaje de atresia folicular, en algunos casos llegando al 95% de atresia.

Consideramos que otro factor que resultó de gran importancia para la puesta a punto de la inducción hormonal en *L. latrans* fue el monitoreo de las condiciones ambientales naturales de desove, ya que al ser el AMPHIPLEX un método que minimiza el estrés producido por el manipuleo, era necesario facilitar un ambiente propicio para la reproducción. Es decir, acondicionar las cámaras reproductivas de manera tal que las parejas tuvieran los elementos mínimos para que el despliegue reproductivo fuera posible. Por ejemplo, que la profundidad del agua no fuera muy elevada para que los individuos no se ahoguen, y no fuera muy baja para que no imposibilitara los movimientos de batido de los miembros posteriores, o que contara con un porcentaje adecuado de sustrato vegetal para la fijación del nido de espuma. Estos factores fueron mejorando notablemente en cada uno de los experimentos, posibilitando obtener cámaras reproductivas adecuadas para el 4^{to} experimento.

En base a los resultados obtenidos, podemos decir que todavía debemos trabajar tanto en las condiciones ambientales como en la identificación del estadio reproductivo de las hembras, para que el método AMPHIPLEX resulte efectivo en esta especie. A pesar que se necesitan más experimentos para poner a punto esta técnica en esta especie, la información que aporta a la materia de investigación el presente trabajo de tesis, resulta de importancia a la hora de sentar las bases para nuevas investigaciones sobre la biología reproductiva de *L. latrans* y la inducción hormonal de la reproducción, en esta especie o en especies con modos reproductivos similares.

Capítulo II:

*“Desarrollo Gonadal de Leptodactylus
latrans”*

Introducción

Cría de anuros en cautiverio

Las larvas de los anfibios se encuentran en casi todos los ambientes de agua dulce de la tierra. A nivel general, la mayoría de las especies de anfibios que se utilizan como modelo de laboratorio han sido especies que se reproducen fácilmente en estanques y con modos de vida bastante simples. Sin embargo, es hoy sabido que existen especies de anfibios que muestran distintos grados de cuidado parental, situación que complejiza la tarea a la hora de desarrollar protocolos de cría con estas especies (Browne y Zippel 2007). Los diferentes tipos de cuidado parental abarcan desde la simple deposición de huevos en forma individual, la vigilancia y protección de nidos de espuma, el transporte de huevos en la espalda y/o en “bolsas”, hasta el transporte de larvas eclosionadas en distintas partes del cuerpo, incluso en el tracto digestivo (Duellman y Trueb 1994; Jamieson 2003; Browne y Zippel 2007).

Como se ha mencionado en el capítulo I, *Leptodactylus latrans* se reproduce tanto en charcas temporarias, que se forman luego de las grandes precipitaciones de primavera y verano, como en cuerpos de agua permanentes (Ceí 1948; Gallardo 1974; Lavilla y Rouges 1992). La estrategia reproductiva de la especie consiste en la formación de nidos de espuma de forma anular, donde una vez finalizado el amplexo, la hembra permanece en el orificio central cuidando a los huevos y embriones de potenciales predadores. Una vez que eclosionan las larvas forman grandes cardúmenes, los que también son cuidados por la hembra parental hasta la finalización de la metamorfosis (Figura 18; Lavilla y Rouges 1992). Además, es de destacar el comportamiento gregario alelomimético de las larvas, y el comportamiento epimelético en la relación larva-madre, en el que los renacuajos rodean a la hembra y raspan con sus bocas la piel de su dorso (Gallardo 1974; Vaz-Ferreira y Gerhau 1975). Todas estas características, hacen de *L. latrans* una especie particular para su cría en cautiverio.

Desde la década del '70, o incluso con anterioridad, investigadores de diversas regiones del mundo se han visto atraídos por aspectos del crecimiento y desarrollo de los anfibios, tanto en poblaciones naturales como en condiciones de cría en cautiverio. Se conoce que las condiciones ambientales bajo las cuales las larvas de anfibios crecen y se desarrollan,

pueden afectar distintos aspectos de su biología, gracias a que poseen una gran capacidad de adaptación denominada plasticidad fenotípica (Smith-Gill y Berven 1979; Morey y Reznick 2000; Yu y col. 2016). Las tasas de crecimiento, la supervivencia, y el tiempo y tamaño a la metamorfosis de los individuos, dependen en gran medida de la densidad, la competencia por el alimento, y la temperatura en la que se criaron durante su etapa larval (Wilbur y Collins 1973; Smith-Gill y Berven 1979; Dash y Hota 1980; Berven y Chadra 1988; Kehr 1987; 1989; Martínez y col. 1996; Álvarez y Nicieza 2002; Motealegre-Delgado y col. 2013; Yu y col. 2016). Es así, que larvas criadas en elevadas densidades tienen una tasa de crecimiento inferior respecto a las criadas en menores densidades (Dash y Hota 1980; Hota y Dash 1981; Kehr 1987; 1989; Martínez y col. 1996). Asimismo, la densidad afecta negativamente la supervivencia de las larvas, observándose que a densidades elevadas, aumenta la tasa de mortalidad. Esto se explica gracias al fenómeno de competencia intraespecífica; de este modo, al aumentar el número de individuos en un volumen determinado, disminuye la disponibilidad de alimento, incrementándose la competencia por el mismo, así como por el resto de los recursos disponibles (Dash y Hota 1980; Martínez y col. 1993; Motealegre-Delgado y col. 2013). Algo similar ocurre con las larvas criadas bajo las mismas condiciones de densidad y temperatura, pero bajo condiciones de diferente suministro de alimento. De este modo, las larvas que son criadas con un suministro de alimento elevado, poseen altas tasas de crecimiento, frente a las que han sido criadas bajo condiciones de suministro de alimento bajo (Hota y Dash 1981; Kehr 1989). Además, se ha comprobado que las bajas temperaturas retardan el desarrollo de las larvas en mayor proporción que el crecimiento, aumentando de este modo el crecimiento específico en cada estadio del desarrollo (Smith-Gill y Berven 1979). Como resultado, las larvas crecidas a temperaturas bajas tienen períodos de desarrollo prolongados, pero también son más grandes que los conespecíficos crecidos a temperaturas más cálidas (Álvarez y Nicieza 2002; Yu 2016). Asimismo, existen evidencias acerca de la influencia de la temperatura y la disponibilidad de alimento en la velocidad de natación de los renacuajos. De esta forma, los renacuajos criados a temperaturas cálidas son nadadores más lentos que los criados a temperaturas más frías (Arendt y Hoang 2005). Otro aspecto de influencia es la calidad nutricional del alimento disponible y, a pesar que los efectos son especie-específicos, se observan mayores tasas de supervivencia, crecimiento, y desarrollo bajo la alimentación con elevada proporción de proteínas (Kupferberg 1997; Álvarez y Nicieza 2002; Pelegrín 2004).

Leptodactylus latrans es una especie que ha sido poco utilizada como especie modelo para investigaciones en cautiverio (Laufer y Maneyro 2008; Araújo y col. 2014a; 2014b; Josende y col. 2015; Lajmanovich y col. 2015), por lo cual no existen, a la fecha, protocolos de cría y mantenimiento en cautiverio para la especie. La información que se conoce proviene de escasas investigaciones de campo, que hacen referencia a la dieta de las larvas clasificando su alimentación como básicamente fitófaga, detritívora, e integrada mayoritariamente por algas pardas y verdes, además de detritus y restos vegetales (Gallardo 1974; Lajmanovich 1994). Por otra parte, Laufer y Maneyro (2008) investigaron el efecto de la densidad y la cantidad de alimento en el crecimiento de larvas de *L. latrans* bajo condiciones de laboratorio. Los investigadores concluyeron que el crecimiento de los renacuajos de *L. latrans* depende principalmente de la tasa de suministro de alimento per cápita, de modo que larvas criadas a diferentes densidades pero con la misma cantidad de alimento por individuo, muestran la misma tasa de crecimiento, no existiendo una competencia intraespecífica por el recurso, o resultando ésta mínima (Laufer y Maneyro 2008).



Figura 18. Cuidado parental del nido de espuma y de larvas de *Leptodactylus latrans*. Encerrados bajo líneas de puntos se observan larvas de *L. latrans* agrupadas en cardúmenes de gran tamaño. La flecha blanca indica la posición de una hembra de *L. latrans* cuidando su prole.

Desarrollo gonadal en anfibios

Las gónadas de los anfibios se originan a partir de una evaginación de células localizadas en la parte ventral de la mitad anterior del mesonefros. Se considera que las gónadas de machos y hembras constituyen órganos bipotenciales, morfológicamente idénticos, constituidos por una corteza y una médula, conteniendo tanto las células germinales como las células somáticas. (Norris y López 2011). La formación de este primordio gonadal comienza cuando las células germinales primordiales invaden una cresta somática gonadal, tanto una por una como en el caso de *Xenopus laevis*, como en grupos, en el caso de *Lithobates pipiens* (Merchant-Larios y Villalpando 1981; Ogielska 2009). En distintas especies, la formación del primordio gonadal usualmente ocurre en un renacuajo justo antes de comenzar a alimentarse, lo que se correspondería con el estadio 24 según Gosner (Gosner 1960). De este modo, la gónada indiferenciada queda anclada a la pared de la cavidad corporal mediante un mesenterio especial (mesogonium), formado por dos capas paralelas de epitelio peritoneal (Ogielska 2009). En los anuros, las células germinales primordiales se distribuyen originalmente a lo largo de las crestas genitales, pero pronto se concentran en las regiones centrales, dejando ambos extremos libres de células germinales. Este re-arreglo da lugar a tres regiones principales en la gónada: la parte central forma la gónada propiamente dicha, la región anterior (progónada o progonium) forma los cuerpos grasos, y la región posterior (epigónada o epigonium) forma un apéndice estéril, el cual a veces puede producir un pequeño cuerpo graso adicional (Witschi 1929). Estas tres regiones también pueden encontrarse bajo la denominación de: pars progonalis, pars gonalis y pars epigonalis (Ogielska 2009).

En aquellas especies que poseen determinación genética del sexo, el sexo se define en el momento de la formación del cigoto, cuando los pronúcleos masculino y femenino de un óvulo y un espermatozoide se fusionan. Sin embargo, las gónadas permanecen indiferenciadas durante parte del desarrollo, antes de que comience el proceso de diferenciación morfológica de la gónada masculina o femenina. Durante ese tiempo, las células somáticas de una gónada comienzan a diferenciarse y bajo su influencia las células germinales se transformarán en oogonias o espermatogonias (Hayes 1998; Ogielska 2009). Sin embargo, algunos autores (Falconi et al. 2004) postulan que esta diferenciación ocurre de manera “asimétrica”, ya que las células somáticas y germinales desempeñan papeles diferentes en las hembras y los machos de los anuros, ejerciendo un rol importante en el

proceso de diferenciación. La localización de las células germinales durante el desarrollo gonadal es materia clave a la hora de intentar definir el sexo de las larvas en estadios tempranos del desarrollo (Hayes 1998). De este modo, la señal más temprana de diferenciación gonadal a nivel histológico se evidencia por la modificación en la localización de las células germinales. La gónada indiferenciada (o bipotencial) es una estructura sólida con una corteza y una médula intactas. En el primordio ovárico, las células germinales permanecen en la corteza, en donde proliferan. Luego, esas células se diferencian como oogonias y se asocian con células somáticas, formando los primeros folículos. La mayoría de las oogonias comienzan con el proceso meiótico y se detienen en profase I. Por otro lado, la médula está constituida por células somáticas, las cuales regresionan dando lugar a una cavidad, la cavidad ovárica (Figura 19; Hayes 1998; El Jamil y col. 2008; Ogielska 2009; Norris y López 2011; Ogielska y Kotusz 2004). En el testículo, las células germinales migran desde la corteza a la médula, en donde se mezclan con las células de Sertoli en diferenciación, en unidades llamadas cistos, que se ordenan en lóbulos (Figura 19). Las espermatogonias comenzarán con la meiosis después de la metamorfosis. Finalmente, la corteza desprovista de células germinales, se convierte en la túnica albugínea, la envoltura del testículo (Hayes 1998; Ogielska 2009; Norris y López 2011; Haczkiwicz y Ogielska 2013).

En anuros, el estadio de vida en el que ocurre la diferenciación morfológica de las gónadas es específico para cada especie en particular y se conoce que pueden seguir distintos patrones de diferenciación (Witschi 1929; Hayes 1998). Gramapurohit y col. (2000) describieron tres patrones de diferenciación sexual: (1) El “tipo diferenciado”, en el cual las gónadas indiferenciadas se diferencian directamente en ovarios y testículos. (2) El “tipo indiferenciado” en el cual las gónadas indiferenciadas se diferencian en ovarios, y otras permanecen indiferenciadas durante un período más prolongado de tiempo, para luego diferenciarse como testículos. Y (3) El “tipo semi-diferenciado” en el cual todas las gónadas se diferencian como ovarios y luego algunos se convierten en testículos mediante un proceso de degeneración de los oocitos y la reorganización de las gónadas. Ogielska (2009) hace una revisión de los patrones propuestos y determina que los tipos “diferenciado” e “indiferenciado”, corresponderían ambos al mismo patrón de diferenciación, que sería de tipo diferenciado, debido a que la distinción entre ambos patrones radica en el tiempo en el que se hace evidente la diferenciación testicular.

En lo que respecta a la diferenciación del ovario, Ogielska y Kotusz (2004) describieron detalladamente 10 estadios del desarrollo del ovario en base a estudios realizados en 12 especies de anuros, pertenecientes a 6 familias diferentes (Ranidae, Discoglossidae, Hylidae, Bufonidae, Pelobatidae y Pipidae). Brevemente, esta descripción puede dividirse en 6 momentos fundamentales del desarrollo: Estadios I-III, gónada indiferenciada; IV, diferenciación sexual; V, primeros nidos de meiocitos; VI, primeros ovocitos en diplotene; VII-IX, aumento del número de ovocitos en diplotene y disminución del número de oogonias y nidos; X, ovario completamente desarrollado compuesto de ovocitos en diplotene con parches rudimentarios de oogonias. Por otra parte, El Jamil y col. (2008) describieron 6 estadios del desarrollo ovárico en *Xenopus tropicalis*, correspondiendo los primeros dos (Undif 1 y Undif 2) a estadios de gónada indiferenciada y los restantes 4 (Ov 1, Ov 2, Ov 3, y Ov 4) a estadios del desarrollo ovárico propiamente dicho. Respecto al momento de la diferenciación sexual para el caso del ovario, Ogielska y Kotusz (2004) reconocen tres tipos de tasa de diferenciación ovárica en anuros: (1) básica, al final de la metamorfosis el ovario alcanza la diferenciación de una cavidad ovárica (en la mayoría de las especies); (2) acelerada, al final de la metamorfosis el ovario alcanza la diferenciación de los ovocitos en diplotene; y (3) retardada, la diferenciación ovárica se alcanza luego de la metamorfosis.

Para el caso de los testículos, El Jamil y col. (2008) determinaron los estadios del desarrollo gonadal desde la gónada indiferenciada hasta la diferenciación sexual, y posterior desarrollo, en larvas de *Xenopus tropicalis*. Los autores establecieron 6 estadios, de los cuales los primeros dos (Undif 1 y Undif 2), correspondieron a gónadas indiferenciadas y los 4 restantes (Test 1, Test 2, Test 3, y Test 4) a diferentes momentos del desarrollo testicular. Por otra parte, Haczkiwicz y Ogielska (2013) describieron 10 estadios para *Pelophylax lessonae*, *Rana temporaria* e *Hyla arborea*; de los cuales los tres primeros (I-III), corresponden a estadios de gónada indiferenciada y los siete restantes (IV-X) a diferentes estadios del desarrollo testicular, desde la diferenciación sexual (en el estadio IV) hasta la gónada totalmente madura (estadio X). Respecto al momento de la diferenciación testicular, Goldberg (2014) distingue tres tipos de tasa de diferenciación testicular en anuros, siguiendo a Ogielska y Kotusz (2004) para ovarios. Considerando la diferenciación de los túbulos seminíferos (=lóbulos seminíferos) con referencia a la metamorfosis, los divide en: (1) básica, la diferenciación de los lóbulos seminíferos se alcanza durante la metamorfosis, (2) retardada, la diferenciación de los lóbulos

seminíferos se alcanza después de la metamorfosis, y (3) acelerada, la diferenciación de los lóbulos seminíferos se alcanza antes de la metamorfosis.

Como se desprende de lo anteriormente expuesto, el momento de la diferenciación morfológica de las gónadas de anfibios es tema de debate y es escasa la información disponible, así como los avances que se han realizado en esta materia en los últimos años. Actualmente, se conoce el patrón de diferenciación sexual en menos del 1% de las especies de anfibios anuros existentes, con lo cual resulta importante estudiar los patrones de diferenciación sexual y desarrollo gonadal en nuevas especies y establecer descripciones precisas de los mismos. Esta información es sumamente importante en estudios ecotoxicológicos que evalúen posibles efectos de agentes tóxicos sobre el desarrollo gonadal, ya sea utilizándola como línea de base para realizar comparaciones, así como para evaluar períodos críticos (períodos ventana) en los que una especie puede ser más vulnerable a la acción de pesticidas, perturbadores endocrinos o productos farmacéuticos (Goldberg 2014). Para poder establecer tales patrones y descripciones precisas de la gonadogénesis, es preciso además, conocer las condiciones necesarias para la manutención y cría de los organismos en laboratorio, dado que es el lugar donde la mayoría de estas investigaciones son llevadas a cabo.

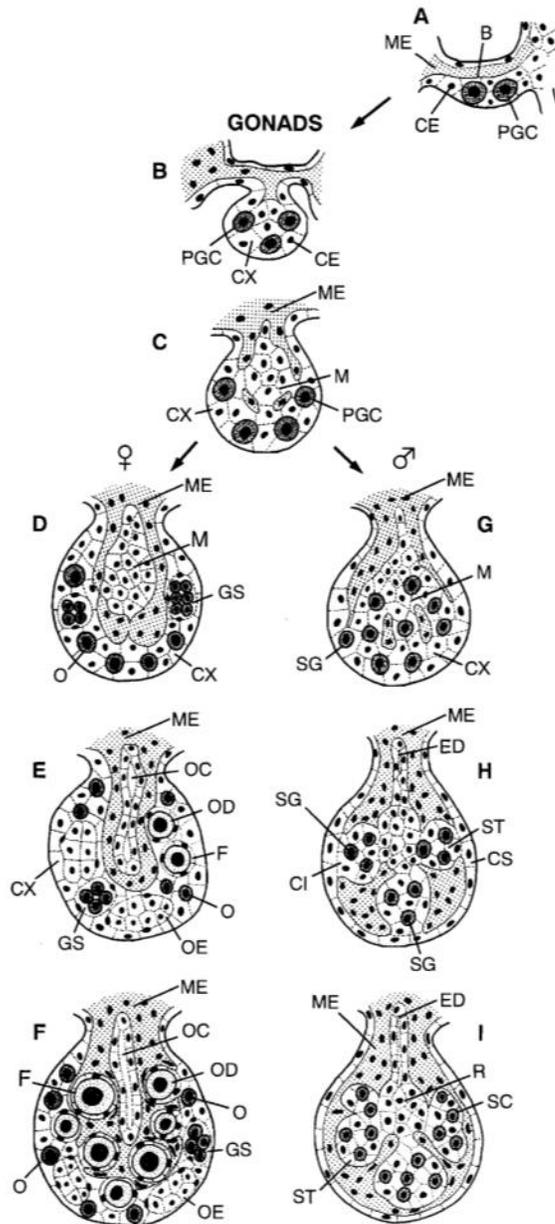


Figura 19. Diferenciación sexual de una gónada. A: Formación de la cresta genital. B y C: gónadas indiferenciadas, corteza y medula diferenciadas. D-F: Desarrollo ovárico. G-I: Desarrollo testicular. B= lámina basal, CE= epitelio celómico, CI= masa epitelial interna, CS= epitelio superficial, CX= corteza, ED= ducto eferente rudimentario, F= folículo, GS= gonia secundaria, M= medula, ME= mesénquima, O= oogonia, OC= cavidad ovárica, OD= oocito en diplotene, OE= oocito temprano, PGC= células germinales primordiales, R= rete testis, SC= espermatocito, SG= espermatogonia, ST= túbulo seminífero. Tomado de McDiarmid y Altig (1999).

Genes relacionados con la diferenciación sexual en anuros

La diferenciación gonadal en anfibios anuros está determinada por factores genotípicos, al igual que ocurre en otros grupos de vertebrados. Desde el punto de vista de la determinación genética del sexo, aunque la mayor parte de las especies no tiene cromosomas sexuales heteromórficos, se pueden encontrar especies con machos heterogaméticos (XX/XY) ó hembras heterogaméticas (ZW/ZZ; Miura 2017). Además, aunque se ha propuesto a *Dmrt1* como un potencial gen “determinador” del sexo en anfibios, falta aún la demostración definitiva (Yoshimoto y col. 2008; 2010); y por otro lado, se ha visto que las condiciones ambientales pueden ser un factor condicionante en la determinación del sexo de los anfibios (Nakamura y col. 2013).

A nivel en general, los estudios realizados en vertebrados indican que los genes que participan en el proceso de diferenciación gonadal (*Sox9*, *Dax1*, *dmrt1*, *SF1*, etc) se encuentran conservados en varias clases de vertebrados (Eggert 2004; Capel 2017). Las investigaciones para caracterizar los genes relacionados con la diferenciación gonadal en anfibios, se han basado en gran medida, en resultados obtenidos previamente en mamíferos. En este último grupo, el cromosoma Y contiene un gen denominado *Sry*, que codifica para un factor de transcripción cuya expresión inicia la diferenciación de una gónada bipotencial a testículo (Koopman y col. 1991; Nakamura 2010). El nombre *Sry* se debe a la región del cromosoma Y en la que se encuentra el gen, la cual es llamada “la región determinante del sexo-Y”. Si *Sry* no está presente (por ejemplo, en la combinación homogamética XX), o si no se expresa, entonces el desarrollo gonadal procede por la ruta de formación de los ovarios, dando lugar a un mamífero hembra (Capel 1996). Específicamente en anfibios, se han identificado algunos genes que intervienen en el proceso de diferenciación testicular, como los genes *dax-1* (Sugita y col. 2001), *dmrt1* (Eggert 2004) y *cyp17* (Nakamura 2009; Navarro-Martín y col. 2012). En lo que respecta al proceso de diferenciación ovárica, la expresión y actividad de la aromatasa gonadal (*cyp 19*), que es responsable de la síntesis de estrógenos, se encuentra fuertemente asociada a la diferenciación del ovario (Navarro-Martín y col. 2012; Norris y López 2011). Existen evidencias que ponen de manifiesto la posibilidad de que el gen *foxl2* se encuentre regulando la expresión de aromatasa gonadal en las hembras de anfibios, y de este modo, tenga un papel crucial en la diferenciación de los ovarios (Nakamura 2009; Navarro-Martín y col. 2012; Oshima y col. 2008).

Finalmente, dentro de los factores ambientales, además de la temperatura, merecen especial mención los posibles efectos producto de exposiciones a contaminantes ambientales, sobre todo la exposición a fármacos y a ciertos plaguicidas en agroecosistemas (Harris y col. 1998; Hayes 2006; Navarro-Martín y col. 2014) con posibles efectos de perturbadores endócrinos.

Hipótesis y objetivos

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, la importancia de la cría de especies en laboratorio para su utilización en investigaciones científicas, la necesidad de aumentar la información disponible acerca de los patrones de diferenciación sexual en especies autóctonas, con miras a estudiar problemas ambientales de índole local y regional, se plantean las siguientes hipótesis:

- ☞ *Leptodactylus latrans* es una especie adecuada para el mantenimiento y la cría en cautiverio.
- ☞ La supervivencia, crecimiento y desarrollo de *L. latrans* se verá modificada frente a las distintas condiciones de cría (densidad, tipo y cantidad de alimento y frecuencia de alimentación)
- ☞ En *Leptodactylus latrans* el desarrollo gonadal y la diferenciación sexual morfo-histológica ocurre durante su fase larval, antes del clímax metamórfico y con una proporción de sexos 1:1

Como objetivos de este capítulo se proponen:

- ☞ Establecer un método de cría para *L. latrans* en cautiverio.
- ☞ Caracterizar el proceso de desarrollo gonadal en *L. latrans*, desde etapas tempranas del desarrollo, considerando el punto de vista morfológico e histológico.
- ☞ Determinar el estadio de vida en el que ocurre la diferenciación sexual en *L. latrans* y la proporción de sexos observada, en condiciones controladas de laboratorio.
- ☞ Obtener las secuencias de genes con posibles funciones en la diferenciación sexual, para su utilización como biomarcadores de diferenciación testicular (*dmrt1* y *cyp17*) y ovárica (aromatasa gonadal y *foxl2*) en *L. latrans*.

Metodología

Obtención y cría de *Leptodactylus latrans* en cautiverio

Para la cría de *L. latrans* en cautiverio, se colectaron porciones (aproximadamente 10 a 25%) de nidos de espuma encontrados en charcas temporarias, ubicadas en los sitios de estudio mencionados en el capítulo I, considerados como prístinos. Los nidos fueron colectados en bolsas plásticas con abundante agua del sitio y un volumen equivalente de aire (Angulo y col. 2006). Estos nidos fueron trasladados al laboratorio en donde se los mantuvo bajo condiciones controladas (fotoperíodo 16L:8O y temperatura ambiente $25^{\circ}\text{C} \pm 1$) en bateas plásticas, con agua de red previamente filtrada mediante filtro físico Aqua-Pure® de $5\ \mu$ (Modelo AP-110 H/C) y declorinada mediante aireación continua durante 48 horas ($\text{pH} = 7,8 \pm 0,1$; oxígeno disuelto, $7,7 \pm 0,3\ \text{mg/l}$; conductividad, $663,17 \pm 15,01\ \mu\text{S/cm}$; dureza, $142,03 \pm 2,31\ \text{mg CaCO}_3/\text{L}$). El agua extraída del ambiente fue parcialmente mezclada con el agua del laboratorio, para la correcta aclimatación de los organismos a las condiciones de cría. Una vez los individuos hubieran alcanzado el estadio 25 de Gosner (Gosner 1960), se procedió a la separación de las larvas en bateas de mayor tamaño para la cría de las mismas, o bien, fueron utilizadas para la realización de ensayos de supervivencia, en los que se evaluaron distintas variables con el objetivo de determinar las condiciones adecuadas para la correcta cría de esta especie en laboratorio.

Ensayos de supervivencia

Se realizaron seis ensayos de supervivencia evaluando distintas densidades, ofertas de alimento, y distintas frecuencias de alimentación, con el objetivo de determinar las condiciones que permitieran una mayor supervivencia crecimiento y desarrollo. Todos los tratamientos contaron con tres replicas, utilizando recipientes de polipropileno de 1000 ml de capacidad y agua de bioensayo: agua de red previamente filtrada por filtro físico Aqua-Pure® de $5\ \mu$ (Modelo AP-110 H/C) y declorinada mediante aireación continua durante 48 horas ($\text{pH} = 7,8 \pm 0,1$; oxígeno disuelto: $7,7 \pm 0,3\ \text{mg/l}$; conductividad: $663,17 \pm 15,01\ \mu\text{S/cm}$; dureza: $142,03 \pm 2,31\ \text{mg CaCO}_3/\text{L}$). Los puntos finales evaluados fueron supervivencia, crecimiento, y desarrollo.

La supervivencia se determinó como la proporción de individuos vivos en cada cámara de ensayo, estableciendo como muertos aquellos individuos que carecían de movimiento al ser tocados suavemente con una varilla plástica, conjuntamente con un cambio en la coloración y apariencia general (Bach y col. 2016). Los individuos que fueron determinados muertos se retiraron y fijaron en solución de formaldehído al 10% (v/v).

El crecimiento se determinó midiendo la longitud del cuerpo (LHC) y la longitud total (LT) de acuerdo con Mc Diarmid y Altig (1999) con un calibre digital de 0,01 mm y mediante el análisis de fotografías con el programa Image-Pro Plus.

El desarrollo se observó bajo lupa binocular (Ahecro, Modelo ZTX-3E-W, Buenos Aires, Argentina), los estadios del desarrollo se determinaron según Gosner (1960).

🌀 Ensayo N° 1 (ES1): Se evaluó el efecto del factor densidad en 5 niveles: 5 individuos/L (D5), 10 individuos/L (D10), 20 individuos/L (D20), 30 individuos/L (D30), y 50 individuos/L (D50). El factor tipo de alimento fue evaluado en 2 niveles, el primero constituido por alimento balanceado para peces omnívoros en escamas (Shulet® Carassius; Anexo III; A1) y el segundo por lechuga licuada (A2). Cada 48 horas los individuos fueron alimentados ofreciendo una cantidad de 0,02 g de alimento/individuo (Tabla 5) según los resultados reportados por Kehr (1987; 1989) en larvas de anuros autóctonos; momento en el que además, se registró la supervivencia y se realizó un recambio parcial (70%) del agua. El ensayo tuvo una duración total de 144 h.

🌀 Ensayo N° 2 (ES2): En este ensayo se evaluó un total de 6 niveles para el factor tipo de alimento: alimento balanceado para peces omnívoros en escamas (Shulet®; Anexo II; A1), lechuga licuada (A2), solución de levadura en polvo (Levex®; A3), hígado vacuno (A4), clara de huevo (A5) y corazón vacuno (A6). La solución de levadura seca, se preparó diluyendo 1,5 g de levadura en 100 ml de agua de bioensayo. Para los ítems alimentarios A2, A3 y A5 se administró 1 ml de alimento por cámara de cría; para el ítem A1, A4 y A6, se suministró 0,1 gramos de alimento por cámara de cría (Kehr 1987; 1989; Tabla 5). El alimento fue administrado cada 48 horas, momento en que se realizaba un recambio total del agua de cría. Se utilizó una densidad constante de 10 id/L (5 larvas/0,5 L). El ensayo tuvo una duración total de 288h. La supervivencia se registró cada 24 horas durante las primeras 96 h, y luego se registró cada 96 horas.

- ☉ Ensayo N° 3 (ES3): Se evaluaron 4 niveles alimenticios para el factor tipo de alimento: alimento balanceado para peces en escamas (Shulet®; Anexo II; A1), lechuga licuada (A2), solución de levadura en polvo (Levex®; A3), y clara de huevo (A5). La solución de levadura seca se preparó según las indicaciones del ES2. Para los ítems A2, A3 y A5 se administró 1 ml de alimento por cámara de cría, mientras que para el ítem A1 se suministró 0,1 g de alimento por cámara de cría (Kehr 1987; 1989) cada 48 h (Tabla 5). La supervivencia se relevada cada 24 h hasta el final del experimento (240 h), momento en el cual se tomaron los datos para la evaluación del crecimiento. Se trabajó a una densidad constante de 10 individuos/L (5 larvas/0,5 L) y se realizó un único recambio del agua a las 120h.
- ☉ Ensayo N° 4 (ES4): El factor a evaluar en este experimento fue el efecto de la frecuencia de alimentación, la cual contó con 5 variantes: sin alimentación (F0), alimentación cada 24 h (F1), cada 48 h (F2), cada 72 h (F3), y una vez por semana (F4). El alimento seleccionado fue el balanceado para peces omnívoros en escamas (Shulet®; 0,05 g/acuario), y se utilizó una densidad constante de 10 individuos/L, utilizándose un volumen de 500 ml de agua de bioensayo en cada recipiente (Tabla 5). El recambio del agua se realizó previo al suministro del alimento y de acuerdo con cada tratamiento. La supervivencia fue registrada cada 24 horas desde el inicio del experimento hasta el final del mismo (336 h); momento en el que se tomaron los datos para la evaluación del crecimiento y desarrollo.
- ☉ Ensayo N° 5 (ES5): En este experimento se evaluó el factor densidad poblacional en 4 niveles: 1 individuos/L (D1), 5 individuos/L (D5), 10 individuos/L (D10), y 15 individuos/L (D15). Los individuos fueron alimentados con alimento balanceado para peces en escamas (Shulet®) *ad-libitum* y se realizó un recambio total del medio cada 48 horas (Tabla 5). Se registró la supervivencia cada 24 horas, desde el inicio del experimento hasta las 336 h (tiempo final). Una vez finalizado el experimento se tomaron los datos para la evaluación del crecimiento y desarrollo.
- ☉ Ensayo N° 6 (ES6): En este último ensayo se evaluo el factor tipo de alimento en 4 niveles: alimento balanceado para peces en escamas (Shulet®; Anexo III; A1); lechuga

licuada (A2), solución de levadura seca (Levex®; A3), y un mix (mezcla de cada ítem alimenticio en partes iguales; A7). La solución de levadura seca se realizó según ES2. Además se evaluó el factor cantidad de alimento por individuo en 3 niveles: 0,01 g/individuo (NI); 0,02 g/individuo (NII); y 0,04 g/individuo (NIII), el cual fue suministrado cada 48 horas previo al recambio total del agua de cría (Tabla 5). Se utilizó una densidad constante de 10 individuos/L. La duración total del ensayo fue de 192 horas, registrándose la supervivencia a las 24, 96, 144, y 192 h.

Ensayo	Alimento	Densidad	Frec de Alim	Cantidad alim/acuario	Cantidad alim/individuo
1	Lechuga	5	48	0,1 g	0,02 g
		10		0,2 g	
		20		0,4 g	
		30		0,6 g	
		50		1 g	
	Shulet®	5	48	0,1 g	0,02 g
		10		0,2 g	
		20		0,4 g	
		30		0,6 g	
		50		1 g	
2	Lechuga Levex® CH	10	48 h	1 ml	0,2 ml
	Shulet® Hígado Corazón	10	48 h	0,1 g	0,02 g
	Lechuga Levex® CH	10	48 h	1 ml	0,2 ml
3	Shulet®	10	48 h	0,1 g	0,02 g
				sin alim	
4	Shulet®	10	24	0,05 g	0,01 g
			48		
			72		
			1 vez por semana		
5	Shulet®	2	48	ad libitum	ad libitum
		10			
		20			
		30			
6	Lechuga Levex® Shulet® Mix	10	48	0,05 g	0,01 g
	Lechuga Levex® Shulet® Mix	10	48	0,1 g	0,02 g
	Lechuga Levex® Shulet® Mix	10	48	0,2 g	0,04 g

Tabla 5- Ensayos de supervivencia. Lechuga: lechuga licuada; Levex® : solución de levadura seca marca Levex; CH: clara de huevo de gallina; Shulet® : alimento balanceados en escamas para peces omnívoros marca Shulet; Hígado: hígado vacuno, Corazón: corazón vacuno. La densidad esta expresada en individuos/litro. La frecuencia esta expresada en horas. La cantidad de alimento está expresada en g o ml.

Cría de *L. latrans* en cautiverio para el estudio del desarrollo gonadal

Para este propósito, la cría de *Leptodactylus latrans* se realizó en bateas plásticas, manteniendo una densidad máxima de 10 individuos/litro. Diariamente, las larvas fueron alimentadas con lechuga licuada y/o alimento balanceado para peces en escamas (Shulet®; Anexo II), según disponibilidad. Una vez por semana se realizó la limpieza de las bateas y un recambio parcial del agua. Cuando las larvas hubieran alcanzado el estadio Gs42, se detuvo el suministro de alimento y las larvas fueron transferidas a bateas con una superficie en pendiente, creando una transición entre un sitio acuático ($2/3$) y un sitio terrestre ($1/3$), para evitar la muerte por inmersión (Browne y Zippel 2007). Al alcanzar el estadio Gs45, los individuos fueron transferidos a cámaras individuales, con un pequeño volumen de agua de forma tal que no superara el nivel de la boca. Los juveniles fueron alimentados nuevamente a partir del estadio Gs46, con alimento vivo, principalmente larvas de *Tenebrio molitor*. La alimentación se realizó cada 48 horas, al momento de realizar la limpieza de la cámara de cría y el recambio del agua, el que se hacía en su totalidad.

Periódicamente, se extrajeron larvas y juveniles en distintos estadios del desarrollo, los cuales fueron sacrificados por inmersión en una solución de benzocaína (250 mg/L) de acuerdo a Close y col. (1996), para su posterior análisis. Las larvas fueron clasificadas en estadios del desarrollo bajo lupa binocular Nikon SMZ745T (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY, EEUU de América) equipada con una cámara 519CU 5. ROM-CMOS (Micrometrics®, Unitron, Commack, NY, EEUU de América) de acuerdo a Gosner (1960) y los juveniles fueron clasificados en función de la edad en días, a partir de la reabsorción total de la cola (estadio Gs46). Además, se determinó la LT y la LHC según Mc Diarmid y Altig (2000), con un calibre digital tipo vernier de 0,01 mm de precisión. Eventualmente también se registró el peso de los renacuajos y juveniles con una balanza digital de 0,0001 g de precisión marca Acculab (Grupo Sartorius, EEUU de América). Una vez registradas las variables morfométricas, se procedió a la fijación de los individuos en solución Bouin durante 24 horas, a 4° C, previa incisión en la región abdominal para facilitar la penetración y el contacto de los tejidos con el fijador. Posteriormente, los tejidos fueron conservados en etanol 70% (que fue renovado periódicamente) hasta su procesamiento.

Se realizaron disecciones de los individuos fijados para la evaluación morfológica de las gónadas bajo lupa binocular Nikon SMZ745T (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY, EEUU

de América) equipada con una cámara 519CU 5. ROM-CMOS (Micrometrics®, Unitron, Commack, NY, EEUU de América). Se disecó el complejo riñón-gónada, que fue procesado para evaluar la histología de la gónada mediante deshidratación e inclusión en parafina según se indica en la siguiente sección.

Técnicas para evaluación histológica de las gónadas

Deshidratación: Se procedió a la deshidratación de los tejidos mediante el pasaje por soluciones de alcoholes de graduación creciente (etanol 70°, 96°, 100°). Los tejidos fueron sumergidos progresivamente en los diferentes alcoholes durante 30 min cada vez, realizándose dos cambios de solución por cada graduación de etanol. Posteriormente se sumergió también, de manera progresiva, los tejidos en una mezcla de etanol:xilol (50:50), y xilol durante 30 minutos cada vez (Figura 20).

Inclusión: Previo a la inclusión en parafina, los tejidos fueron sumergidos en un mezcla de xilol:parafina (50:50), previo fusión en estufa, durante 30 minutos. Posteriormente, se sumergió el tejido en parafina, previo fusión en estufa, durante 30 minutos cada vez, realizándose tres cambios (Figura 20)

Finalmente, los tejidos se orientaron cráneo-caudalmente sobre moldes metálicos, utilizándose parafina como medio de soporte de los tejidos (Figura 20).

Corte: Una vez incluidos los tejidos, el complejo riñón-gónada fue cortado serialmente en el plano transversal, y en dirección cráneo-caudal, en un micrótomos de deslizamiento (Leica RM2125RT) y con 6 µm de espesor, utilizándose cuchillas de acero inoxidable.

Tinción con Hematoxilina & Eosina: Previo a la tinción de los cortes se procedió a desparafinarlos progresivamente por inmersión en xilol durante 40 minutos, realizándose un cambio de solución a los 20 minutos. Posteriormente se realizó la hidratación del tejido mediante el pasaje por alcoholes de graduación decreciente (etanol 100°, 96°, 70°, agua) durante 10 minutos realizándose dos cambios por cada solución (Figura 21).

Para la tinción, se sumergieron los tejidos en una solución de Hematoxilina durante 1,30 min. Realizándose sucesivos enjuagues con agua de red para evitar el excedente de colorante y evidenciar el viraje de color en los tejidos. Luego se sumergieron los tejidos en una solución de Eosina durante 30 minutos. El excedente de eosina fue lavado con alcohol 70° y se procedió entonces a la deshidratación del tejido mediante el pasaje

progresivo de alcohol a xilol en orden creciente de graduación (etanol 70°, 96°, 100°, xilol) realizando dos pasajes por cada solución. El pasaje por las soluciones se realizó de manera inmediata, sin dejar reposar los tejidos en las mismas, hasta llegar a Xilol, donde permanecieron hasta finalizar el montaje (Figura 21).

Montaje: Se utilizó como medio de montaje Bálsamo de Canadá natural (Biopack, Buenos Aires, Argentina). Se dejó secar bajo campana durante 24 horas antes de su examinación al microscopio (Figura 21).

Los cortes de las gónadas fueron examinados y fotografiados bajo microscopio óptico (Nikon Eclipse E600), equipado con una cámara digital (Nikon Digital Sight DSFi1- Japón), utilizando el programa NIS-Elements F 3.0.

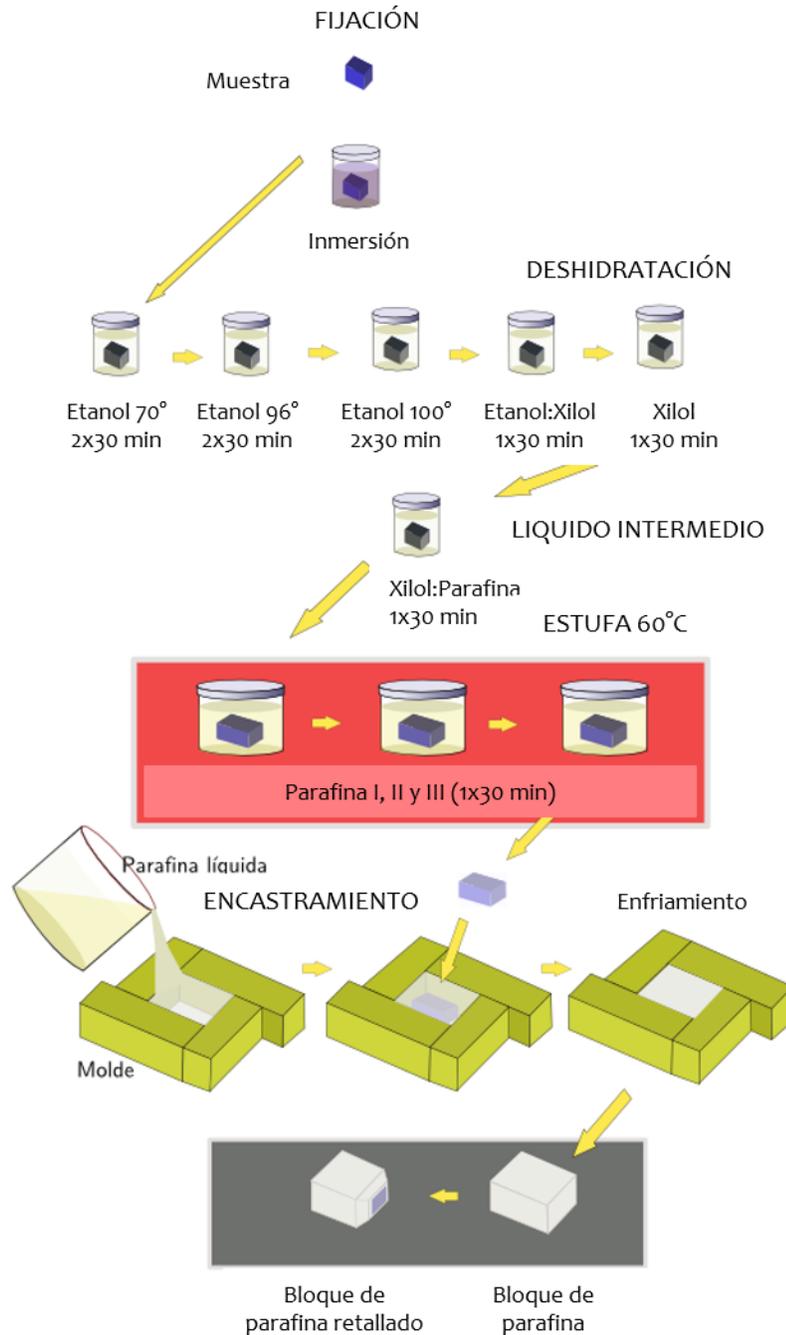


Figura 20. Esquema del proceso de inclusión en parafina del complejo riñon-gónada previamente fijado en solución fijadora Bouin. Modificado de “Atlas de histología vegetal y animal, Facultad de Biología, Universidad de Vigo (España)”. <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/3-parafina.php>

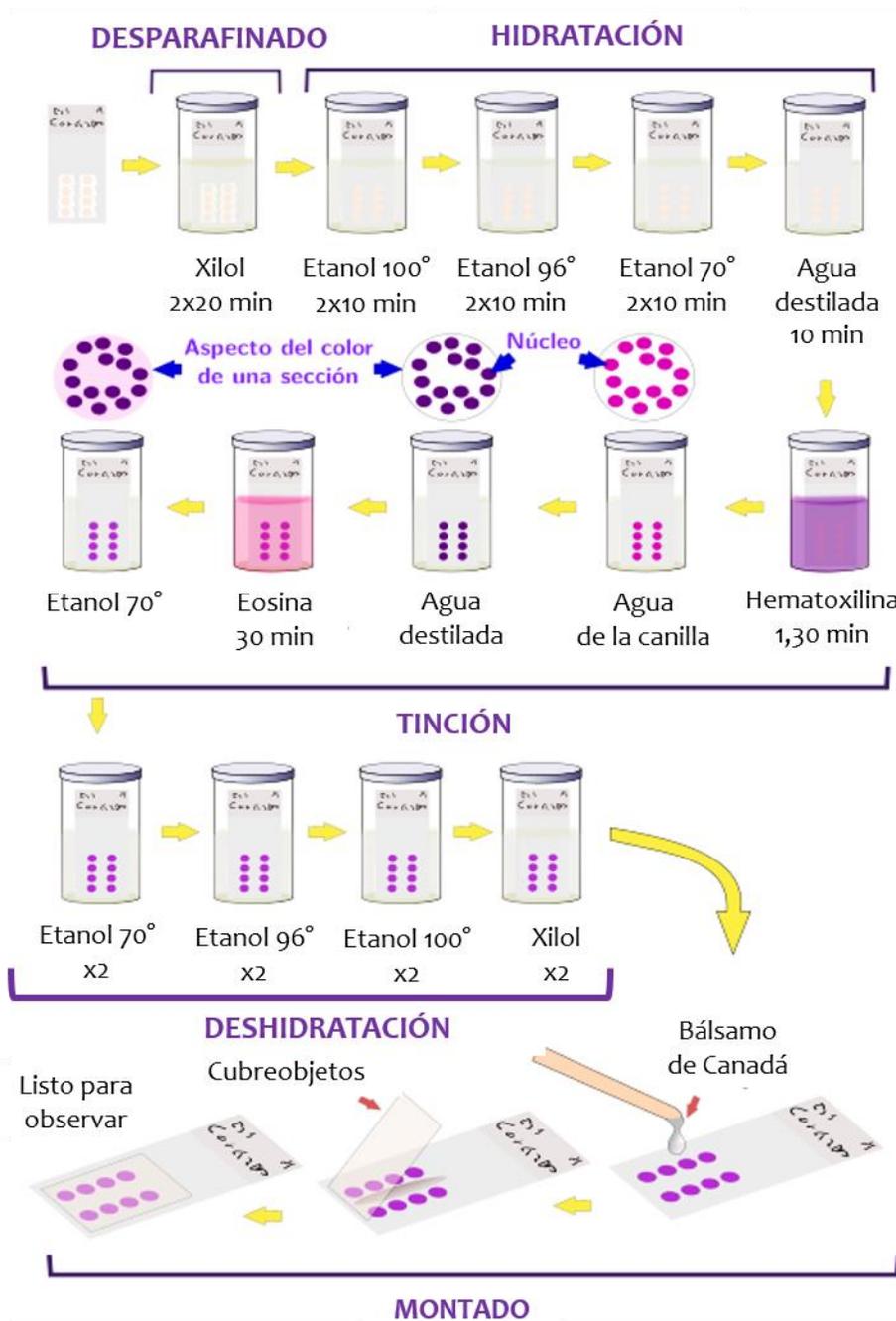


Figura 21. Esquema del proceso de tinción con Hematoxilina-eosina del complejo riñón-gónada previamente cortado en microtomo. Modificado de “Atlas de histología vegetal y animal, Facultad de Biología, Universidad de Vigo (España)”. <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-general.php>

Caracterización del ADNc de genes indicadores de la diferenciación sexual de *L. latrans*.

Se seleccionaron 6 genes para su estudio. Cuatro de ellos, fueron genes con potenciales funciones en la diferenciación sexual de anfibios de acuerdo a la bibliografía (Eggert 2004; Oshima y col. 2008, Nakamura 2009; Norris y López 2011; Navarro-Martín y col. 2012), y los dos restantes fueron elegidos como genes de referencia. Como posibles biomarcadores de diferenciación testicular se seleccionaron los genes *dmrt1* y *cyp17*, mientras que como posibles biomarcadores de diferenciación ovárica lo genes seleccionados fueron *cyp19* (aromatasa) y *foxl2*. Los genes de referencia fueron: β -actina y *EF1*.

Dado que no existía información en la bibliografía sobre la secuencia de estos genes en la especie de interés (*L. latrans*), se trabajó con secuencias de especies filogenéticamente cercanas en la construcción de cebadores consenso (Tabla 6). Para ello, se tuvo en cuenta las regiones altamente conservadas de cada gen. Todas las secuencias utilizadas se obtuvieron de la bases de datos *GenBank* del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Los alineamientos múltiples se realizaron por el método ClustalW con el programa MegAlign Lasergene®.

Para la extracción de ARN total del ovario y testículo de *L. latrans*, se sacrificó una pareja adulta (macho y hembra) de *Leptodactylus latrans* mediante inmersión en solución de benzocaína según Close y col. (1996). Se disecaron las gónadas de ambos ejemplares y se separaron fracciones de aproximadamente 100 mg de tejido, los que fueron conservados en RNAlater (Sigma-Aldrich) a -80°C hasta su utilización. Se extrajo ARN total del ovario y testículo utilizando TRIzol Reagent (Invitrogen TM, Life Technologie) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza (relación 260/280 nm) de ARN de cada muestra fue determinada usando un espectrofotómetro Synergy H1 (Biotech Instruments Inc, Winooski, Vermont, USA) y la integridad del mismo fue analizada a partir de la observación de las bandas de las subunidades ribosómicas de 28S y 18S en un gel de agarosa 1.2%. Luego las muestras fueron tratadas con DNasa I (Invitrogen) y la transcripción reversa fue realizada con 1 µg de ARN utilizando Super Script II, RNAsa OUT y oligo (dT) 12-18 (InvitrogenTM, Life Technologie) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la amplificación de la secuencia se utilizó 1 μ L de ADNc de las muestras anteriormente descritas con programas específicos para cada uno de los genes.

Para *β -actina*, se utilizaron los oligonucleótidos B-ACTINF1 y B-ACTINR1 (Tabla 10) y el programa utilizado estuvo compuesto por las siguientes fases: 5 minutos a 95°C , 35 ciclos con la siguiente secuencia, 95°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C por 30 segundos para finalizar con una elongación a 72°C por 3 minutos.

Para *EF1* se utilizaron los oligonucleótidos EF1aF1 y EF1aR1 (Tabla 10) y el programa utilizado estuvo compuesto por las siguientes fases: 5 minutos a 95°C , 35 ciclos con la siguiente secuencia, 95°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C por 30 segundos para finalizar con una elongación a 72°C por 3 minutos.

Para *dmrt1* se utilizaron los oligonucleótidos DMRT1F1 y DMRT1R1 (Tabla 10) y el programa utilizado estuvo compuesto por las siguientes fases: 5 minutos a 95°C , 40 ciclos con la siguiente secuencia, 95°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C por 40 segundos para finalizar con una elongación a 72°C por 3 minutos.

Para *cyp17* se utilizaron los oligonucleótidos CYP17F1 y CYP17R1 (Tabla 10) y el programa utilizado estuvo compuesto por las siguientes fases: 5 minutos a 95°C, 40 ciclos con la siguiente secuencia, 95°C durante 30 segundos, 54°C durante 30 segundos y 72°C por 40 segundos para finalizar con una elongación a 72°C por 3 minutos.

Para *foxl2* se utilizaron los oligonucleótidos FOXL2F1y FOXL2R2 (Tabla 10) y el programa utilizado estuvo compuesto por las siguientes fases: 5 minutos a 95°C, 35 ciclos con la siguiente secuencia, 95°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C por 30 segundos para finalizar con una elongación a 72°C por 3 minutos.

Para *cyp19* se utilizaron los oligonucleótidos AROF1 y AROR2 (Tabla 10) y el programa utilizado estuvo compuesto por las siguientes fases: 5 minutos a 95°C, 40 ciclos con la siguiente secuencia, 95°C durante 30 segundos, 52°C durante 45 segundos y 72°C por 30 segundos para finalizar con una elongación a 72°C por 3 minutos.

Los productos resultantes de la PCR fueron clonados en un vector T (pGEM-T Easy kit, Promega Corp.) y luego transformando bacterias competentes *Escherichia coli* (OmniMAX, Thermo Fisher Scientific). Las colonias blancas fueron seleccionadas a partir de la

combinación XGal/IPTG en placas de agar con ampicilina y luego crecidas en un medio líquido de LB/ampicilina. El ADN plasmídico con el inserto de cada gen fue extraído usando el protocolo de QIAGEN, luego secuenciado en el Servicio de Secuenciación de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y comparado con secuencias conocidas en el GenBank.

Gen	Especie	# ACC
<i>cyp19</i>	<i>Xenopus tropicalis</i>	BC118823
<i>cyp19</i>	<i>Xenopus leváís</i>	BC079750
<i>cyp19</i>	<i>Rana rugosa</i>	AB178482
<i>cyp19</i>	<i>Bufo marinus</i>	FJ697173
<i>cyp19</i>	<i>Engystomops pustulosus</i>	HQ846628
<i>Foxl2</i>	<i>Xenopus laevis</i>	AB385625
<i>Foxl2</i>	<i>Silurana tropicalis</i>	XM002933345
<i>Foxl2</i>	<i>Rana rugosa</i>	AB372103
<i>Foxl2</i>	<i>Lithobates sylvaticus</i>	JX162019
<i>dmrt1</i>	<i>Rana rugosa</i>	AB272609
<i>dmrt1</i>	<i>Rana nigromaculata</i>	EF524050
<i>dmrt1</i>	<i>Bufo marinus</i>	FJ697175
<i>dmrt1</i>	<i>Engystomops pustulosus</i>	HQ846631
<i>cyp 17</i>	<i>Buergeria buergeri</i>	AB673123
<i>cyp 17</i>	<i>Rana dybowskii</i>	AF042278
<i>cyp 17</i>	<i>Rana rugosa</i>	AB284119
<i>cyp 17</i>	<i>Lithobates sylvaticus</i>	JX162020
<i>EF1</i>	<i>Litoria nannotis</i>	AF309789
<i>EF1</i>	<i>Hyla japonica</i>	AB199910

Tabla 6. Secuencias de especies filogenéticamente cercanas a *L. latrans* utilizadas para desarrollar cebadores consenso. #ACC: número de acceso en GenBank (NCBI).

Análisis Estadístico

Los datos de supervivencia de todos los experimentos fueron transformados aplicando la transformación angular (Zar, 2010). Para los experimentos ES1 y ES6 se realizó ANOVA de dos vías con test post-hoc de Tukey, para comparar entre tratamientos (Zar 2010). Los datos obtenidos de los experimentos ES2, ES3, ES4, y ES5, se analizaron mediante ANOVA de una vía con test a posteriori de Tukey (Zar, 2010). Los datos de crecimiento fueron analizados mediante ANOVA de una vía con test a posteriori de Tukey (Zar, 2010) Los supuestos del ANOVA fueron corroborados mediante los test de Barlett (homogeneidad de varianza) y de Shapiro-Wilk (distribución normal). Los datos que no hubieran cumplido con los supuestos para realizar el ANOVA, fueron analizados mediante el test de Kruskal-Wallis con test post-hoc de Dunn para comparación entre tratamientos (Zar, 2010). Los datos del desarrollo fueron analizados mediante una prueba de Kruskal-Wallis con test post-hoc de Dunn para comparación entre tratamientos (Zar, 2010). Para todos los análisis se eligió una significancia de $\alpha = 0,05$ (Zar, 2010). Los resultados del desarrollo gonadal se analizaron mediante estadística descriptiva según Zar (2010). Para el análisis de los datos y armado de tablas y gráficos de este capítulo se utilizaron los programas GraphPad Prism® y el programa SigmaPlot®.

Resultados

Ensayos de supervivencia

Supervivencia

En el experimento ES1, se observaron diferencias significativas en la supervivencia en todos los tiempos evaluados a partir de las 48 horas, observándose diferencias significativas a las 48 h entre los niveles del factor densidad ($F = 23,345$; $df = 4$; $p < 0,001$); con una interacción significativa entre los factores densidad y tipo de alimento ($F = 3,426$; $df = 4$; $p < 0,05$). Las diferencias en la supervivencia observadas para el factor densidad se encontraron en el nivel D50 respecto de los niveles D10, D20 y D30 ($p < 0,001$) y en el nivel D5 respecto de los D10, D20 y D30 ($p = 0,001$; Tabla 7). Para la interacción de ambos factores, se observan diferencias en la magnitud del factor densidad, observándose para el nivel D5 diferencias en el factor tipo de alimento entre los dos niveles, A1 y A2 ($p = 0,001$; Tabla 7). Por otro lado, dentro del factor tipo de alimento, se observó que para el nivel A1 se detectaron diferencias entre el nivel del factor densidad D50 respecto de los niveles D5, D10, D20 y D30 ($p < 0,001$ para todos los casos; Tabla 7). Dentro del factor tipo de alimento, en el nivel A2 se observaron diferencias el nivel del factor densidad D5 respecto a los D10, D20 y D30 ($p < 0,001$ en todos los casos; Tabla 7), y en en el nivel D50 respecto a los niveles D10 ($p < 0,05$; Tabla 7), D20 y D30 ($p < 0,001$ ambas; Tabla 7). A las 96 horas, se observaron diferencias en el factor alimento ($F = 45,219$; $df = 1$; $p < 0,001$), observándose diferencias significativas en el nivel A1 respecto al A2 ($p < 0,001$; Tabla 7). A las 144 horas, se observaron diferencias tanto en el factor densidad ($F = 3,954$; $df = 4$; $p < 0,05$), como en el factor alimento ($F = 38,696$; $df = 1$; $p < 0,001$). La comparación entre los diferentes niveles del factor densidad mostro diferencias significativas entre el nivel D20 y el D10 ($p < 0,05$; Tabla 7), resultando este último con mayor porcentaje de supervivencia que el primero. Además, para el factor tipo de alimento, el nivel que mejor porcentaje de supervivencia mostró a tiempo final fue el A1 ($p < 0,001$; Tabla 7).

Para el ES2, se observaron diferencias significativas en la supervivencia a partir de las 192 horas ($F = 8,906$; $df = 5$; $p < 0,001$). La comparación entre tratamientos, mostró diferencias significativas en la supervivencia entre los tipos de alimento A1 y A3 ($p < 0,001$; Tabla 8). Resultados similares se observaron en las 240 h y 288 h ($F = 6,522$; $df = 5$; $p < 0,01$ para ambos tiempos); observándose diferencias significativas en la supervivencia del alimento

A1 respecto de A4, A5 y A6 ($p < 0,05$ para todos los alimentos y ambos tiempos evaluados; Tabla 8).

El experimento ES3 no mostro diferencias significativas en la supervivencia en ninguno de los tiempos evaluados ($p > 0,05$; Tabla 8).

El experimento ES4 mostró diferencias significativas en la supervivencia a partir de las 312 horas ($F = 9,736$; $df = 4$; $p < 0,05$) y hasta el final del ensayo. La comparación entre grupos arrojó diferencias significativas a las 312 h entre las frecuencias de alimentación F1 respecto de las frecuencias F0, F2 y F4 ($p_{F0} < 0,01$; $p_{F2} < 0,05$; $p_{F4} < 0,01$; Tabla 8). Para las 336 h se observaron diferencias significativas en la supervivencia ($F = 16,757$; $df = 4$; $p < 0,001$; Tabla 8), la comparación entre frecuencias de alimentación mostro diferencias significativas entre la F1 y el resto de las frecuencias ($p_{F0} < 0,001$; $p_{F2} < 0,001$; $p_{F3} < 0,01$; $p_{F4} < 0,001$; Tabla 8) resultando significativamente mayor la supervivencia de la F1 en todos los casos (Tabla 8).

El experimento ES5 mostró diferencias significativas en la supervivencia a partir de las 216 horas ($H = 9,020$; $df = 3$; $p < 0,05$). La comparación entre densidades arrojó que la supervivencia de la D1 fue significativamente inferior que la D5 ($p < 0,05$; Tabla 8). A las 240 h se encontraron diferencias significativas ($F = 13,722$; $df = 2$; $p < 0,019$) en la supervivencia, observándose en la D5 una supervivencia significativamente mayor que la D10 ($p < 0,05$; Tabla 8) y que la D15 ($p < 0,01$; Tabla 8).

El experimento ES6, mostró diferencias en la supervivencia a partir de las 96 h para el factor nivel de alimento ($F = 3,975$; $df = 2$; $p < 0,05$), entre los niveles NII y NIII ($p < 0,05$; Tabla 7). A las 144 h se detectó una interacción significativa entre los factores tipo y nivel de alimento ($F = 3,302$; $df = 6$; $p < 0,05$). La comparación entre grupos mostro que para el factor tipo de alimento, dentro del nivel A1, se observaron diferencias significativas entre el nivel de alimentación NI y NIII ($p < 0,05$, Tabla 7); y por otra parte dentro del nivel de alimento NI se observaron diferencias en el factor tipo de alimento, entre los niveles A1 y A7 ($p < 0,05$; Tabla 7). A las 192 h el análisis reveló diferencias significativas en el factor tipo de alimento ($F = 3,463$; $df = 3$; $p < 0,05$) y se observó una interacción entre los factores tipo y nivel de alimento ($F = 2,702$; $df = 6$; $p < 0,05$). En particular, dentro de la comparación entre niveles para el factor tipo de alimento, las diferencias se observaron entre el A3 y el A7 ($p < 0,05$; Tabla 7). Por otro lado, en la interacción, se observaron diferencias dentro del factor tipo de alimento en el nivel A1, entre los niveles de

alimentación NIII respecto de NI y NII ($p < 0,01$ y $p < 0,05$ respectivamente; Tabla 7). En el nivel NII, se observaron diferencias en el factor tipo de alimento, en el nivel A7 respecto de A1 y A3 ($p < 0,05$ ambos; Tabla 7). Y en el nivel NIII, solo se observaron diferencias significativas en el factor tipo de alimento entre el tipo los niveles A1 y A2 ($p < 0,05$; Tabla 7).

Crecimiento y Desarrollo

Los análisis de los datos de crecimiento mostraron que para el ES3 existieron diferencias significativas en la LT ($F = 66,823$; $df = 3$; $p < 0,001$); el análisis *a posteriori* arrojó que las larvas del tratamiento A1 fueron significativamente más grandes respecto de los tratamientos A2, A3 y A5 ($p < 0,001$ en todos los casos; Figura 22). Por otra parte, en el tratamiento A5 se observaron larvas significativamente más grandes a las del tratamiento A3 ($p < 0,05$; Figura 22). El análisis de la LHC también mostro diferencias significativas ($F = 56,632$; $df = 3$; $p < 0,001$), observándose una mayor LHC en las larvas del tratamiento A1, respecto de los tratamientos A2, A3, y A5 ($p < 0,001$ en todos los casos; Figura 22).

Para el ES4 no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento: LT ($F = 1,438$; $df = 3$; $p > 0,05$); LHC ($H = 6,494$; $df = 3$; $p > 0,05$), ni en el desarrollo: Gs ($H = 7,521$; $df = 3$; $p > 0,05$).

Para el ES5 se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre los diferentes tratamientos, observándose tanto en la LT ($F = 9,153$; $df = 2$; $p < 0,001$), como en la LHC ($H = 12,977$; $df = 2$; $p < 0,01$). Específicamente para la LT, las diferencias se encontraron entre las densidades D5 y D10 ($p < 0,001$; Figura 23) y la D5 y D15 ($p < 0,01$; Figura 23a). Para la LHC, las diferencias se detectaron entre la D5 y D10 ($p < 0,05$; Figura 23a). Asimismo, también se encontraron diferencias en el desarrollo ($H = 13,255$; $df = 2$; $p = 0,001$), el test *a posteriori* arrojó diferencias significativas entre el tratamiento D5 respecto a los tratamientos D10 y D15 ($p < 0,05$; Figura 23b).

Ensayo	Alim.	Dens.	F. Alim.	Alim/id	Supervivencia					
					24h	48h	96h	144h	168h	192h
ES1	A1	D5	F2	0,02 ¹	NA	0,67 ± 0,33 ^{aa,bb}	0,67 ± 0,33 ^{bbb}	0,67 ± 0,33 ^{bbb}	NA	NA
					NA	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00 ^{bbb}	0,87 ± 0,13 ^{bbb,d}	NA	NA
					NA	0,97 ± 0,03	0,97 ± 0,03 ^{bbb}	0,43 ± 0,15 ^{bbb,d}	NA	NA
					NA	0,93 ± 0,07	0,91 ± 0,06 ^{bbb}	0,67 ± 0,10 ^{bbb}	NA	NA
					NA	0,00 ± 0,00 ^{aaa,ccc}	-	-	NA	NA
	A2	D10	F2	0,02 ¹	NA	0,00 ± 0,00 ^{aa,bb,ccc}	-	-	NA	NA
					NA	0,93 ± 0,07	0,53 ± 0,18 ^{bbb}	0,07 ± 0,07 ^{bbb,d}	NA	NA
					NA	1,00 ± 0,00	0,63 ± 0,09 ^{bbb}	0,00 ± 0,00 ^{bbb,d}	NA	NA
					NA	1,00 ± 0,00	0,56 ± 0,06 ^{bbb}	0,02 ± 0,02 ^{bbb}	NA	NA
					NA	0,07 ± 0,07 ^{aaa,c}	0,00 ± 0,00 ^{bbb}	-	NA	NA
ES6	A1	D10	F2	NI	1,00 ± 0,00	NA	1,00 ± 0,00	0,20 ± 0,12 ^{e*}	NA	0,07 ± 0,07 ^{ee}
					1,00 ± 0,00	NA	0,93 ± 0,07	0,87 ± 0,13	NA	0,40 ± 0,12
					1,00 ± 0,00	NA	0,93 ± 0,07	0,47 ± 0,07	NA	0,20 ± 0,12 ⁱ
					1,00 ± 0,00	NA	0,93 ± 0,07	0,93 ± 0,07 [*]	NA	0,67 ± 0,07 ⁱ
	A2	D10	F2	NII	1,00 ± 0,00	NA	0,93 ± 0,07 ⁱ	0,53 ± 0,18	NA	0,27 ± 0,18 ^{f,j}
					0,93 ± 0,07	NA	0,93 ± 0,07 ⁱ	0,87 ± 0,07	NA	0,60 ± 0,20
					1,00 ± 0,00	NA	1,00 ± 0,00 ⁱ	0,53 ± 0,13	NA	0,27 ± 0,18 ^{i,k}
					1,00 ± 0,00	NA	1,00 ± 0,00 ⁱ	0,93 ± 0,07	NA	0,93 ± 0,07 ^{i,j,k}
	A3	D10	F2	NIII	1,00 ± 0,00	NA	0,80 ± 0,12 ⁱ	0,93 ± 0,07 ^e	NA	0,93 ± 0,07 ^{e,f*}
					1,00 ± 0,00	NA	1,00 ± 0,00 ⁱ	0,33 ± 0,24	NA	0,27 ± 0,18 [*]
					0,87 ± 0,13	NA	0,53 ± 0,24 ⁱ	0,47 ± 0,27	NA	0,47 ± 0,27 ⁱ
					0,93 ± 0,07	NA	0,60 ± 0,23 ⁱ	0,40 ± 0,31	NA	0,60 ± 0,31 ⁱ

Tabla 7. Supervivencia de larvas de *L. latrans* en los ensayos de alimentación expresada como el promedio de la frecuencia de supervivencia (cantidad de vivos/total) ± error standar. Alim: Tipo de alimento suministrado; Dens: densidad en individuos/litro (id/L); F. Alim: Frecuencia de alimentación en horas; Alim/id: cantidad de alimento por individuo. ES1: Ensayo de Supervivencia 1; ES6: Ensayo de supervivencia 6. A1: alimento balanceado para peces en escamas (Shulet®); A2: lechuga licuada; A3: levadura en polvo Levex®; A7: mix (A1+A2+A3). D5: Densidad 5 id/L; D10: 10 id/L; D20: 20 id/L; D30: 30 id/L; D50: 50 id/L. F2: frecuencia de alimentación cada 48 h. ¹Cantidad de alimento en gramos. ²Cantidad de alimento en mililitros. NI: 0,01 gramos/individuo. NII: 0,02 gramos/individuo. NIII: 0,04 gramos/individuo. a: indica diferencias en el factor densidad, D5 y D50 respecto al resto de las densidades. b.: indica diferencias entre los grupos A1 y A2. c: indica diferencias dentro de los grupos entre los tratamientos que llevan c y los que no lo llevan. d: indica diferencias en el factor densidad, solo entre las densidades D10 y D20. *: indica diferencias entre los tratamientos que poseen *. e,f,g,h,j,k: indica diferencias entre los tratamientos que llevan las letras. i: indica diferencias significativas entre el factor nivel de alimentación que lleva la letra; o entre el factor tipo de alimento que lleva la letra. La cantidad de caracteres iguales indica la cantidad de cifras significativas: 1 carácter: $p < 0,05$; 2 caracteres iguales: $p < 0,01$; 3 caracteres iguales: $p < 0,001$. NA: No analizado.

Ensayo	Alim.	Dens.	F. Alim.	Alim/id	Supervivencia													
					24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	192h	216h	240h	264h	288h	312h	336h
ES2	A1	D10	F2	0,02 ¹	NA	NA	NA	0,53 ± 0,13	NA	NA	NA	0,47 ± 0,07 ^{***}	NA	0,40 ± 0,00 ^{e,f,g}	NA	0,40 ± 0,00 ^{e,f,g}	NA	NA
	A2			0,2 ²	NA	NA	NA	0,33 ± 0,07	NA	NA	NA	0,20 ± 0,00	NA	0,20 ± 0,00	NA	0,20 ± 0,00	NA	NA
	A3			0,2 ²	NA	NA	NA	0,20 ± 0,00	NA	NA	NA	0,00 ± 0,00 ^{***}	NA	-	NA	-	NA	NA
	A4			0,02 ¹	NA	NA	NA	0,53 ± 0,07	NA	NA	NA	0,13 ± 0,07	NA	0,13 ± 0,07 ^e	NA	0,13 ± 0,07 ^e	NA	NA
	A5			0,2 ²	NA	NA	NA	0,33 ± 0,13	NA	NA	NA	0,13 ± 0,07	NA	0,13 ± 0,07 ^f	NA	0,13 ± 0,07 ^f	NA	NA
	A6			0,02 ¹	NA	NA	NA	0,07 ± 0,07	NA	NA	NA	0,07 ± 0,07	NA	0,07 ± 0,07 ^g	NA	0,07 ± 0,07 ^g	NA	NA
ES3	A1	D10	F2	0,02 ¹	NA	NA	NA	NA	0,93 ± 0,07	0,93 ± 0,07	0,93 ± 0,07	0,93 ± 0,07	0,93 ± 0,07	0,93 ± 0,07	NA	NA	NA	NA
	A2			0,2 ²	NA	NA	NA	NA	0,93 ± 0,07	0,87 ± 0,07	0,87 ± 0,07	0,80 ± 0,00	0,80 ± 0,00	0,80 ± 0,00	NA	NA	NA	NA
	A3			0,2 ²	NA	NA	NA	NA	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,01	0,93 ± 0,07	0,93 ± 0,07	0,93 ± 0,07	0,93 ± 0,07	NA	NA	NA	NA
	A5			0,2 ²	NA	NA	NA	NA	0,53 ± 0,29	0,53 ± 0,30	0,53 ± 0,31	0,53 ± 0,31	0,53 ± 0,31	0,53 ± 0,31	NA	NA	NA	NA
ES4	A1	D10	F0		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,93 ± 0,07	0,80 ± 0,00	0,80 ± 0,00	0,73 ± 0,07	0,53 ± 0,18	0,20 ± 0,00	0,07 ± 0,07 ^{ee}	0,07 ± 0,07 ^{eee}
			F1		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,93 ± 0,07	0,87 ± 0,07	0,87 ± 0,07	0,87 ± 0,07 ^{e,f,g,h}
			F2	0,01 ¹	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,87 ± 0,07	0,87 ± 0,07	0,80 ± 0,00	0,73 ± 0,07	0,73 ± 0,07	0,67 ± 0,07	0,67 ± 0,07	0,33 ± 0,13 ^f	0,33 ± 0,13 ^{fff}
			F3		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,93 ± 0,07	0,87 ± 0,07	0,80 ± 0,12	0,73 ± 0,13	0,73 ± 0,13	0,73 ± 0,13	0,73 ± 0,13	0,73 ± 0,13	0,60 ± 0,12	0,60 ± 0,12 ^{gg}
ES5	A1	D10	F4		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,80 ± 0,12	0,73 ± 0,18	0,27 ± 0,07	0,27 ± 0,07	0,27 ± 0,07	0,20 ± 0,00 ^{gg}	0,20 ± 0,00 ^{hhh}
			D1		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,67 ± 0,33	0,33 ± 0,33	0,33 ± 0,33	0,00 ± 0,00 [*]	-	-	-	-	
			D5		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00 [*]	1,00 ± 0,00 ^{e,f}	0,93 ± 0,07	0,93 ± 0,07	0,93 ± 0,07	0,93 ± 0,07
			D15		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,97 ± 0,03	0,97 ± 0,03	0,97 ± 0,03	0,97 ± 0,03	0,90 ± 0,58	0,90 ± 0,58	0,80 ± 0,58	0,70 ± 0,15 ^e	0,70 ± 0,15	0,57 ± 0,29	0,57 ± 0,29	0,57 ± 0,29
ES5	A1	D15	<i>ad libitum</i>		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,98 ± 0,02	0,98 ± 0,02	0,84 ± 0,06	0,51 ± 0,26	0,49 ± 0,26	0,47 ± 0,24	0,44 ± 0,24	0,36 ± 0,18 ^{ff}	0,29 ± 0,16	0,29 ± 0,16	0,29 ± 0,16	

Tabla 8. Supervivencia de larvas de *L. latrans* en los ensayos de alimentación expresada como el promedio de la frecuencia de supervivencia (cantidad de vivos/total) ± error estándar. Alim: Tipo de alimento suministrado; Dens: densidad en individuos/litro (id/L); F. Alim: Frecuencia de alimentación en horas; Alim/id: cantidad de alimento por individuo. ES2: Ensayo de Supervivencia 2; ES3: Ensayo de supervivencia 3; ES4: Ensayo de Supervivencia 4; ES5: Ensayo de supervivencia 5. A1: alimento balanceado para peces en escamas (Shulet®); A2: lechuga licuada; A3: levadura en polvo Levex®; A4: hígado vacuno; A5: clara de huevo; A6: corazón vacuno; A7: mix (A1+A2+A3). D1: Densidad 1 id/L; D5: 5 id/L; D10: 10 id/L; D15: 15 id/L. F0: sin alimentación; F1: frecuencia de alimentación cada 24 h; F2: frecuencia de alimentación cada 48 h; F3: frecuencia de alimentación cada 72h; F4: frecuencia de alimentación cada 168 horas. ¹ Cantidad de alimento en gramos. ² Cantidad de alimento en mililitros. *: indica diferencias entre los tratamientos que poseen *. e, f, g, h: indica diferencias entre los tratamientos que llevan las letras. La cantidad de caracteres iguales indica la cantidad de cifras significativas: 1 carácter: $p < 0,05$; 2 caracteres iguales: $p < 0,01$; 3 caracteres iguales: $p < 0,001$.

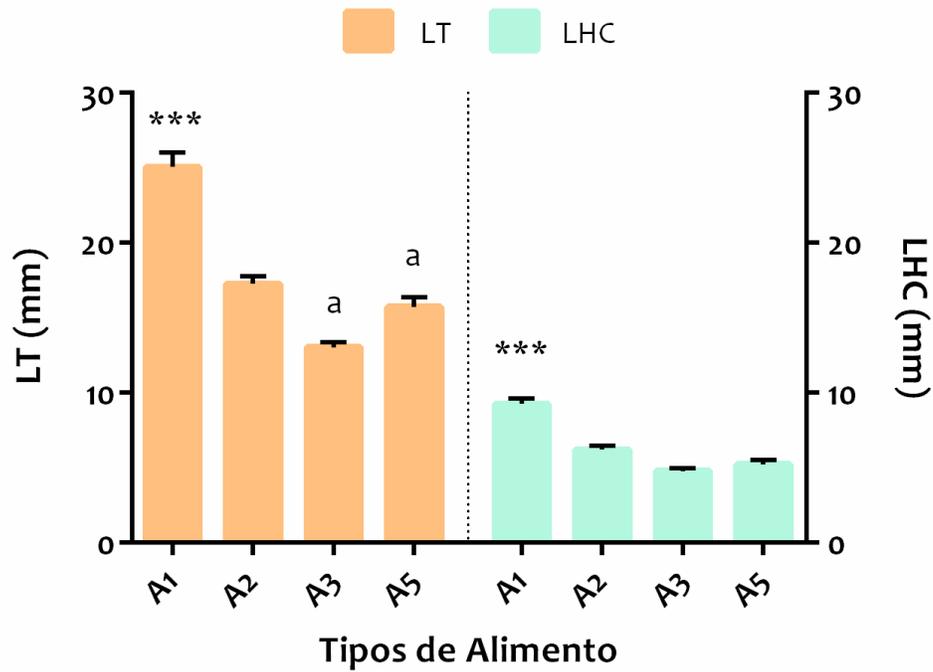


Figura 22. Crecimiento de *L. latrans* frente a distintos tipos de alimento en el ES3. LT: Longitud total expresada en mm. LHC: longitud hocico-cloaca expresada en mm. Datos expresados como el promedio \pm el error estándar. A1: alimento balanceado para peces (Shulet®); A2: lechuga licuada; A3: levadura en polvo (Levex®); A5: clara de huevo. *: indican diferencias con el resto de los tratamientos. a: indica diferencias entre los tratamientos que llevan la letra. La cantidad de caracteres indican las cifras significativas de p . 1 carácter: $p < 0,05$; 3 caracteres: $p < 0,001$.

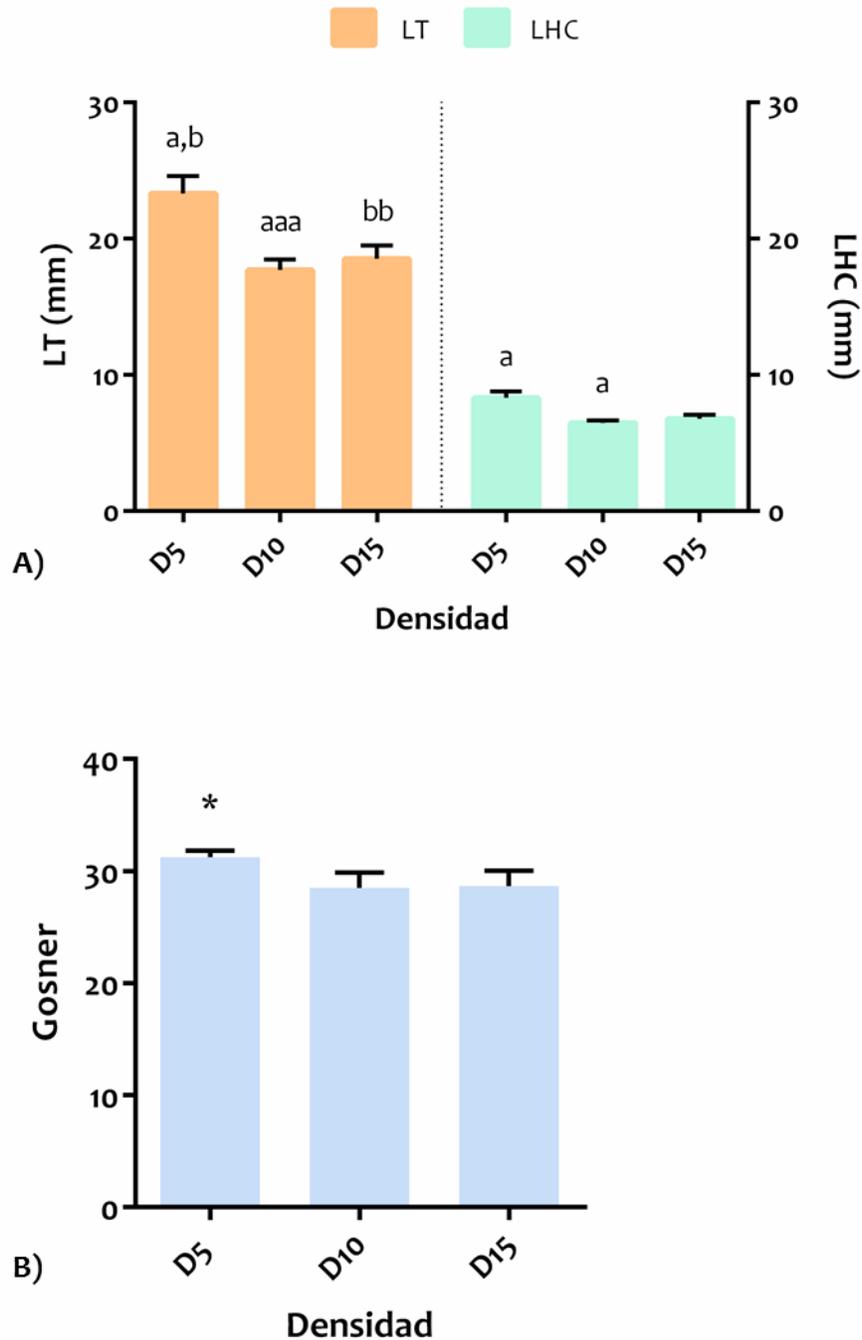


Figura 23. Crecimiento (A) y Desarrollo (B) de *L. latrans* frente a distintas densidades poblacionales en el ES5. A) LT: Longitud total expresada en mm. LHC: longitud hocico-cloaca expresada en mm. Datos expresados como el promedio \pm el error estándar. B) Gosner: estadios del desarrollo según Gosner (1960). D5: densidad de 5 id/L; D10: densidad de 10 id/L; D15: densidad de 15 id/L. *: indican diferencias con el resto de los tratamientos. A y b: indican diferencias entre los tratamientos que llevan la letra. La cantidad de caracteres indican las cifras significativas de p . 1 caracter: $p < 0,05$; 3 caracteres: $p < 0,001$.

Análisis morfo-histológico de las gónadas

Se procesaron un total de 89 individuos entre los estadios de Gs25 hasta juveniles de 4 semanas post-metamorfosis (PM). Los datos morfométricos de las larvas y juveniles se resumen en la Tabla 9.

Estadio	Edad	LT	LC	P
25	340,8 ± 60,72	14,27 ± 1,87	5,50 ± 0,65	0,0096 ± 0
26	168 ± 0	12,79 ± 0,80	5,261 ± 0,54	0,019 ± 0,0013
27	318,9 ± 258	15,01 ± 1,59	6,021 ± 0,64	0,025 ± 0,0083
28	691,2 ± 134,8	17,3 ± 2,01	6,70 ± 1,04	0,051 ± 0,0054
29	829,1 ± 167,1	21,06 ± 2,74	8,686 ± 1,10	0,094 ± 0,035
30	1140 ± 417,8	24,3 ± 3,42	10,19 ± 1,34	0,14 ± 0,051
31	1138 ± 396,4	26,67 ± 4,03	10,9 ± 1,09	0,15 ± 0,11
32	828 ± 50,91	31,16 ± 10,74	12,57 ± 3,01	0,23 ± 0,15
33	1344 ± 410,8	34,88 ± 8,04	13,52 ± 1,79	0,32 ± 0,13
34	1096 ± 312	35,82 ± 5,91	14,45 ± 1,82	0,35 ± 0,16
35	950,4 ± 218,4	42,15 ± 4,87	16,99 ± 1,91	0,62 ± 0,18
36	888 ± 243,6	44,39 ± 7,18	17,27 ± 2,57	0,53 ± 0,22
37	1042 ± 236,7	50,08 ± 8,54	19,81 ± 2,51	0,93 ± 0,39
38	1136 ± 309,5	47,65 ± 7,99	17,99 ± 3,22	0,55 ± 0,27
39	1158 ± 256,5	61,67 ± 10,42	22,46 ± 3,10	1,74 ± 0,74
40	1128 ± 117,6	60,91 ± 9,63	21,54 ± 2,81	1,35 ± 0,63
41	1128 ± 0	52,63 ± 4,86	16,88 ± 0,90	0,61 ± 0,017
42	816 ± 339,4	53,04 ± 15,31	18,73 ± 3,66	0,73 ± 0,38
43	801,6 ± 192,4	48,12 ± 14,24	18,66 ± 3,33	0,74 ± 0,39
44	931,2 ± 170,9	30,34 ± 10,73	15,82 ± 1,91	0,45 ± 0,17
45	804 ± 202,9	20,25 ± 5,28	20,08 ± 3,1	0,69 ± 0,23
46	641,1 ± 82,81	-	19,62 ± 2,78	0,71 ± 0,32
J (1)	7 ¹	-	20,48 ± 2,36	0,70 ± 0,22
J (3)	21 ¹	-	24,41 ± 1,77	0,82 ± 0,37
J (4)	30 ¹	-	22,25 ± 4,57	0,90 ± 0,49

Tabla 9. Parámetros morfométricos a lo largo del crecimiento y desarrollo de *L. latrans* en cautiverio. Valores expresado como promedio ± SD de LT: longitud total (hocico-cola) en mm, LC: longitud del cuerpo (hocico-cloaca) en mm, P: peso en gramos. Edad expresada en horas desde el desove. ¹ Edad expresada en días desde la reabsorción total de la cola. Estadio 25-46 de acuerdo a Gosner; J (1), (3) y (4) corresponden a juveniles de 1, 3 y 4 semanas respectivamente.

Los resultados del análisis morfo-histológico de la gónada se detallan a continuación.

Estadio de gónada indiferenciada

Gosner 25:

En renacuajos desde el Gs25 se hizo evidente el primordio gonadal en la región antero-ventral de los riñones, el cual solo fue distinguible mediante el análisis histológico. El primordio gonadal en este estadio se encontró compuesto de 1 a 2 células germinales, las que se pueden distinguir por su gran tamaño y por la presencia de abundante citoplasma de color claro, a diferencia de las células somáticas, que se encontraron rodeando a las células germinales y que se caracterizan por ser células pequeñas, con escaso citoplasma, y densamente teñidas de color oscuro (Figura 24). Al ir avanzando desde la región craneal hacia la región caudal se hizo evidente en primer lugar, 1 sola célula germinal del lado derecho, y posteriormente una célula germinal en el lado izquierdo. Hacia la región media del riñón pudieron observarse hasta 2 células germinales rodeadas por células somáticas sin estar en estrecho contacto entre sí.

Gosner 30-31:

Hacia el estadio Gs30-Gs31, se observó una gónada indiferenciada, sin clara división en médula y corteza y formada fundamentalmente por células somáticas rodeando unas pocas células germinales aisladas que no se encuentran incluidas en una estructura maciza. La gónada indiferenciada solo se hizo evidente en el análisis histológico (datos no mostrados). No se observaron diferencias con respecto a Gs25.

Gosner 33-34:

Los resultados del análisis macroscópico nos permiten afirmar que la gónada se hace evidente macroscópicamente recién en el estadio Gs33 (Figura 24). En este estadio, la gónada se distingue claramente como dos finos cordones longitudinales en la región medioventral de los riñones, extendiéndose antero-posteriormente desde la región craneal hasta sobrepasar la región media de los mismos. Se distingue además la presencia de un pequeño cuerpo graso del lado izquierdo. El análisis histológico reveló que la gónada indiferenciada es una estructura maciza, a diferencia de lo observado en estadios anteriores, compuesta por varias células germinales de gran tamaño, rodeadas por células somáticas, sin distinguirse aún una clara división médula-corteza (Figura 24).

*Diferenciación gonadal.**Diferenciación del ovario*Gosner 36-37:

Hacia el estadio 36, el cuerpo graso presente en la región anterior de la gónada izquierda, aumenta de tamaño, y los finos cordones gonadales fueron adquiriendo grosor y extendiéndose un poco más hacia la región caudal de los riñones, tendencias que continuaron aun en el estadio 37 (Fig. 24). El análisis histológico mostró una clara diferenciación medula-corteza (Figura 24), observándose en la región caudal de la gónada una regresión incipiente en Gs36, que se define notoriamente en el Gs37, observándose una corteza de células germinales y una cavidad ovárica rodeada de un fino epitelio claramente distinguibles, lo que se interpretó como el primer signo de diferenciación ovárica (Figura 24). Las gónadas que no se diferencian como ovarios, permanecen como gónada indiferenciada (testículo presuntivo). Pudo observarse además que la gónada se reducía y volvía a formar al ir avanzando en sentido cráneo-caudal, lo cual indicaría que la línea germinal, a lo largo de los cordones gonadales es discontinua, si bien este aspecto no es detectado a nivel macroscópico.

Gosner 38-39:

Ya hacia el estado 38 comenzó a verse un acortamiento de los cordones gonadales, lo cual se hizo bien evidente en el estadio 39, extendiéndose longitudinalmente a lo largo de la primera mitad de los riñones. El cuerpo graso, en la región anterior de la gónada izquierda, continuo aumentando de tamaño diferenciándose como una estructura translúcida con múltiples digitaciones (no mostrado). A nivel histológico, las gónadas se diferencian en una corteza de células germinales (oogonias) rodeando una corteza de células somáticas, que luego regresan dando lugar a la cavidad ovárica (Figura 25 A). La actividad mitótica de la oogonia primaria es alta, dando lugar a un grupo (nido) de oogonias secundarias. El nido está separado de los nidos vecinos y de la oogonia primaria por una capa de células somáticas prefoliculares, que no penetran entre la oogonia secundaria dentro del nido (no mostrado). Las gónadas que no se diferencian como ovarios permanecen con la estructura medular intacta identificándose como gónadas indiferenciadas.

Gosner 40:

Hacia el estadio 40, los ovarios comenzaron a mostrar lobulaciones a nivel macroscópico, que posiblemente serán los futuros sacos ováricos. El análisis histológico reveló una médula y cavidad ovárica de mayor tamaño respecto a los estadios precedentes, como así

también, una corteza engrosada debido a la elevada actividad de división celular. Las oogonias secundarias entraron en meiosis y se pudieron diferenciar nidos de oogonias secundarias, y nidos de ovocitos, los que se caracterizan por poseer núcleos redondos y de contorno liso (Figura 24 y 25B).

Gosner 43-45:

Luego del clímax metamórfico, pudo observarse que los ovarios siguen plegándose dando lugar a lobulaciones mayores (=sacos ováricos) distinguibles bajo lupa estereoscópica. A nivel microscópico, los ovarios aumentaron significativamente de tamaño, distinguiéndose los sacos ováricos en corte transversal. Aparecen los primeros ovocitos en diplotene, que ya no están dispuestos en nidos. Los ovocitos en diplotene se caracterizan por ser células de gran tamaño, con un gran núcleo y envueltas por una célula folicular, ya no dispuestas en nidos (Ogielska y col. 2010). Las células foliculares separan los ovocitos en diplotene individuales, dando lugar a folículos ováricos. La corteza ahora está compuesta de ovocitos en diplotene, nidos de ovocitos, nidos de oogonias secundarias y la capa más externa de oogonias primarias únicas (Figura 25 C).

Gosner 46:

Al finalizar la metamorfosis los ovarios han aumentado su grosor y sus plegamientos, extendiéndose a lo largo del tercio anterior de los riñones. El cuerpo graso también crece y se divide en varios procesos digitiformes. El fenotipo macroscópico del ovario es el propio del ovario adulto (Figura 24 y 25 D). El análisis histológico mostro un aumento significativo del tamaño del ovario como resultado del creciente número de ovocitos en diplotene. Las oogonias primaria y los nidos de oogonias secundarias y ovocitos se restringen a las partes externas de la corteza. En individuos juveniles, los ovocitos en diplotene, de acuerdo a Ogielska y col. (2010), que se encuentran presentes suelen ser ovocitos previtelogénicos. Sin embargo, se encontraron además ovocitos vitelogénicos (ovocitos en diplotene, con el citoplasma cubierto con gotas de lípido) (Figura 24 y 25 D)

Juveniles (4 semanas PM):

En individuos con 4 semanas post-metamorfosis, los ovarios no se distinguen significativamente de los ovarios de individuos que acaban de finalizar la metamorfosis a nivel macroscópico. El análisis histológico reveló que al igual que en los juveniles que recientemente finalizaron la metamorfosis, el ovario tiene un gran tamaño, y está formado por ovocitos en diplotene previtelogénicos, con algunos ovocitos que han comenzado con el proceso de vitelogénesis hacia el centro de la gónada en contacto con la cavidad

ovárica. Las oogonias primarias y los nidos de oogonias secundarias (no mostrados) y ovocitos se restringen a las partes externas de la corteza (Figura 25 E).

Diferenciación del testículo

Gosner 40:

Hacia el estadio Gs40 se distinguieron macroscópicamente cordones gonadales con una estructura semejante a las cuentas de un collar, lo que estaría indicando una estructura con cierta metamería (datos nos mostrados). Los cordones gonadales se extienden a través de la mitad anterior de la gónada, siguiendo con la tendencia al acortamiento que había iniciado en el Gs36-37 (Figura 24). El análisis histológico mostro en este estadio el primer indicio de diferenciación testicular; el testículo se observa en corte transversal como una masa de células germinales; la corteza desaparece y las células germinales migran a la médula. Se distinguen células germinales (espermatogonias) que comienzan a agruparse formando cistos, rodeadas de células somáticas (Figura 24).

Gosner 43-45:

El análisis macroscópico reveló que los testículos continúan acortándose desde la región caudal hacia la región craneal, extendiéndose longitudinalmente por la porción antero-ventral de los riñones hasta un poco antes de la región media longitudinal. A nivel histológico, se pudo observar una mayor diferenciación de los cistos de espermatogonias, y un epitelio de células somáticas rodeando todo el testículo (túnica albugínea) (Figura 26).

Gosner 46:

A nivel macroscópico se pudo determinar que el acortamiento de los testículos progresa, extendiéndose sobre el tercio anterior de los riñones. La metamería ya no es evidente, sino que los testículos se distinguen como dos gruesos cordones de apariencia lisa (Figura 24). El análisis histológico reveló una mayor diferenciación y delimitación de los cistos de espermatogonias, los que se ven claramente rodeados por células de sostén (células de sertoli) (Figura 24 y 26).

Juveniles (4 semanas PM):

Macroscópicamente, los testículos se distinguen como dos gruesos cordones de apariencia lisa, extendiéndose a lo largo del tercio anterior de la cara ventral de los riñones, al igual que se observa en los individuos recién metamorfoseados. El análisis histológico mostro una mayor definición de los cistos, los que han comenzado a agruparse en lóbulos

seminíferos que contienen una luz central, donde una vez finalizada la espermatogénesis, serán liberados los espermatozoides (Figura 26 D).

Proporción de sexos en cada estadio

De los resultados del análisis de diferenciación sexual se pudo determinar a partir del estadio 37 la frecuencia de hembras y machos presuntivos (=gónada indiferenciada), por estadio del desarrollo, según Gosner (1960). A partir del Gs40 pudo determinarse además, la frecuencia de machos propiamente dichos.

De este modo, se estableció que entre los estadios Gs25 al Gs34, las gónadas se clasificaron como gónadas indiferenciadas con una frecuencia de ocurrencia del 100% (Figura 27). Por otra parte, en el estadio Gs36-37 pudo determinarse con una frecuencia del 45% la presencia de ovarios y con un 54% de frecuencia el estadio de gónada indiferenciada. Entre los estadios Gs38-39 se pudo establecer una frecuencia de ocurrencia del 42% para el ovario, y del 58% para el estadio de gónada indiferenciada. En el Gs40, se observó una relación ovario:testículo de 71:29; indicando una frecuencia del 71% para la gónada femenina y de un 29% para la gónada masculina (testículo propiamente dicho). Entre los estadios Gs43-45, se pudo observar una relación ovario:testículo de 60:40, con una frecuencia del 60% para la gónada femenina y del 40% para la gónada masculina. Hacia el final de la metamorfosis (Gs46), se observó una relación ovario:testículo:gónada indiferenciada de 20:70:10, con solo una frecuencia del 20% para la gónada femenina, una frecuencia del 70% para la gónada masculina y un 10% de frecuencia para una categoría que se encontraba ausente desde el Gs40, la gónada indiferenciada. Por otra parte, se pudo observar que en los juveniles de 4 semanas post-metamorfosis la gónada indiferenciada también se hizo presente, mostrando una relación ovario:testículo:gónada indiferenciada de 56:33:11 con una frecuencia del 56% para la gónada femenina, un 33% para la gónada masculina y un 11% para la gónada indiferenciada.

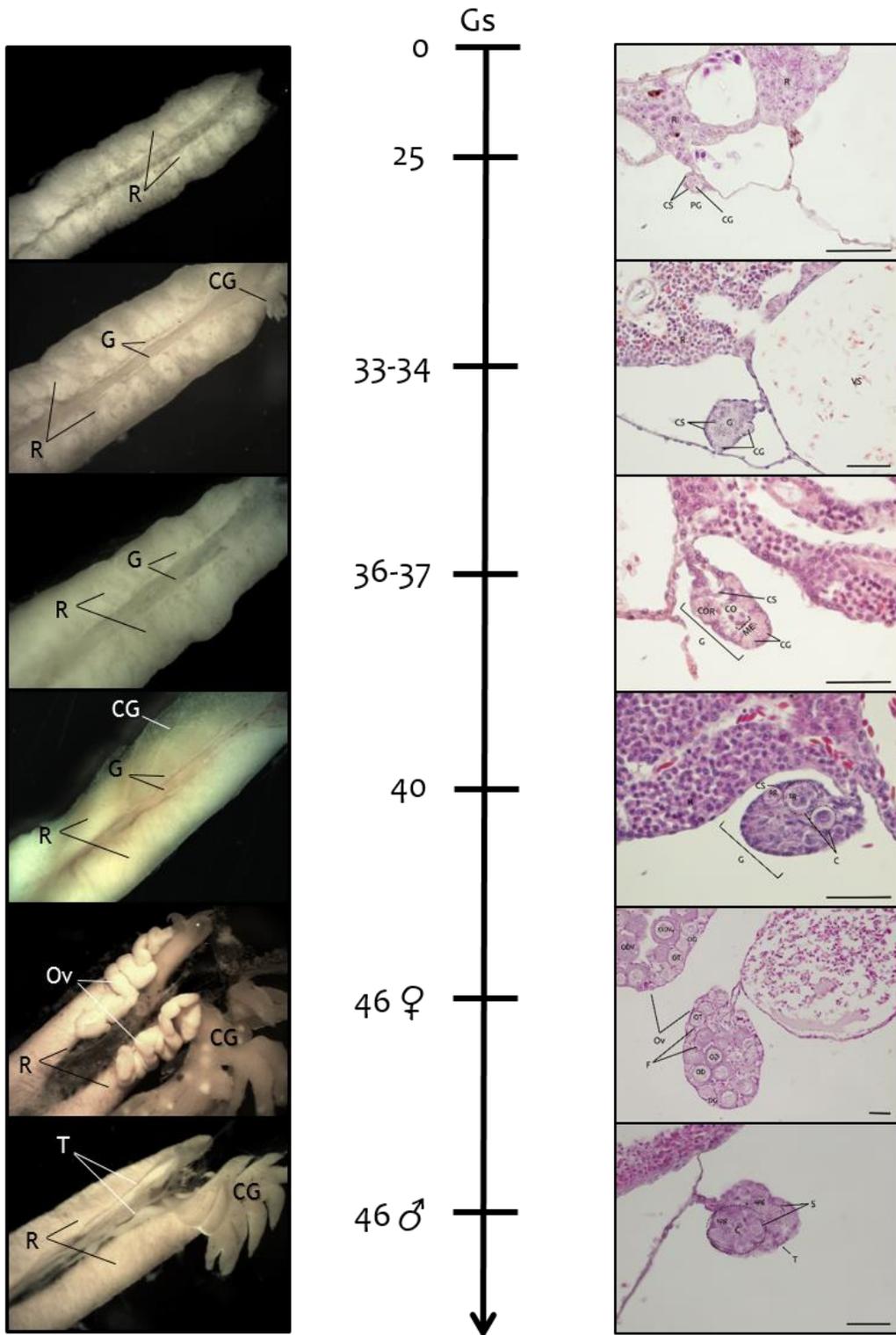


Figura 24. Diferenciación sexual de *L. latrans*. De lado izquierdo: diferenciación sexual macroscópica. Lado derecho: análisis histológico. CG: célula germinal, CS: célula somática, Gs: estadio de Gosner, C: cistos; CO: cavidad ovárica, COR: corteza; G: gónada, Lo: lóculo, ME: médula; OG: oogonia, OD: ovocito en diplotene, OT: ovocito en profase temprana; OV: ovario, PG: primordio gonadal, R: riñón, S: posible célula de sertoli, VS: vaso sanguíneo; T: testículo. La barra equivale a 50 μ m.

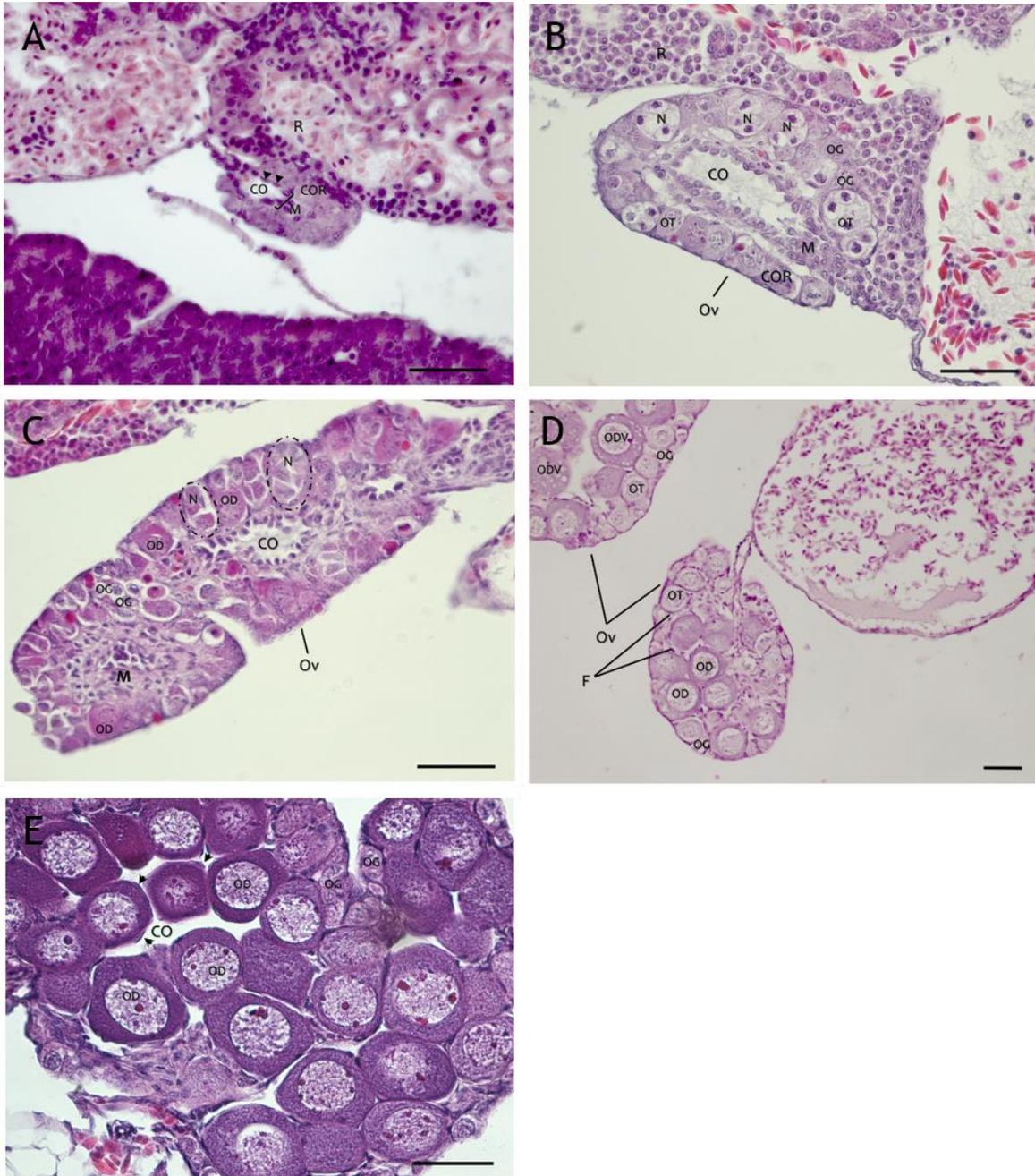


Figura 25. Desarrollo del ovario de *L. latrans*. A- ovario de una larva Gs38. B- ovario de una larva Gs40. C- ovario de una larva Gs45. D- ovario de una larva Gs46. E- ovario de un juvenil de 4 semanas PM. CG: células germinales, CO: cavidad ovárica, COR: corteza; F: células foliculares (marcados con puntas de flecha en E), M: médula, N: nidos de ovocitos, OD: ovocitos en diplotene, ODV: ovocitos en diplotene vitelogénicos, OG: oogonias, OT: ovocitos en profase temprana, Ov: ovario, R: riñón. Triángulos en A: indican la posición de epitelio de células somáticas. La barra indica 50 μ m.

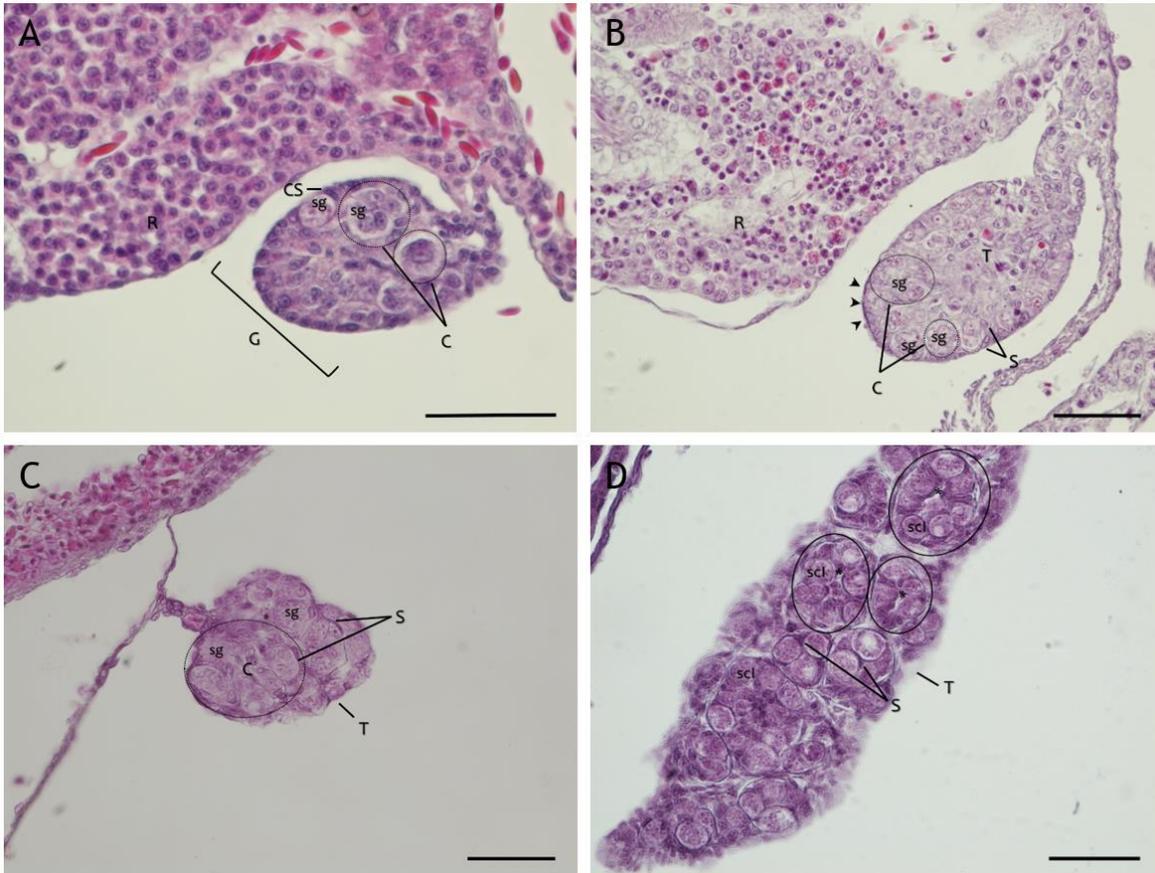


Figura 26. Desarrollo del testículo de *L. latrans*. A- testículo de una larva Gs40. B- testículo de un individuo Gs43. C- testículo de una individuo Gs46. D- Testículo de un juvenil de 4 semanas PM. C: Cistos, CS: células somáticas, S: posible células de sertoli, sg: espermatogonias, scl: espermatocitos primarios, T: testículo, R: riñón. Puntas de fecha en B: indican la posición de una corteza de células somáticas (túnica albugínea). En círculos línea punteada (A,B,C) se indica la posición de los cistos de espermatogonias. En círculos de línea continua (D) se indica la posición de los lóbulos seminíferos. La luz central de los lóbulos se indican con un *. La barra indica 50 µm.

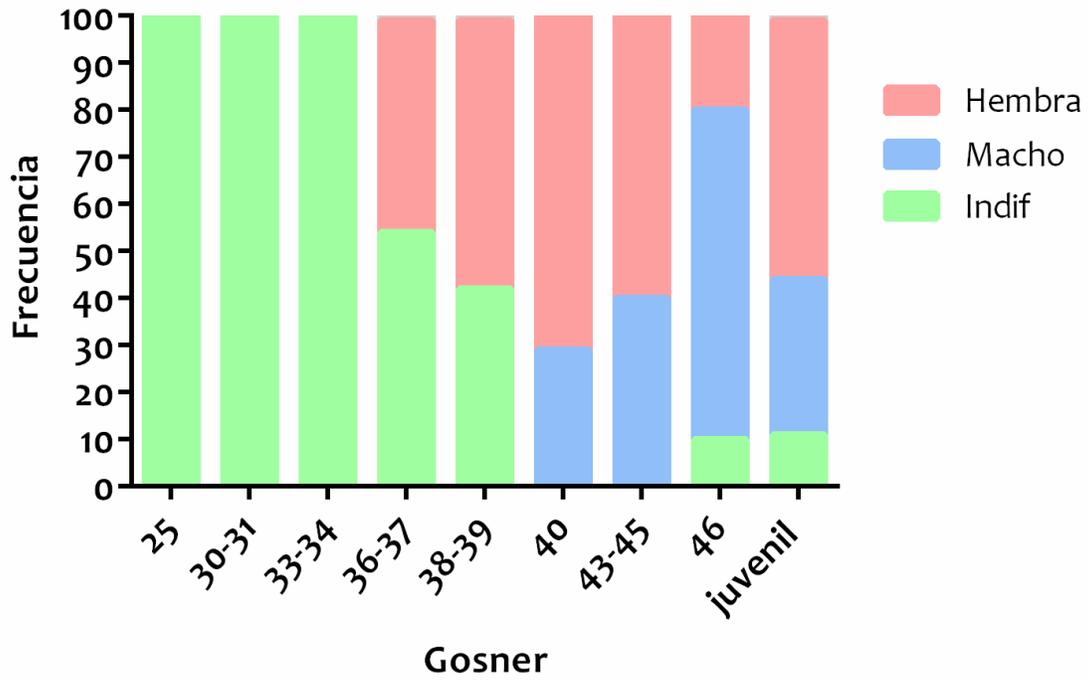


Figura 27. Proporción de sexos observada por estadio en larvas y juveniles de *L. latrans* criados en cautiverio.

Secuencias de genes relacionados con la diferenciación sexual en anuros

Una lista de las secuencias de cebadores degenerados diseñados y utilizados en la amplificación de los fragmentos de interés se muestran en la Tabla 10.

Gen	Nombre	Secuencia
<i>Cyp 19</i>	AROF1	GAATTTGTGAGAGTCTGGAT
<i>Cyp 19</i>	AROF2	AGCTTTGTCTGGACCTGGACT
<i>Cyp 19</i>	AROF3	TTCTTTAAAATTCCTGGCT
<i>Cyp 19</i>	AROR1	AATGAGAATTTCAACAGCCT
<i>Cyp 19</i>	AROR2	CTCCATGATTCTGGGCAA
<i>Cyp 19</i>	AROR3	GGCTGGTACCTCATGCT
<i>foxl2</i>	FOXL2F1	AAGAAGGGCTGGCAGAACAG
<i>foxl2</i>	FOXL2F2	AGGATATGTTGAGAAGGGC
<i>foxl2</i>	FOXL2F3	TACCTGTCCCCACCCAAGTA
<i>foxl2</i>	FOXL2R1	CCACCGGCCATCTGACAGGA
<i>foxl2</i>	FOXL2R2	GGCTGTAGGAGGACGATGC
<i>foxl2</i>	FOXL2R3	CTGGGTGCAGGGCGCTGTG
<i>dmrt1</i>	DMRT1F1	GCTGCAGGAACCACGGCTAT
<i>dmrt1</i>	DMRT1F2	CGTTTCTGTATGTGGCGGGA
<i>dmrt1</i>	DMRT1F3	GCAGCAGGCTCAAGAAGAGG
<i>dmrt1</i>	DMRT1R1	GGTGCTTCACACTCTGCTACA
<i>dmrt1</i>	DMRT1R2	CTTTTCATCTGCCATTGGGTT
<i>dmrt1</i>	DMRT1R3	TCCACATGCCCTCTGCTGG
<i>cyp17</i>	Cyp17F1	AGACCCCGCACAGTGACAAC
<i>cyp17</i>	Cyp17F2	CAGATCATTTCCCGTGAAGC
<i>cyp17</i>	Cyp17R1	TCCTGCTCCAAATATATCCCC
<i>cyp17</i>	Cyp17R2	CCAGCTCTTCCTGGATCTTC
<i>EF1</i>	EF1aF1	GAGAAGGAAGCTGCTGAGATG
<i>EF1</i>	EF1aR1	TGTAGCCAATCTTCTTGATGT
<i>β-actina</i>	B-ACTINF1	GAGTTGCCCTGAAGAGCAC
<i>β-actina</i>	B-ACTINR1	GAGGTAGTCTGTCAGGTCACG

Tabla 10. Secuencias de los primers degenerados utilizados para amplificar los fragmentos de los genes de interés.

Con los cebadores consenso degenerados (Tabla 10) pudimos obtener secuencias parciales correspondientes a los ADNc de los 6 genes de interés (*β-actina*, *EF1*, *cyp17*, *dmrt1*, *cyp19*, *foxl2*) los que se compararon mediante BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con otras secuencias de los mismos genes (Tabla 6) en otras especies de anfibios anuros.

Las secuencias obtenidas y el porcentaje de identidad de estas secuencias se muestran a continuación:

β-actina: Secuencia del fragmento de 241pb de *Leptodactylus latrans*

```
TGTTCTACTAACTGAAGCACCTCTTAACCCCAAAGCCAACAGGGAAAAGATGACACAGATCATGTT
TGAGACTTTCAACACCCCTGCGATGTATGTTGCCATTCAAGCTGTACTGTCTCCGTATGCCTCTGG
ACGTACAACCTGGTATTGTGATGGACTCTGGTATGGTGTCACTCACACTGTGCCAATCTATGAAG
GCTATGCACTGCCCCATGCCATCCTACGTCTAGACTTGGCTGGA
```

Porcentajes de identidad: 93.0% con *Bufo gargarizans* (Hyloidea, FJ617542), 92,6% con *Dryophytes japonicus* (Hyloidea, AB092520); 91.7% con *Engystomops pustulosus* (Hyloidea, AY226144); 91.3% con *Bufo melanostictus* (Hyloidea, DQ904376); 89.3% *Pelophylax lessonae* (Ranoidea, AY272628) y 85,4% *Xenopus laevis* (Pipoidea, NM_001088953).

EF1: Secuencia del fragmento de 355pb de *Leptodactylus latrans*

```
GTCTTGGACAACTGAAGGCTGAACGTGAGCGTGGTATTACCATTGATATCTCTCTGTGGAAATT
TGAGACCAGCAAGTACTATGTCACCATCATTGATGCCCTGGACACAGAGACTTCATCAAGAACAT
GATCACTGGTACTTCTCAGGCAGACTGTGCTGTCTTGATTGTTGCTGCTGGTGTGGGTGAGTTTG
AGGCTGGTATCTCAAAGAACGGACAAACCCGTGAGCATGCTCTCCTGGCCTACACCCCGGGTGTC
AAGCAGCTCATTGTTGGTGTCAACAAGATGGATTCCAACACCATAACAGCCAGAAGAGATAC
GAAGAAATTGTAAAGGAAGTCAGCACTT
```

Porcentajes de identidad: 94.9% con *Dryophytes japonicus* (Hyloidea, AB199910); 91,3% con *Xenopus laevis* (Pipoidea, BC041196) y 89,3% con *Xenopus tropicalis* (Pipoidea, BC157768).

Dmrt1: Secuencia del fragmento de 340pb de *Leptodactylus latrans*

TCATCTCCTCTGAAGGGTCACAAACGTTTCTGTATGTGGAGGGATTGCCAGTGCAAGAAATGCAG
TCTGATTGCAGAGAGACAACGTGTCATGGCTGCCAGGTAGCTTTGAGGAGACAGCAGGCTCAAG
AAGAGGAATTGGGAATAAGCCATCCAATACCTCTACCAAGTACAGCAGAATTGCTTGTGAAACGG
GAACATGTCAGCAACAATGCTTGCCCACTGCTGGAAAACAATTGTGCTCAGGCAGCAAATGTAGC
TACTGCATTAGCCTCAACCAACTCTTCAGAAAACAGGATGCTTGTTTCAGGATATACCTTCTGTTAC
CAGCAGAGGGCATG

Porcentajes de identidad: 91.2% con *Rhinella marina* (Hyloidea, FJ697175); 75,4% con *Xenopus tropicalis* (Pipoidea, AB272609) 74,5% con *Rugosa rugosa* (Ranoidea, AB272609) y 73,9% con *Pelophylax nigromaculatus* (Ranoidea, EF524050),

Cyp 17: Secuencia del fragmento de 397pb (fragmento ensamblado) de *Leptodactylus latrans*

TCCATATGACATGGCTCCGGAAGTACACGAGCTGTCACCAACGTGGTTTGTCTATTGTGTTTCA
ACACAAGATATAGTAGAGGTGATGAAGAGTTTGTAGACCATGCTAAGATACAGCAAAGGCATTGTG
GACACTGTGGCTAAGGACAGCCTGGTTGACATTTTTCTTGGCTCCAGATATCCCAAACAAGGA
CCTCGATATACTAAGACACTCAGTGACAACCCGAGACCAGCTACTCCAGAAGAACTAAAGGAGCA
TGAGGAGGCTTTTTACAGCGAAACAGTCAATGACCTATTGGATGCTCTACTGAAGGCCAAACTCA
GCATGGAAAATAACAACAGCAATATATCTCATGATGTGGGACTGTCAGAGGATCACATCCTGATG
ACCGTC

Para *cyp17* se encontraron dos bandas de distinta longitud para la reacción de amplificación con el mismo set de cebadores. Pudimos observar que ambas bandas se solapaban y fue posible construir un “fragmento ensamblado” de mayor longitud.

Porcentajes de identidad: 80.4% con *Rana dybowskii* (Ranoidea, AF042278), 80,1% con *Rugosa rugosa* (Ranoidea, AB284119) y 75,1% con *Xenopus tropicalis* (Pipoidea, NM_001127045).

FoxL2: secuencia del fragmento de 157pb de *Leptodactylus latrans*

GTGCTTCATCAAAGTGCCAGGGAGGGTGGAGGGGAAAGAAAGGGCAACTACTGGTCCCTGGAC
 CCAGCCTGTGAGGATATGTTTGAGAAGGGAAACTACAGGAGAAGAAGAAGGATGAAGAGGCCAT
 TCAGGCCTCCCCCAGCCACTTCCAAGCA

Porcentajes de identidad: 86.0% con *Rugosa rugosa* (Ranoidea, AB372103), 85,4 con *Xenopus tropicalis* (Pipoidea, XM_002933345) y 80.9% con *Xenopus laevis* (Pipoidea, AB385625).

Cyp19a: secuencia del fragmento de 682pb de *Leptodactylus latrans*

GCTGAGTGATCTCTCTGACGATCTGGGGAAAGTAAATGTCCTCAAGTTAATGAGACTGGTTATGT
 TAGACTTCCAACAAGCTCTTCCTCAGAATTCATTAGATGAGAATGACATTGTTGTAAAGATTC
 AAAAATACTTTGATGCATGGCAGGCACTTCTACTGAAACCAGACATATTCTTCAAGATTTCTGGC
 TCTACAAGAAGTATGAGAAATCTGCCAATGATTTGAAGGAGGCTGTTGAAATTCTCATTGAGCAAA
 AGCGACGGGAGCTTTCCACTTCAGACAAGCTGGATGAGAATATCGATTTTGCAACGGAGCTTATT
 TTTGCACAGAACCATGGAGATCTTACTGCTGAAAATGTGAACCAAAGTATTTGGAGATGCTGATA
 GCTGCTCCTGACACCATGTCTGTGTCTCTGTACTTCATGTTGATCCTGATCGCTCAACATCCAAAA
 GCTGAAGAGATGATAATGAATGAGATCAATACTGTGGTTCGGTGATCGGGAAGTACAGAGTACTGA
 TTTGCAAAGTCTTAAGGTTGTAGAGAATTCATCTATGAGAGTATGAGGTACCAGCCTGTGGTAG
 ATCTTGTCATGCGTAAAGCTCTGGAAGATGATATCATAGATGGCTATTATGTTAAGAAAGGTACCA
 ACATCATCTTGAATCTTGGACGTATGC

Porcentajes de identidad: 91.4% con *Rhinella marina* (Hyloidea, FJ697173); 79.5% con *Rugosa rugosa* (Ranoidea, AB178482); 78,4% con *Xenopus laevis* (Pipoidea, BC079750); 76% con *Xenopus tropicalis* (Pipoidea, BC118823), 74.7% con *Cynops pyrrhogaster* (Salamandroidea, AB164064)

Discusión

Los resultados de los ensayos de supervivencia, permitieron sentar las bases para la cría exitosa de *L. latrans* desde la fase embrionaria hasta la post-metamórfica. Por otro lado, las condiciones de laboratorio propuestas resultaron adecuadas para la cría de *L. latrans* en cautiverio.

Los resultados de los ensayos de supervivencia mostraron que para el ES1 se observó una interacción entre los factores densidad y tipo de alimento durante las primeras 48 horas, lo cual indicaría que el efecto sobre la supervivencia de uno de los factores (la densidad) no es igual en todos los niveles del otro factor (tipo alimento). Esto se vió claramente en el caso de la D5, que no afectó la supervivencia del mismo modo en el tratamiento A1 como en el A2, resultando con una mortalidad del 100% para este último (Tabla 5). Sin embargo, la D5 combinada con el tipo de alimento A1, mostró una elevada mortalidad a las 48 h, pero sin registrarse nuevas mortalidades a lo largo del resto del experimento y manteniendo una supervivencia cercana al 70%. Asimismo, y a nivel general, se observó que el tipo de alimento A1 produjo una supervivencia significativamente mayor en todos los tiempos evaluados, mientras que a tiempo final la densidad D10 fue la que resultó con una supervivencia significativamente mayor. De este modo, se pudo determinar que la combinación de A1 y D10 fue la que mostró una mayor tasa de supervivencia con una supervivencia cercana al 90%. Estos resultados indican, como era de esperarse, que tanto la densidad como el tipo de alimento pueden afectar de manera independiente la supervivencia de las larvas de *L. latrans*.

Los resultados del ES2 mostraron que el tipo de alimento A1 resultó en una supervivencia significativamente superior respecto a los alimentos A3, A4, A5 y A6. Los resultados de ES3 no mostraron efectos significativos en la supervivencia a lo largo de todo el ensayo, sin embargo, la mayor supervivencia registrada fue para el alimento A1.

Los resultados del ES4 mostraron efectos en la supervivencia a partir de las 312 horas, resultando la F1 la que mostró una mayor tasa de supervivencia.

Los resultados del ES5 indicaron que la densidad afectó significativamente la supervivencia a las 216 y 240 horas, resultando la D5 la que mayor tasa de supervivencia mostró en esos tiempos, tendencia que se mantuvo hasta el final del ensayo pero sin mostrar diferencias significativas.

El ES6 mostró efectos en la supervivencia a partir de las 96 h, y a nivel general, se demostró la interacción entre los factores tipo y nivel de alimento, lo cual indicaría que el efecto de un factor sobre la supervivencia, no afecta del mismo modo en todos los niveles del otro factor. En ese sentido, se vió que para el tipo de alimento A1 la supervivencia fue significativamente mayor en el nivel de alimento NIII a las 144 h, mientras que para el nivel de alimento NI se vió una supervivencia significativamente mayor en el A7 respecto al A1 en el mismo tiempo. Resultados similares se observaron a las 192 h, siendo el A1 el que mostró una supervivencia significativamente mayor dentro del nivel de alimento NIII, y el A7 el que mostró una supervivencia significativamente mayor en el NII. En el NI, la supervivencia resultó baja para todos los tipos de alimento al final del ensayo, por lo que resultó un nivel de alimento inadecuado para la cría de esta especie. De este modo, se puede observar que los factores tipo y nivel de alimento no pueden tratarse de manera independiente al evaluar la supervivencia de las larvas.

En resumen, podemos concluir que la densidad tiene un efecto significativo en la supervivencia de las larvas de *L. latrans*, siendo las densidades de 5 individuos/L y de 10 individuos/L las que mostraron una mayor supervivencia. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por Dash y Hota (1980); Martínez y col. (1993); Motealegre-Delgado y col. (2013), quienes observaron un efecto negativo de la densidad en la supervivencia de larvas de anuros, observándose elevadas tasas de mortalidad al incrementar las densidades poblacionales, que, como se mencionara previamente, se explica gracias al fenómeno de competencia intraespecífica (Dash y Hota 1980; Martínez y col. 1993; Motealegre-Delgado y col. 2013). Teniendo en cuenta este concepto, resulta llamativo, sin embargo, que densidades bajas como la densidad de 1 individuo/L resultaron inviables para la cría en laboratorio, con mortalidades a las pocas horas de iniciado los experimentos, sin embargo, esto podría deberse a factores etológicos como el comportamiento gregario que esta especie posee (Gallardo 1974; Vaz-Ferreira y Gerhau 1975).

Teniendo en cuenta el tipo de alimento, podemos concluir que el alimento balanceado para peces (Shulet®) fue el que mejor tasa de supervivencia mostró; aunque se pudo determinar, que el tipo de alimento no es un factor que pueda analizarse independientemente del nivel de alimento. De este modo, se pudo determinar que el nivel de alimento que mejor resultados mostró para el alimento balanceado para peces fue el NIII (0,04 g/id), mientras que niveles bajos de alimento, demostraron un mejor resultado

en el mix de alimento (lechuga + balanceado + levadura en polvo). Esto puede explicarse por la composición nutricional de cada alimento, ya que en función de ésta, se requerirán distintas cantidades per cápita para cubrir los requerimientos nutricionales mínimos para la supervivencia, crecimiento y desarrollo de los organismos. Estos requerimientos son, además, especie-específicos (Álvarez y Nicieza 2002 y Pelegrín 2004).

Asimismo, se pudo determinar que la frecuencia F1 (alimentación cada 24 h) fue la más adecuada para obtener elevadas tasas de supervivencia durante la cría de esta especie. Este factor se relaciona directamente con el nivel de alimento, sobre todo en larvas con elevados requerimientos energéticos o elevada competencia intraespecífica, lo que posibilita un suministro de alimento constante durante mayores periodos de tiempo. Además, mayores frecuencias de alimentación, con cantidades inferiores de alimento, favorecen el consumo del alimento en su totalidad y evitan la descomposición de los restos, ayudando a otorgar mejores condiciones de cría para los organismos.

Teniendo en cuenta el crecimiento y desarrollo, se pudo determinar que el tipo de alimento y la densidad afectaron significativamente ambos puntos finales. Tanto en la evaluación de la LT, como de la LHC, se pudo determinar que el alimento balanceado para peces omnívoros (A1), fue el que mayor tasa de crecimiento mostró (Figura 22). Al igual que para el caso de la supervivencia, estos resultados se explican desde el punto de vista de la composición nutricional, con énfasis en la composición proteínica, como ya han afirmado otros investigadores (Álvarez y Nicieza 2002 y Pelegrín 2004). El alimento A1 (alimento balanceado para peces omnívoros en escamas Shulet®) contiene varios de los otros ítems alimenticios probados en esta especie en los ensayos de supervivencia y cuya composición proteínica mínima es del 40% (Anexo III). Asimismo, también se pudo determinar que tanto para la LT, como para la LHC, la densidad de 5 individuos/L fue la mostró una mayor tasa de crecimiento (Figura 23a). Un resultado similar pudo observarse al analizar los efectos de la densidad sobre el desarrollo, obteniéndose larvas en estadio de desarrollo superiores en la densidad de 5 individuos/L respecto de las densidades superiores (Figura 23b). Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por Dash y Hota (1980), Hota y Dash (1981), Kehr (1987; 1989), Martínez y col. (1996), quienes afirman que larvas criadas en elevadas densidades tienen una tasa de crecimiento inferior respecto a las criadas en menores densidades. Lo cual también se explica, como en el caso de la supervivencia, por el fenómeno de competencia intraespecífica, o interferencia (Laufer y Maneyro 2008). Sin embargo, los resultados obtenidos difieren de las

observaciones previas realizadas por Laufer y Maneyro (2008) en la misma especie, quienes concluyeron que el crecimiento de los renacuajos de *L. latrans* no se ve afectado por la densidad, sino por la cantidad de alimento, eliminándose la posibilidad de una competencia intraespecífica por el recurso. Nuestros estudios indican que densidades de 1 individuo/L, así como densidades mayores a 10 individuos/L no resultan adecuadas para la supervivencia ni para el correcto crecimiento y desarrollo de esta especie. Estas diferencias en los resultados pueden deberse a diferencias en la forma de análisis y de interpretación de los datos estadísticos, o a adaptaciones locales debido a que las larvas corresponden a lugares geográficos y ecosistemas diferentes.

Los estudios del desarrollo gonadal y diferenciación sexual en *Leptodactylus latrans*, nos permitieron concluir que la diferenciación sexual a nivel histológico ocurre durante su fase larval, antes del clímax metamórfico. Este hecho hace que esta especie pueda ser un buen modelo para evaluar el efecto de contaminantes ambientales (que se acumulan en cuerpos de agua) sobre el desarrollo gonadal. El primer indicio de diferenciación sexual histológica ocurre en el estadio Gs37, diferenciándose en primera instancia los ovarios, los cuales pueden indentificarse mediante la formación de una cavidad ovárica (producto de la regresión de una medula de células somáticas) y una corteza formada por células germinales. En esa instancia, no fue posible identificar testículos, por lo que aquellas gónadas en larvas de Gs37 que no presentaron los caracteres de una gónada femenina, fueron tomadas como testículos presuntivos, aunque también podrían ser ovarios con su diferenciación retrasada. Se pudo observar además, que hacia el estadio 40, los testículos fueron claramente distinguibles en el análisis histológico, observándose una medula de células germinales y una corteza de células somáticas limitada a una fina capa externa. De este modo, la especie *L. latrans* resultó una especie gonocórica con un patrón de diferenciación sexual de tipo “indiferenciado” (sensu Gramapurohit y col. 2000).

Por otra parte, la diferenciación sexual a nivel macroscópico ocurrió posteriormente al clímax metamórfico, siendo evidente los plegamientos y lobulaciones del ovario en Gs43-45 y haciéndose claramente distinguibles en el estadio 46 de Gosner, por lo cual la diferenciación sexual a nivel macroscópico no sería detectable durante el desarrollo larval, sino que sería observable una vez iniciada la metamorfosis.

El esquema de desarrollo y diferenciación del ovario en *L. latrans* sigue el patrón propuesto por Ogielska y Kotusz (2004). Además, la tasa de diferenciación del ovario resultó de tipo acelerada (Ogielska y Kotusz 2004). Por otra parte, la diferenciación del

testículo también resultó acorde al esquema de diferenciación propuesto por Haczkiwicz y Ogielska (2013), siguiendo una tasa de diferenciación testicular, que en esta especie resultó de tipo retardada (Goldberg 2014).

La proporción de sexos (macho-hembra) observada en condiciones controladas, siguió una relación aproximada 1:1 durante el desarrollo larval y clímax metamórfico. Sin embargo, en el estadio 46, se detectó una desviación de las proporciones esperadas, con una mayor frecuencia de gónadas masculinas, tendencia que se invirtió en juveniles de 4 semanas PM. Estas diferencias en las proporciones esperadas pueden deberse a desviaciones en el muestreo debido al azar, y es posible que repetir los estudios aumentando el número de individuos muestreado ayude a explicar estas observaciones.

En resumen, y teniendo en cuenta las hipótesis y objetivos propuestos durante el desarrollo del presente capítulo de tesis, se puede concluir que *L. latrans* es una especie adecuada para la cría en cautiverio. Asimismo, se pudo comprobar que la supervivencia, crecimiento y desarrollo de *L. latrans* se ve modificada frente a las distintas condiciones de cría (densidad, tipo y cantidad de alimento, y frecuencia de alimentación). Resultando adecuados para una óptima cría en cautiverio, las densidades entre 5 y 10 individuos/L, con una frecuencia de alimentación cada 24 a 48 horas y utilizando como alimento de base el balanceado para peces omnívoros en cantidades de 0,02 a 0,04 g/id. En lo referente al desarrollo gonadal, se comprobó además que la diferenciación sexual ocurre durante su fase larval y que es detectable a nivel histológico, siendo observable a nivel macroscópico durante la metamorfosis. La diferenciación tanto del ovario como del testículo, se adecúa a los patrones y tasas de diferenciación descritos en la bibliografía para otra especies de anuros. La frecuencia de sexos por estadio resulto cercana a la proporción 1:1, con algunas desviaciones en estadios específicos, y con posterioridad a la diferenciación sexual, por lo cual se estima haya habido variaciones en el muestreo aleatorio.

Como último paso, se obtuvieron las secuencias de genes con posibles funciones en la diferenciación sexual, para su utilización como biomarcadores de diferenciación testicular (*dmrt1* y *cyp17*) y ovárica (*cyp19* y *foxl2*) en *Leptodactylus latrans*, por lo cual este resultado es de importancia para futuras investigaciones con esta especie, la que además resultó un adecuado modelo de laboratorio.

La comparación de estas secuencias con secuencias conocidas en otros anfibios confirmó que se trata de las secuencias de los genes en estudio. No se realizaron estudios de la

historia filogenética de cada uno de estos genes debido a que se trata de secuencias parciales a partir de las cuales se diseñarán cebadores específicos para medir la abundancia de mensajeros de cada uno de estos genes en cada fase del desarrollo.

Es importante remarcar, que hasta el momento no existían datos disponibles sobre los patrones de diferenciación sexual y desarrollo gonadal de esta especie, constituyendo este el primer aporte a la materia. Esta información resulta de especial relevancia para el desarrollo de este trabajo de tesis ya que es punto de partida para el desarrollo del siguiente capítulo.

Como se dijera anteriormente, y dado que una vía de contaminación importante es la vía acuática, y que la diferenciación sexual en *L. latrans* ocurre durante su fase de vida larval, las larvas *L. latrans* pueden ser excelentes modelos para estudiar los efectos de estos contaminantes sobre la diferenciación gonadal.

Capítulo III:

*“Efectos del glifosato sobre larvas de
Leptodactylus latrans.”*

Introducción

El Glifosato

El glifosato (N-fosfometilglicina; Figura 28) es un herbicida post-emergente, de amplio espectro, utilizado para combatir malezas. Se utiliza principalmente en los cultivos de soja, pero también, entre otros, en los cultivos de maíz y algodón. Fue desarrollado y comercializado en 1974 bajo una formulación conocida como Roundup®, por la compañía Monsanto, y actualmente se lo considera uno de los herbicidas más ampliamente utilizados a nivel mundial (Duke y Powles 2008). Respecto a su modo de acción, se conoce que el glifosato impide el crecimiento de las plantas al inhibir la producción de aminoácidos aromáticos esenciales, mediante la inhibición competitiva de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Esta es una enzima clave en la vía del ácido shikímico para la biosíntesis de corismato, que es un precursor de los aminoácidos aromáticos esenciales fenilalanina, tirosina y triptofano (Giesy y col. 2000; Villalba 2009; Annett y col. 2014; Gill y col. 2017 Figura 28). Además, también afecta a la síntesis de compuestos aromáticos tales como ligninas, alcaloides, flavonoides, ácidos benzoicos y hormonas vegetales, puesto que los aminoácidos aromáticos son precursores de estos compuestos secundarios (Villalba 2009).

Las prácticas agrícolas, experimentaron un cambio paradigmático con el advenimiento de la "nueva revolución verde" que incluyó la implementación de semillas genéticamente modificadas, la labranza cero y la siembra directa (Atlin y col. 2017; Bindraban y col., 2009; Evenson y Gollin, 2003). Los cultivos GM resistentes al glifosato poseen una modificación en su genoma, la cual les permite tolerar la exposición al herbicida. De este modo, cuando se rocía un cultivo, las malezas a su alrededor mueren, pero el cultivo de interés (GM) es resistente y puede acumular el herbicida a medida que crece. Entre los ejemplos de cultivos GM tolerantes a glifosato se incluyen la soja, el maíz, el algodón, la remolacha azucarera y la canola (Bradshaw y col. 1997; Duke y Powles 2008). El desarrollo de variedades de cultivos GM tolerantes al glifosato llevó a un aumento exponencial de la demanda y el uso de este herbicida, revolucionando cómo y cuándo se aplica este químico; y conduciendo al incremento de la concentración de agroquímicos en los diferentes compartimentos ecosistémicos (Annett y col. 2014; Li et al., 2014; Etchegoyen et al., 2017).

Los métodos típicos de aplicación de las formulaciones comerciales basadas en glifosato, implican rociar soluciones acuosas desde equipos mecánicos de tierra, con pulverizadores portátiles o por aplicadores aéreos autorizados (Giesy y col. 2000; Annett y col. 2014). Luego de su aplicación, los componentes del herbicida pueden alcanzar el suelo y ser transportados a otras áreas, o incluso, ser adsorbidos directamente en el suelo para ser degradados por microorganismos. Esta última posibilidad conduce a una movilidad más baja tanto del glifosato como de su metabolito principal, el ácido aminometilfosfónico (AMPA; Giesy y col. 2000; Borggaard y Gimsing 2008; Al-Rajab y Hakami 2014). Alternativamente, el herbicida puede ser transportado a las capas más profundas del suelo a través del flujo de macroporos, o bien, alcanzar las aguas superficiales por escorrentía (Borggaard y Gimsing 2008; Coupe y col. 2012).

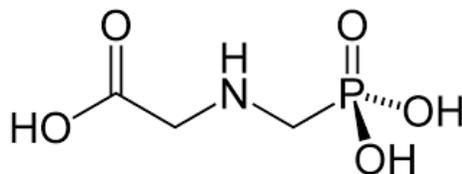


Figura 28. Estructura molecular del glifosato (N-fosfonometilglicina).

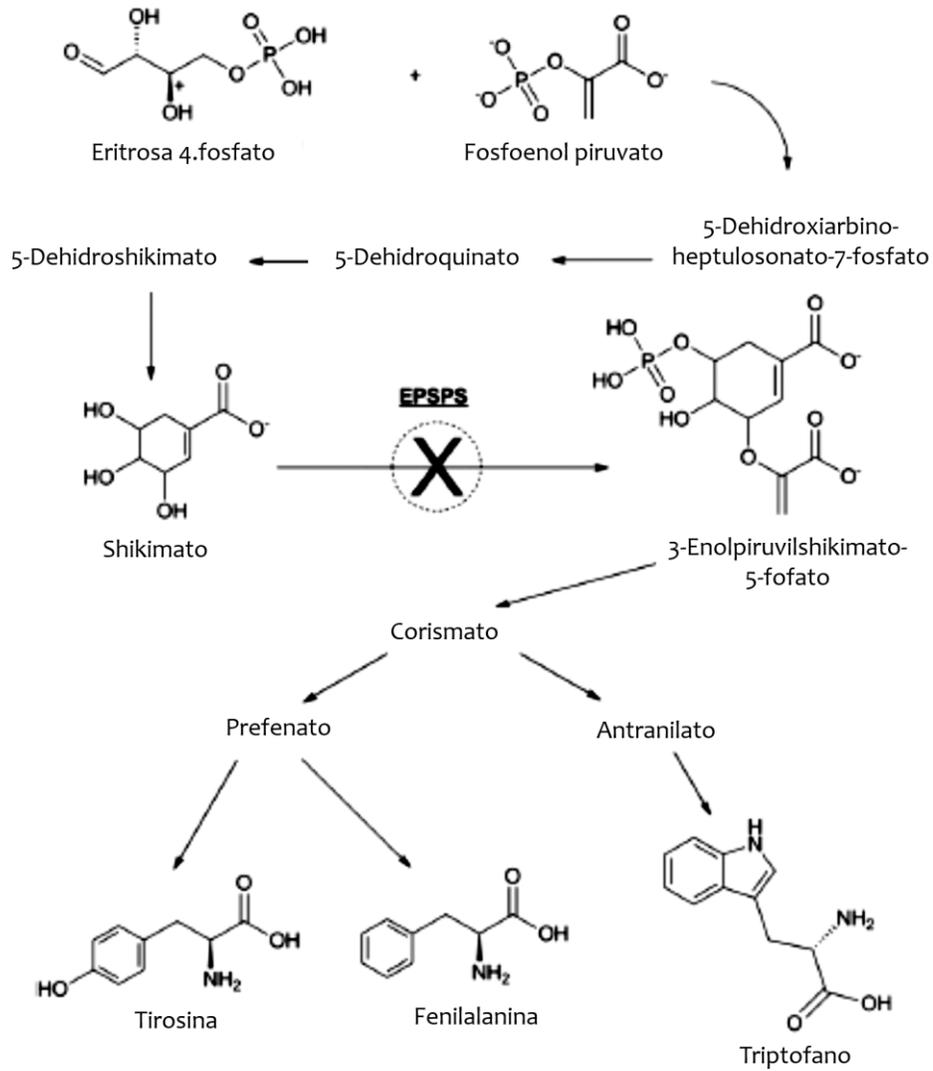


Figura 29. Mecanismo de acción del glifosato en plantas, modificado de Annett y col. (2014)

El glifosato en Argentina y el mundo

Como se expuso en párrafos anteriores, la expansión agrícola de la mano de la “nueva revolución verde” ha llevado a un incremento en el uso de los plaguicidas; siendo el glifosato el más utilizado a nivel mundial (Duke y Powles 2008). Este es también el caso en Argentina, donde las formulaciones basadas en glifosato representan los herbicidas más comercializados del país según la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFA, 2015). En relación a esto, se observó que durante los últimos años, la superficie del área cultivada de soja GM, diseñada para ser resistente al glifosato, registró un incremento significativo en nuestro país (López y col. 2012; SAGyP, 2017), y actualmente, la Argentina encabeza la lista de los principales productores de soja a nivel mundial, junto con los Estados Unidos y Brasil (Benbrook, 2016).

Como ya se mencionara anteriormente en la introducción general de esta tesis, y debido a la creciente preocupación por la posible contaminación de recursos, como consecuencia de la utilización de glifosato y otros plaguicidas, se llevaron a cabo en nuestro país numerosos estudios con miras a determinar los niveles de glifosato en diferentes matrices ambientales, en ambientes asociados a sitios agrícolas (Peruzzo y col. 2008; Aparicio y col. 2013; Lupi y col. 2015; Ronco y col. 2016; Mac Loughlin y col. 2017; Primost y col. 2017). En ese sentido, se conocen valores de hasta 8,105 mg/kg en suelos de la provincia de Buenos Aires y Entre Ríos (Aparicio y col. 2013; Primost y col. 2017); y de hasta 0,7 mg/L en aguas superficiales y 5,0 mg/kg en sedimentos de las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes, Santa Fe, Chaco y Formosa (Peruzzo y col. 2008; Aparicio y col. 2013; Lupi y col. 2015; Ronco y col. 2016; Mac Loughlin y col. 2017; Primost y col. 2017).

Efectos del glifosato en biota no blanco

Contrariamente a la afirmación que sostiene que el glifosato es un compuesto inocuo para especies no blanco, se han publicado evidencias de efectos adversos por exposición tanto a glifosato (ingrediente activo) como a formulaciones comerciales de este herbicida en organismos no blanco (Annett y col. 2014; Uren Webster y col. 2014; de Brito Rodrigues y col. 2016). Asimismo, y en contraposición a la antigua resolución por parte de organismos internacionales, que el glifosato no era de naturaleza carcinogénica (Duke y Powles 2008);

un último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO) demostró que el glifosato está asociado a la prevalencia de linfoma no Hodgkin en algunos estudios de casos y controles (Gill y col. 2017). Por lo tanto fue clasificado como “probable carcinogénico para humanos”, clase 2A por la IARC (Agencia Internacional de Investigación del Cáncer; Fritschi y col. 2015).

Efectos letales en anfibios

Los efectos letales de distintas formulaciones comerciales de glifosato y su correspondiente ingrediente activo se han estudiado en larvas de diferentes especies de anfibios anuros. Las concentraciones que producen un 50% de mortalidad (CL50) van de valores cercanos a 1 hasta 24,78 mg de equivalentes ácidos por litro (mg e.a./L) por exposición aguda (96 h) a los formulados comerciales (Mann y Bidwell 1999; Howe y col. 2004; Govindarajulu 2008; Bernal y col. 2009; Relyea y Jones 2009; Fuentes y col. 2011; Moore y col. 2012; Güngördü 2013; Yadav y col. 2013; Annett y col. 2014, Mikó y col. 2017; Bonfanti y col. 2018). Debido a que el glifosato (ingrediente activo) no ha demostrado tener efectos letales en larvas de anfibios, algunos investigadores atribuyeron esta diferencia en la toxicidad entre ambos compuestos, a los surfactantes presentes en las formulaciones comerciales (Giesy y col. 2000; Edginton y col. 2004; Howe y col. 2004; Puglis y Boone 2011; Moore y col. 2012).

Efectos subletales en anfibios

El monitoreo de efectos subletales, como los efectos en el comportamiento, crecimiento, desarrollo, presencia de anomalías morfológicas y los efectos histopatológicos, entre otros, sobre las larvas de los anuros, resulta de relevancia a la hora de evaluar el *fitness* de los anfibios adultos (Berven y Gill 1983; Smith 1987). Se ha observado que efectos perjudiciales en la actividad natatoria tienen efectos negativos en la búsqueda de alimento y afectan la capacidad de los renacuajos para evitar activamente a sus predadores (Semlitsch 1993; Stauffer y Semlitsch 1993; Horat y Semlitsch 1994; Jung 1995; Semlitsch y col. 1995; Rist 1997; Broomhall y Shine 2003; Denoël y col. 2013). Por otra parte, es bien conocido que las condiciones ambientales pueden alterar el crecimiento y el desarrollo de lavas de anuros, resultando en elevadas tasas de desarrollo durante un

corto periodo de tiempo y en tamaños menores a la metamorfosis. Estos cambios afectan la supervivencia, incrementando la edad a la cual alcanzan la madurez sexual, con una disminución en el tamaño de los individuos al momento de su primera reproducción y una consecuente disminución en la fecundidad (Wilbur y Collins 1973; Smith-Gill y Berven 1979; Morey y Reznick 2000; Denver y Crespi, 2006). Además, se conoce la ocurrencia de ciertas anomalías morfológicas en poblaciones de anfibios que habitan en agroecosistemas (Cooke 1981; Peltzer y col. 2011; Agostini y col. 2013). Estas alteraciones anatómicas pueden afectar la natación (ej., anomalías en el eje axial y la presencia de edemas) y en muchos casos disminuir las probabilidades de escape ante los predadores, o bien, afectar otros comportamientos como la alimentación normal (ej., anomalías en el disco oral) (Rowe y col. 1996; Rowe y col. 2001; Venesky y col. 2010a and b; 2013; Tolledo y col. 2014; Babini y col. 2015).

Se conocen efectos subletales producto de la exposición a formulaciones comerciales de glifosato, y del ingrediente activo (i.a.), en larvas de anfibios anuros. Por ejemplo, para las formulaciones comerciales, se han documentado efectos en el crecimiento y desarrollo, en la actividad natatoria, en el comportamiento, y en la función cardíaca y respiratoria, junto con la formación de anomalías morfológicas, alteraciones en la piel, daño en el ADN y alteraciones en la actividad de ciertas enzimas. Los valores de concentraciones que han producido estos tipos de efectos subletales, se encuentran dentro del rango de 1 a 27 mg e.a./L, y son observados en todos los casos luego de una exposición aguda (Clements, Ralph y Petras 1997; Lajmanovich, Sandoval y Peltzer 2003; Lajmanovich y col. 2011, 2013; Edginton y col. 2004; Costa y col. 2008; Risolli y col. 2016). Además, se han publicado efectos sobre el crecimiento, el desarrollo, anomalías gonadales, alteraciones en la morfología del renacuajo, y los niveles de ARNm de genes implicados en el desarrollo y la metamorfosis dentro del rango de 0,2 a 4 mg e.a./L luego de una exposición crónica (Howe y col. 2004; Relyea 2004, 2012; Lanctôt y col. 2013, 2014; Baier y col. 2016, Bokoni y col. 2017). Aunque la información existente sobre los efectos subletales del glifosato (i.a.) es escasa, los efectos por exposición aguda y crónica que han sido documentados son similares a los observados por exposición a los formulados: efectos en el crecimiento y desarrollo, alteraciones en la piel, anomalías morfológicas, alteración de las proporciones sexuales, lesiones hepáticas, y efectos en los niveles de ARNm de genes involucrados en la metamorfosis y el desarrollo (Lanctôt y col. 2014; Risolli 2016, Pérez Iglesias y col. 2016; Bonfanti y col. 2017).

Aunque se han utilizado numerosos biomarcadores para evaluar los efectos del glifosato en especies de anfibios anuros, es necesario generar nuevas herramientas de diagnóstico, particularmente en relación con los órganos que desempeñan un papel vital en los procesos de detoxificación, como lo es el hígado. En ese sentido, se han estudiado los efectos del glifosato en la histología del hígado de peces (Nešković y col. 1996; Jiraungkoorskul y col. 2003; Hued y col. 2012; Shiogiri y col. 2012; Bawa y col. 2017; dos Santos Rezende y col. 2017) y mamíferos (Benedetti y col. 2004; Çağlar y Kolankaya 2008; Malatesta y col. 2008; Larsen y col. 2012), aunque es escasa la información disponible de este tipo de efectos en los anuros (Pérez-Iglesias et al., 2016). El hígado desempeña un papel fundamental en los procesos de biotransformación de los xenobióticos, que en ectotermos involucran tanto a los hepatocitos como a los melanomacrófagos (MMc; Fenoglio y col. 2005; Steinel y Bolnick, 2017). Los MMc son macrófagos que se agregan en centros de melanomacrófagos (MMC) y que producen y almacenan tres pigmentos: melanina, hemosiderina y lipofuscina (Agius 1981; Franco-Belussi 2012; 2013; Pérez-Iglesias y col. 2016). Estos MMc están involucrados en procesos de detoxificación, debido a una combinación de procesos de biotransformación enzimática y a la acción de eliminación de sustancias tóxicas por parte de la melanina (Fenoglio y col. 2005). Además, debido a su naturaleza fagocítica, los MMc pueden englobar material extraño y participar en la defensa inmune (Loumbourdis y Vogiatzis 2002; Sichel y col. 2002; Wolke 1992). También se ha demostrado que los xenobióticos pueden alterar la abundancia de MMc y MMC en el hígado (Loumbourdis y Vogiatzis 2002; Paunescu y col. 2010; Franco-Belussi y col. 2013; Çakıcı 2015; Zieri y col. 2015; de Gregorio y col. 2016; de Oliveira y col. 2016; Pérez-Iglesias y col. 2016), y debido a esto, se los propuso como biomarcadores citológicos e inmunológicos (de Oliveira y col. 2016; Pérez-Iglesias y col. 2016; Steinel y Bolnick 2017). Sin embargo, hasta donde sabemos, y teniendo en cuenta la importancia de evaluar los efectos de los xenobióticos en las etapas larvarias, debido a las diferencias biológicas y a la mayor sensibilidad de estas con respecto a las etapas terrestres de anfibios (Mann y Bidwell, 1999; McDiarmid y Altig, 1999), no existen informes acerca de efectos del glifosato sobre la histología del hígado de larvas de anuros.

En lo que respecta a los efectos del glifosato como un posible perturbador endócrino, existen algunas evidencias que sostienen esta hipótesis, como arroja el estudio realizado por Howe y col. (2004). En ese trabajo, se observó un aumento en la incidencia de anomalías gonadales, como individuos intersexo, así como cambios morfológicos, en

renacuajos de *Lithobates pipens* luego de exposiciones a los formulados comerciales Roundup Original® y Roundup Transorb®. Además, se evidenció un aumento en la expresión del ARNm del receptor β de la hormona tiroidea (TRB) en la cola de renacuajos de *L. pipiens* en Gs25, sugiriendo que la regresión de la cola que se produce en la metamorfosis, se encuentra alterada, y una posible alteración del eje retinoide o tiroideo inducida por la exposición al surfactante POEA (polioxietilen-alkil amina), y formulaciones que contienen el surfactante (Howe y col. 2004). En ese sentido, existen datos de exposiciones *in vitro* a Roundup® que sostienen una relación con la alteración de la proteína reguladora aguda esteroideogénica (StAR), responsable del transporte de colesterol a través de la membrana mitocondrial interna, durante la esteroideogénesis (Walsh et al., 2000).

A pesar de la amplia distribución y las características particulares de *Leptodactylus latrans* ya comentadas en capítulos anteriores del presente trabajo de tesis, los efectos de diferentes plaguicidas y otros contaminantes en renacuajos de esta especie no se han estudiado exhaustivamente, existiendo solo unos pocos trabajos en la temática (Araújo y col. 2014a, 2014b; Lajmanovich y col. 2015).

Finalmente, los efectos del glifosato en especies nativas de Argentina, se conocen sólo en dos larvas de anfibios: *Scinax nasicus* (Hylidae: Lajmanovich y col. 2003), y *Rinella arenarum* (Bufonidae: Lajmanovich y col. 2011, 2013; Junges y col. 2013), y en adultos de una especie nativa, *Leptodactylus latinasus* (Pérez-Iglesias y col. 2016).

Hipótesis y objetivos

Es vista de lo expuesto, en el presente capítulo, se plantean las siguientes hipótesis y objetivos:

Hipótesis:

- ☞ La exposición aguda a Roundup Ultramax producirá efectos letales en larvas de *L. latrans* en distintos estadios del desarrollo.
- ☞ Roundup Ultramax producirá efectos subletales en larvas de *L. latrans*, afectando el crecimiento y desarrollo, la actividad natatoria, e induciendo anomalías morfológicas e histopatológicas, durante exposiciones agudas, en diferentes estadios del desarrollo larval.
- ☞ Roundup Ultramax producirá efectos en la diferenciación sexual de *L. latrans* en exposiciones de laboratorio de tipo crónica.
- ☞ La exposición aguda a glifosato grado técnico no producirá efectos letales en larvas de *L. latrans* en distintos estadios del desarrollo.
- ☞ El glifosato grado técnico producirá efectos subletales en larvas de *L. latrans* similares a los observados en las larvas expuestas al formulado comercial.

Como objetivos de este capítulo se proponen:

- ☞ Evaluar los efectos letales del herbicida (conteniendo glifosato) Roundup Ultramax (RU) y del glifosato grado técnico (GLY) en larvas de *L. latrans* en dos estadios del desarrollo según Gosner (1960), el estadio 25 (Gs25) y el 36 (Gs36), mediante la utilización de bioensayos de toxicidad aguda (96 h de exposición).
- ☞ Evaluar los efectos subletales: actividad natatoria, crecimiento, desarrollo y ocurrencia de anomalías morfológicas, producidas por la exposición aguda (96 h) de larvas de *L. latrans* (Gs25 y Gs36) al herbicida RU y a GLY.

- ☞ Evaluar los efectos subletales histológicos del GLY y la formulación comercial RU, en el hígado de larvas de *Leptodactylus latrans* de Gs36 mediante el uso de bioensayos de toxicidad aguda (96 horas de exposición).
- ☞ Explorar los posibles efectos de perturbación endócrina (Ej: alteración en la proporción de sexos) producidas por la exposición crónica de larvas de *L. latrans* (Gs34) al herbicida RU y a GLY.

Metodología

Bioensayos de Toxicidad

Se realizaron dos tipos de bioensayos de toxicidad:

- A) Exposición aguda a 96 h, incluyendo RU y GLY, para evaluación de efectos letales y subletales de ambos compuestos.
- B) Exposición crónica a 14 días, incluyendo RU y GLY, para evaluación de efectos en la diferenciación sexual (proporción de sexos).

Preparación de las soluciones de exposición

Las soluciones de ensayo se prepararon utilizando el formulado comercial Roundup Ultramax® (Monsanto Argentina S.A.I.C., Maipú, Buenos Aires, Argentina), el cual contiene 74,7% de la sal monoamónica de N-fosfonometilglicina (67,9% [p/p] de equivalentes ácidos) e ingredientes inertes *quantum satis*. Para la evaluación del principio activo, se utilizó glifosato ácido grado técnico de 95,1% de pureza (Gleba, La Plata, Buenos Aires, Argentina). Las diluciones se realizaron a partir de soluciones stock de 740 mg e.a./L de RU y una solución stock de 1500 mg/L de GLY. Todas las soluciones fueron preparadas con agua de red filtrada mediante filtro físico Aqua-Pure® de 5 µm (Modelo AP-110 H/C) y decolorada mediante aireación continua (en adelante, agua de bioensayo) durante 48 horas (pH = 7,8 ± 0,1; oxígeno disuelto, 7,7 ± 0,3 mg/l; conductividad, 663,17 ± 15,01 µS/cm; dureza, 142,03 ± 2,31 mg CaCO₃/L). La solución stock de GLY se ajustó a pH neutro con una solución de NaOH 0,1 N. Se tomaron muestras de las soluciones de ensayo en las concentraciones bajas, medias y altas (de acuerdo con el diseño experimental), en el momento de finalizar las diluciones y luego de 24 h de exposición, con el objetivo de confirmar las concentraciones nominales a lo largo de toda la exposición. Las concentraciones se determinaron mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS; Agilent 1100 system, Agilent Technologies Inc., Miami, FL, USA) seguida de la derivatización con cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo, según metodologías estandarizadas (Meyer y col. 2009). Los disolventes utilizados en el análisis cromatográfico fueron calidad de cromatografía líquida de alto rendimiento, mientras que las sales fueron

de calidad analítica (Mallinckrodt Baker Inc., EE. UU.). El agua nanopura se obtuvo en el laboratorio por medio de un sistema de purificación de agua Sartorius (Sartorius AG, Göttingen, Países Bajos). El estándar de glifosato (99%) se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

Obtención de larvas de L. latrans

Para los ensayos agudos, se colectaron pequeñas porciones (aproximadamente el 10%) de 5 nidos de espuma de *L. latrans* recientemente depositados (8-10 h), en charcas temporarias de dos áreas bastante bien conservadas; una situada en Berisso (34° 55.723 'S, 57° 43.131' O) en un sector costero inhabitado del estuario del Río de la Plata; y la segunda en un área rural de la planicie de inundación del arroyo El Pescado, que corresponde al Sitio 1 descrito en el primer capítulo de este trabajo. Para la realización de los ensayos crónicos, se colectaron pequeñas porciones (aproximadamente el 10%) de 4 nidos de espuma de *L. latrans* recientemente depositados (8-10 h) en una charca temporaria correspondiente al Sitio 5, descrito en el capítulo I. Todos los nidos de espuma fueron recolectados con permiso de la Dirección de Flora y Fauna de la Provincia de Buenos Aires (Expediente 22500-33442/16, Disposición N°54) y transportados al laboratorio. Una vez allí, los organismos fueron mantenidos en una densidad máxima de 10 id/L en agua de bioensayo, con aireación continua, bajo condiciones controladas de laboratorio (temperatura de 25 ± 1 °C y un fotoperíodo de 16L:8O). Las larvas fueron alimentadas *ad libitum* con lechuga licuada y alimento balanceado para peces (Shulet®) hasta que los individuos alcanzaron el estadio requerido de acuerdo al diseño experimental. Todos los renacuajos fueron tratados de acuerdo con el Marco de Referencia Ético para la Investigación Biomédica: Principios Éticos para la Investigación con Animales de Laboratorio, Granja y Animales Silvestres (CONICET, 2005).

Diseño experimental: bioensayos de Toxicidad

Los bioensayos de toxicidad aguda fueron realizados en renacuajos de dos estadios del desarrollo según Gosner (1960): Gs 25 (±0) y Gs36 (±2) según metodologías estandarizadas propuestas por la Agencia de Protección ambiental de Estados Unidos (USEPA 1975) y la

Sociedad Americana de Ensayo de Materiales (ASTM 2007), con modificaciones menores por Natale y col. (2006). Los bioensayos de exposición crónica se realizaron con renacuajos de Gs34 ($\pm 1,5$) según metodologías estandarizadas (USEPA 2002, USEPA 2011) con modificaciones menores detalladas en la sección correspondiente.

Bioensayos de toxicidad aguda con larvas Gs25

Los bioensayos se realizaron en recipientes de vidrio, conteniendo 5 individuos y 500 ml de la correspondiente solución de ensayo. Se trabajó en condiciones semi-estáticas (con reemplazo total del medio de ensayo cada 24 h) y con 4 réplicas por concentración. En base a ensayos preliminares, decidimos incluir la alimentación de los organismos en algunos de los bioensayos, debido a la evidencia de un posible efecto de inanición a las 72 h que podría afectar la supervivencia de los renacuajos jóvenes. Por lo tanto, se realizaron dos tipos de bioensayos agudos con larvas de Gs25 teniendo en cuenta la frecuencia de alimentación, con el objetivo de comparar los efectos bajo ambas condiciones experimentales. Los renacuajos del ensayo con alimentación (c/a) fueron alimentados con 1 ml de lechuga licuada cada 24 h, una hora antes del reemplazo del medio de ensayo. Los renacuajos del ensayo sin alimentación (s/a) no fueron alimentados a lo largo del experimento. Se realizaron bioensayos preliminares con el fin de alcanzar un amplio rango de concentraciones para evaluar efectos letales y subletales. Los bioensayos definitivos fueron realizados con 23 concentraciones, en el rango de 0,0007 a 9,62 mg e.a./L de RU (abarcando concentraciones subletales y letales), siete concentraciones entre 3 y 300 mg/L de GLY, y un grupo control con agua bioensayo.

Bioensayos de toxicidad aguda con larvas Gs36

Los bioensayos fueron realizados en base a los resultados de los experimentos con larvas de Gs25, evaluando siete concentraciones entre 0,37 y 9,62 mg e.a./L de RU (abarcando concentraciones letales y subletales), y siete concentraciones entre 3 y 300 mg/L de GLY (incluyendo solo concentraciones subletales). Una vez que el 50% de los renacuajos alcanzaron el Gs36, los individuos fueron dispuestos en cámaras de bioensayo de acuerdo con el procedimiento experimental detallado en secciones anteriores. Las condiciones de ensayo fueron las mismas que aquellas explicadas para los bioensayos con larvas de Gs25.

Los renacuajos no fueron alimentados durante los bioensayos con larvas de Gs36, debido a que estas no manifestaron síntomas de inanición durante los estadios avanzados.

Bioensayos de exposición crónica con larvas Gs34

Los bioensayos de exposición crónica para evaluación de efectos en la diferenciación sexual se realizaron con larvas de Gs34, y se determinó el inicio del experimento una vez que el 50% de las larvas hubieran alcanzado dicho estadio. Se evaluaron concentraciones subletales en todos los tratamientos, tomando como base los resultados de los ensayos agudos realizados con larvas de *L. latrans* Gs25 y Gs36 para GLY y RU. De este modo, las concentraciones subletales evaluadas fueron: para GLY de 100 mg/L y para RU de 0,3 mg e.a./L. Además, se utilizó un grupo control con agua de bioensayo y todos los tratamientos contaron con tres réplicas. Se utilizaron recipientes de vidrio de 3 L de capacidad, conteniendo 1 L de solución de ensayo y 10 larvas (densidad final de 10 larvas/L). Las larvas fueron alimentadas cada 24 horas, con alimento balanceado para peces (Shulet®), y se realizó el recambio de las soluciones de ensayo cada 24 horas. El ensayo tuvo una duración final de 14 días.

Puntos finales letales

La mortalidad fue evaluada cada 24 h, determinándose por la ausencia de movimiento luego de tocar suavemente los renacuajos con una varilla de polipropileno, así como por el cambio en su color y apariencia general. Los individuos muertos fueron removidos y fijados en solución acuosa de formaldehído 10% (v/v).

Puntos finales subletales

Actividad natatoria

La actividad natatoria fue registrada cada 24 h, observándose la natación de cada individuo durante 1 min. luego de hacer girar suavemente el agua con una varilla de polipropileno. Los efectos en la actividad natatoria se clasificaron de acuerdo a las

descripciones realizadas por Brunelli y col. (2009) con mínimas modificaciones (Ruiz de Arcaute y col. 2012), e incluyendo tres categorías: nado regular, nado irregular (nado errático, torsiones del cuerpo y convulsiones), e inmovilidad (ausencia total de movimiento durante el período de observación, pero con ligeros movimientos al tocarlos suavemente con una varilla de polipropileno).

Crecimiento, Desarrollo y Anormalidades morfológicas

Al final de los experimentos, todos los renacuajos aún vivos fueron anestesiados con benzocaína (250 mg/L) y sacrificados por decapitación, de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión Europea (Close y col. 1996) y el Marco Ético de Referencia para la Investigación Biomédica: Animales de Laboratorio, Granja y Animales Silvestres (CONICET, 2005). Posteriormente se los fijó en solución Bouin, y finalmente se los preservó en solución acuosa de etanol 70% (v/v) para su posterior evaluación del crecimiento, desarrollo, ocurrencia de anormalidades morfológicas, evaluación de la histopatología hepática y de los efectos en la diferenciación sexual.

El crecimiento se determinó mediante la medición de la longitud del cuerpo (LHC) de acuerdo a McDiarmid y Altig (1999) con un calibre digital de 0,01 mm de precisión. En los ensayos crónicos se registró, además, el peso del cuerpo en gramos con una balanza digital de 0,0001 g de precisión marca Acculab (Grupo Sartorius, EEUU de América).

El desarrollo y las características morfológicas fueron observados bajo lupa binocular Nikon SMZ745T (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY, USA), equipada con una cámara 519CU 5. ROM-CMOS (Micrometrics®, Unitron, Commack, NY, USA).

Los estadios del desarrollo se clasificaron según Gosner (1960) y las anormalidades morfológicas según Cooke (1981), Bantle y col. (1996), Peltzer y col. (2013), Altig (2007), y Tolledo y col. (2014) con modificaciones menores. Se consideraron en total 14 tipos de anormalidades. Las anormalidades del eje axial fueron clasificadas como: flexión lateral de la cola (flexión de la cola $< 60^\circ$), flexión lateral severa de la cola (flexión de la cola $\geq 60^\circ$), flexión dorsal de la cola (la cola esta curvada en el plano vertical hacia la región dorsal del cuerpo), flexión ventral de la cola (la cola esta curvada en el plano vertical hacia la región ventral del cuerpo), cola ondulada (la cola se curva más de una vez en el plano horizontal), y cola enrollada (la cola se enrolla sobre si misma formando una espiral). La presencia de edemas fue clasificada como: edema abdominal (en la región intestinal del cuerpo), edema torácico (en la región cardiaca del cuerpo) y edema facial

(en la cabeza, particularmente en la región facial). Las alteraciones intestinales se registraron como un enrollamiento anormal del intestino. Por último, las anomalías orales se definieron como la pérdida (ausencia) de la mandíbula superior y/o inferior, la decoloración de la mandíbula superior y/o inferior (mandíbulas grisáceas), la pérdida (ausencia) de las filas de dientes superiores y/o posteriores, y anomalías de las crestas dentarias (crestas dentarias superiores y /o posteriores conteniendo espacios anormales, o ausentes por completo).

Histología hepática

Para el análisis histológico del hígado, a las 96 h de exposición se seleccionaron cuatro concentraciones de RU (0,37; 0,74; 2,22; y 5,25 mg a.e./L), cuatro concentraciones de GLY (3, 15, 75 y 300 mg / L) y un grupo de control, de los ensayos agudos con larvas Gs36. Posteriormente, seleccionamos al azar cinco renacuajos de cada tratamiento que habían sido previamente fijados en Bouin y finalmente conservados en etanol acuoso al 70% (v/v). El cuerpo de las larvas se deshidrató en una serie de alcoholes de graduación creciente, y se embebió en parafina, luego fue seccionado en serie a 6 µm de espesor, y teñido con hematoxilina y eosina. Se observaron diez cortes transversales, tomados cada 12 µm, por cada individuo bajo un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600), equipado con una cámara digital (Nikon Digital Sight DSFi-Japón), utilizando el programa NIS-Elements F 3.0. El número de MMc hepáticos y de MMC por área hepática se determinó según Perez-Iglesias et al. (2016) y de Oliveira et al. (2016), con modificaciones menores. Brevemente: contamos el número de MMc y MMC en cada sección de hígado, y realizamos el cociente por área de hígado. El área analizada del hígado se determinó utilizando el programa Image-Pro Plus. Los puntos finales histopatológicos se evaluaron según Çakici (2015) y fueron: infiltración, congestión y lipidosis.

Efectos en la diferenciación sexual

Al final del ensayo, las larvas fueron anestesiadas con benzocaína (250 mg/L) y sacrificadas por decapitación (Close y col. 1996; CONICET 2005), previo registro de variables morfométricas. Las larvas fueron posteriormente disecadas y se extrajo el complejo riñón-gónada, el que fue fijado en Bouin a 4°C durante 24 h y preservado en etanol acuoso (70%). Los tejidos fijados fueron procesados mediante técnicas histológicas de rutina

(deshidratación, inclusión, corte a 6 μm y tinción) explicados en detalle en el capítulo II (Figuras 20 y 21). Para la evaluación de efectos en la diferenciación sexual se observaron los cortes bajo microscopio óptico Nikon Eclipse E600), equipado con una cámara digital (Nikon Digital Sight DSFi-Japón). Se determinaron cuatro estados de diferenciación sexual: (1) Macho, (2) Hembra, (3) Intersexo, (4) gónada indiferenciada. La determinación de los testículos se realizó según El Jamil y col. (2008) y Haczkiewicz y Ogielska (2013); la determinación de los ovarios se realizó según Ogielska y Kotusz (2004) y El Jamil y col. (2008); la determinación de Intersexos se estableció según (Hayes y col. 2003), y la determinación de gónada indiferenciada se realizó según Ogielska y Kotusz (2004), El Jamil y col (2008) y Haczkiewicz y Ogielska (2013).

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de regresión entre las concentraciones de glifosato (RU y GLY) nominales y medidas en el agua. El coeficiente de regresión (b) fue utilizado para corregir las concentraciones presentadas en este capítulo. Las concentraciones medidas en el tiempo inicial (0 h) y luego de 24 h fueron comparadas mediante un test de *t* pareado de acuerdo con Zar (2010).

Los datos de la actividad natatoria fueron registrados en tres categorías, explicadas en la sección anterior, como nado regular, nado irregular, e inmovilidad. Cada categoría fue medida y registrada como una respuesta binaria (presencia-ausencia). Los datos de actividad natatoria y mortalidad fueron analizados por el método Probit (Finney 1971) mediante el uso del Programa Probit Analisis, versión 1.5 (USEPA 1999) con el fin de estimar las concentraciones que producen 50% de efecto (EC_{50}) y la CL_{50} , respectivamente. Las curvas concentración-respuesta (C-R) a diferentes tiempos (24, 48, 72, 96 h) fueron estimadas con sus límites de confianza de 95%. Los coeficientes de regresión (a y b) y correlación (r) se calcularon para cada curva C-R y las comparaciones entre las distintas rectas de regresión se realizaron según Zar (2010).

Además, los datos de actividad natatoria, crecimiento y anormalidades fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba *post-hoc* de Dunnet (Zar 2010) para estimar la concentración más alta a la que no se observa efectos (NOEC) y la concentración más baja en la que se observa efecto (LOEC). Los supuestos del ANOVA fueron

corroborados por la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, ó de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett (Zar, 2010).

Los efectos en el desarrollo fueron evaluados mediante el test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba *post-hoc* de Dunn para detectar diferencias respecto al grupo control (Zar 2010).

La concentración letal incipiente se estimó (según los valores de CL_{50}) como el punto al cual la curva se hace paralela al eje de las x, según Newman (2015).

Las comparaciones entre los valores de CL_{50} para las condiciones de alimentación y no-alimentación fueron realizadas mediante un test de *t* pareado (Zar 2010). La comparación entre las curvas C-R letales para los dos estadios del desarrollo (Gs25 y Gs36), a cada tiempo de exposición, se realizó mediante la comparación de las rectas de regresión lineal simple según Zar (2010), mientras que las comparaciones de datos subletales a las 96 h entre GLY y RU, y entre Gs25 y Gs36, se realizaron mediante un test de *t* pareado según Zar (2010).

Se estimaron los promedios del número de MMc/mm^2 y MMC/mm^2 de 10 secciones de hígado por individuo, de 5 renacuajos por tratamiento, y se evaluaron mediante una prueba de ANOVA de una vía seguida por la prueba *post hoc* de Dunnet para detectar diferencias con respecto al grupo de control. Los supuestos del ANOVA fueron corroborados por la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett (Zar, 2010). Los datos que no cumplieron con los supuestos del ANOVA se analizaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis seguida de la prueba *post hoc* de Dunn (Zar, 2010).

Los puntos finales histopatológicos se expresaron como la proporción de individuos con cada punto final y se transformaron angularmente de acuerdo con Zar (2010). Con estos datos, se realizó un prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba *post hoc* de Dunnett para detectar diferencias con respecto al grupo de control.

Los datos de diferenciación sexual fueron analizados mediante una prueba de G de bondad de ajuste según Zar (2010).

El nivel de significancia utilizado para todas las pruebas fue $\alpha = 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Graph Pad Prism 5.00, salvo la prueba de G de bondad de ajuste, la cual fue realizada con el programa R v. 2.11.1 (R Core Team 2010).

Resultados

Análisis Químico

Las concentraciones de glifosato utilizadas durante los ensayos fueron corregidas en función de las concentraciones medidas en las soluciones de ensayo de GLY y RU. Asimismo, las concentraciones medidas en el tiempo inicial (0 h) y luego de 24 h, no resultaron significativamente diferentes ($p = 0.507$), indicando que las concentraciones de glifosato permanecieron constantes durante los bioensayos.

Efectos letales agudos

Los efectos letales del RU en las larvas de *L. latrans* de Gs25 y Gs36 se resumen en la Tabla 11. Debido a la elevada mortalidad en el grupo sin alimentación a las 96 h, se pudo observar que *L. latrans* requiere alimentación durante los estadios tempranos del desarrollo (Gs25), mientras que tal alimentación no es necesaria si los bioensayos son realizados con estadios avanzados (Gs36). Por otra parte, el test de *t* pareado comparando los valores de CL_{50} entre las condiciones c/a y s/a luego de 24, 48, y 72 h de exposición no indicaron diferencias significativas ($t = 2,767$; $df = 2$; $p > 0,05$), sugiriendo que la administración de alimento no influencia los efectos letales del glifosato bajo condiciones de exposición aguda.

No se observaron efectos letales en ninguna de las concentraciones de GLY hasta los 300 mg/L, en ninguno de los tiempos evaluados, tanto para renacuajos de Gs25 como de Gs36 (Tabla 12).

La comparación múltiple de las curvas C-R para larvas Gs25 expuestas a RU durante diferentes periodos de tiempo, indicaron diferencias significativas ($F = 30,90$; $df = 4$; $p < 0,0001$) excepto entre las 72 y 96 h de exposición (prueba *post-hoc* de Tukey $p > 0,05$). Estos resultados sugieren que las formulaciones de glifosato inducen un efecto letal en larvas de *L. latrans* durante los primeros días de exposición y alcanzan el valor incipiente luego de 72 h (Figura 30). Las comparaciones entre las curvas C-R de renacuajos Gs25 y Gs36 expuestos a RU mostraron diferencias significativas a las 72 ($t = 10,571$; $df = 1$; $p < 0,001$) y 96 h de exposición ($t = 10,296$; $df = 1$; $p < 0,001$), indicando que las larvas Gs25 fueron más sensibles a la toxicidad por RU, que las Gs36 (Tabla 11).

Tiempo (h)	CL ₁₀ (95% LC)	CL ₅₀ (95% LC)	CL ₉₀ (95% LC)	a	b	r
"Con alimentación" Gosner 25						
24	5,48 (5,00-5,81)	6,76 (6,45-7,11)	8,36 (7,84-9,22)	-11,63	17,30	0,94
48	2,90 (2,48-3,18)	3,86 (3,60-4,11)	5,15 (4,78-5,81)	-1,29	9,22	0,91
72	2,80 (2,36-3,03)	3,28 (3,03-3,46)	3,84 (3,63-4,25)	-1,90	11,63	0,94
96	2,84 (2,46-3,05)	3,26 (3,04-3,43)	3,74 (3,54-4,09)	-3,34	13,81	0,93
"Sin alimentación" Gosner 25						
24	5,97 (5,42-6,31)	7,13 (6,80-7,55)	8,50 (7,92-9,75)	-16,68	22,22	0,97
48	4,71 (4,25-5,02)	5,70 (5,42-5,97)	6,90 (6,51-7,58)	-7,41	14,25	0,93
72	3,09 (1,82-3,71)	4,17 (3,27-4,65)	5,62 (5,06-6,79)	-1,42	9,59	0,66
"Sin alimentación" Gosner 36						
72	7,84 (5,94-8,52)	9,61 (8,92-11,45)	11,78 (10,43-19,75)	-8,17	11,80	0,98
96	7,40 (6,35-7,94)	8,67 (8,12-9,28)	10,16 (9,45-11,91)	-10,90	14,90	0,98

Tabla 11. Efectos letales del RU en larvas de *L. latrans* Gs25 y Gs36. Tiempo: indica el tiempo de exposición en horas. CL_{10/50/90}: concentración letal para el 10/50/90% de la población. LC: límites de confianza. CL y LC95% se indican en mg e.a./L. a: ordenada al origen; b: pendiente; r: coeficiente de correlación.

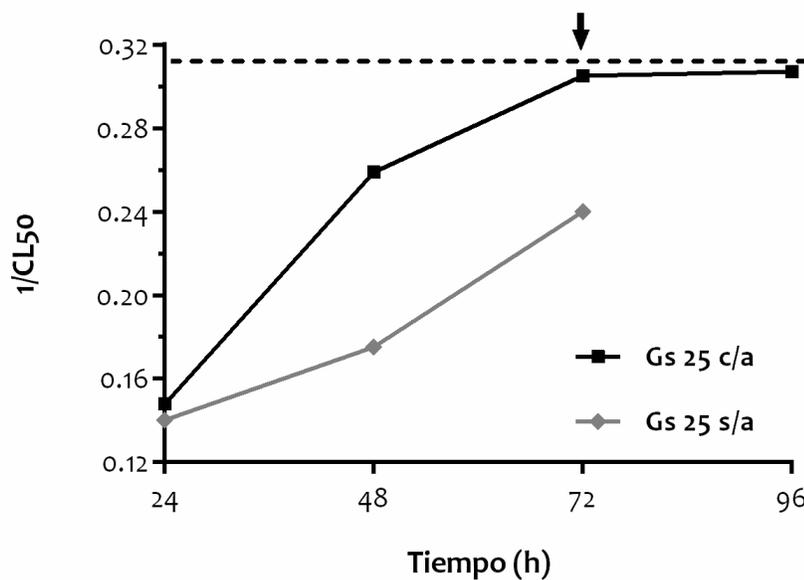


Figura 30. Curva de Incipienca ($1/CL_{50}$ vs. tiempo de exposición) para larvas Gs 25 expuestas a RU en condiciones de alimentación (F) y No-alimentación (NF). La flecha indica el valor de $1/CL_{50}$ incipiente.

	GLY				RU			
	Gs 25		Gs 36		Gs 25		Gs 36	
	GC	Tratamiento	GC	Tratamiento	GC	Tratamiento	GC	Tratamiento
Efectos letales								
Mortalidad	ND	ND	ND	ND	0,05	1,0 ^a	ND	0,80 ^a
Efectos subletales								
Actividad Natatoria	ND	0,10 ± 0,12	0,10 ± 0,19	0,20 ± 0,20	ND	0,31 ± 0,25 ^{bd}	0,08 ± 0,16	0,33 ± 0,11 [*]
Crecimiento (LHC)	5,69 ± 0,63	6,54 ± 0,86 [*]	13,15 ± 2,33	11,66 ± 3,24	4,21 ± 0,34	4,69 ± 0,33 [*]	13,56 ± 1,92	12,78 ± 0,30
Desarrollo (Gs)	27,53 ± 0,62	28,15 ± 0,67 [*]	36,13 ± 2,64	35,63 ± 3,96	25,95 ± 0,23	26,56 ± 0,51 [*]	36,40 ± 1,76	35,77 ± 1,64
Anormalidades								
Edemas	0,06 ± 0,12	0,10 ± 0,20	ND	0,69 ± 0,30 [*]	ND	0,68 ± 0,36 [*]	0,06 ± 0,11	0,27 ± 0,23
Disco oral	ND	0,52 ± 0,13 [*]	0,13 ± 0,11	0,53 ± 0,23 [*]	ND	ND	0,20 ± 0,20	0,67 ± 0,11 [*]

Tabla 12. Resumen de puntos finales evaluados en los dos estadios larvales de *L. latrans* expuestos a GLY y RU. Los datos de mortalidad expresados como la proporción de individuos muertos. Datos de actividad natatoria y anomalías expresados como la proporción de efectos ± DE. Los datos de crecimiento expresados como el promedio de la LHC (mm) ± DE. Los datos de desarrollo están presentados como el promedio del estadio de Gosner ± DE. ND: efectos no detectados. El asterisco (*) corresponde al valor promedio ± DE para la concentración LOEC. La (a) indica la proporción de renacuajos muertos a la concentración más elevada. Todos los datos corresponden a las 96 h de exposición excepto por la (b), que indica efectos a las 24 h de exposición. GC: grupo control.

Efectos subletales

Los resultados de los efectos subletales (actividad natatoria, crecimiento, desarrollo y la inducción de anomalías morfológicas) en larvas de *L. latrans* de estadio Gs25 y Gs36, expuestas a GLY y RU, se resumen en las Tablas 12 y 13. La actividad natatoria se vio afectada sólo por exposición a RU, mientras que los efectos en el crecimiento, desarrollo, y anomalías se observaron tanto por exposición a GLY como a RU. El test de *t* pareado entre los valores LOEC para efectos subletales en ambos compuestos mostro diferencias significativas ($t = 4,427$; $df = 2$; $p < 0,05$), indicando que el RU es claramente más tóxico que el GLY. Además, el test de *t* pareado entre los valores NOEC de efectos subletales para ambos estadios del desarrollo evaluados mostro diferencias significativas ($t = 5,529$; $df = 2$; $p < 0,05$), indicando que los renacuajos Gs25 fueron más sensibles que los Gs36 en todos los puntos finales evaluados (Tabla 12). Debido al bajo número de sobrevivientes, y a la imposibilidad de las larvas Gs25 de tolerar 96 h de exposición sin alimentación en los bioensayos del grupo s/a, los efectos subletales fueron observados sólo en los bioensayos del grupo c/a.

Efectos en la actividad natatoria

No se observaron efectos en la actividad natatoria en larvas de *L. latrans* expuestas a GLY en ninguno de los estadios del desarrollo evaluados en este capítulo (Tabla 12). Contrariamente, los resultados del ANOVA realizado con los datos de actividad natatoria, indicaron que el RU produjo nado irregular en larvas de *L. latrans* Gs25 a las 24 h de exposición ($F = 12,360$; $df = 5$; $p < 0,0001$) con un valor LOEC de 5,92 mg e.a./L (prueba *post-hoc* de Dunnet; $p < 0,01$), aunque no se observaron efectos significativos luego de las 24 h de exposición en larvas Gs25 ($F = 1,498$; $df = 4$; $p > 0,05$). Además, el nado irregular fue también observado en larvas Gs36 expuestas a RU con una CE_{50} (96 h) de 7,99 (7,63-31,07) mg e.a./L. Asimismo, los datos de actividad natatoria en larvas de estadio Gs36, mostraron diferencias significativas en la proporción de nado irregular ($F = 10,710$; $df = 6$; $p < 0,001$), con un valor LOEC de 5,18 mg e.a./L (prueba *post-hoc* de Dunnet; $p < 0,001$).

Efectos en el crecimiento y desarrollo

Exposiciones agudas

Los resultados muestran que las larvas de Gs25 resultaron con un incremento significativo en el crecimiento luego de una exposición aguda a GLY ($F = 3,050$; $df = 7$; $p < 0,01$), con un valor LOEC de 15 mg/L (prueba *post-hoc* de Dunnet; $p < 0,05$). Por otro lado, los renacuajos de Gs36 no mostraron efectos significativos en el crecimiento ($F = 0,678$, $df = 7$; $p > 0,05$) por exposición a GLY (Tablas 12 y 13). Del mismo modo, los resultados de los análisis realizados con larvas de Gs25 expuestas a RU, indicaron que el formulado produce un incremento significativo en el crecimiento ($F = 3,422$; $df = 14$; $p < 0,0001$) con un valor LOEC de 0,37 mg e.a./L (prueba *post-hoc* de Dunnet; $p < 0,01$; Tablas 12 y 13). Sin embargo, el mismo análisis realizado con larvas de Gs36, muestra que no existieron diferencias significativas entre los renacuajos expuestos a RU y el control ($F = 2,081$; $df = 7$; $p > 0,05$; Tablas 12 y 13).

Los resultados de los datos del desarrollo muestran que en larvas de Gs36, no existieron efectos significativos (Kruskal-Wallis; $H = 2,251$; $df = 7$; $p > 0,05$) por exposición a GLY, mientras que en larvas de Gs25 se observó un incremento significativo (Kruskal-Wallis; $H = 19,38$; $df = 7$; $p < 0,01$) respecto al grupo control, con un valor LOEC de 15 mg/L (prueba *post-hoc* de Dunn; $p < 0,05$; Tabla 13). Asimismo, las larvas de Gs36 expuestas a RU no evidenciaron efectos significativos en el desarrollo (Kruskal-Wallis; $H = 3,657$; $df = 6$; $p > 0,05$), mientras que los renacuajos de Gs25 manifestaron un incremento significativo en la tasa de desarrollo (Kruskal-Wallis; $H = 64,28$; $df = 14$; $p < 0,0001$), con un valor LOEC de 0,0007 mg e.a./L (prueba *post-hoc* de Dunn; $p < 0,05$; Tabla 13).

Efecto	Gs 25		Gs 36	
	RU	GLY	RU	GLY
Desarrollo	0,0007 ¹	15 ²	ND	ND
Crecimiento	0,37 ¹	15 ²	ND	ND
Anormalidades	2,96 ¹	30 ²	2,22 ¹	30 ²
Actividad Natatoria	ND	ND	5,18 ¹	ND

Tabla 13. Efectos subletales (valores LOEC en 1: mg e.a./L de RU y 2: mg/l de GLY) en larvas de *L. latrans* de dos estadios de Gosner, luego de 96 h de exposición. ND: efectos no detectados.

Exposición crónica

Los resultados de la exposición crónica en larvas de *L. latrans* Gs34 no mostraron diferencias significativas en el crecimiento entre los diferentes tratamientos al evaluar la LHC ($F = 0,876$; $df = 2$; $p > 0,05$; Figura 31 A), ni el peso del cuerpo ($F = 0,844$; $df = 2$; $p > 0,05$; Figura 31 B).

Los resultados de los datos del desarrollo en la exposición crónica no mostraron diferencias significativas ($H = 3,549$; $df = 2$; $p > 0,05$) respecto al grupo control (Figura 31 C).

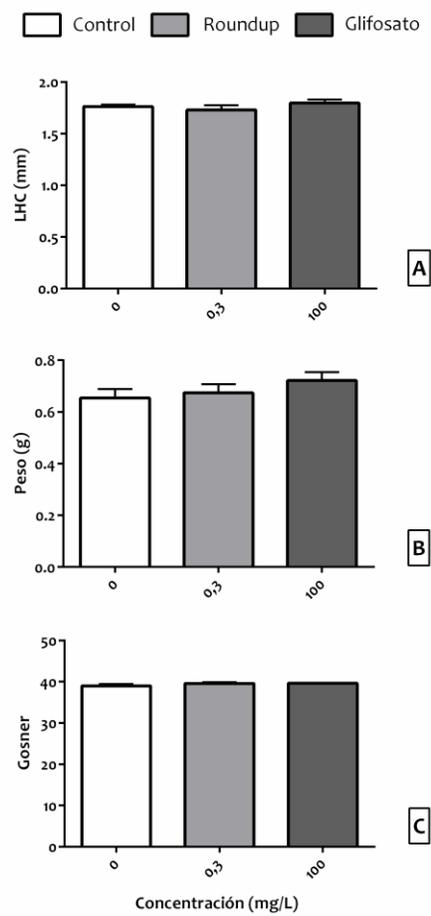


Figura 31. Crecimiento y desarrollo de larvas de *L. latrans*. Luego de una exposición crónica a GLY y RU. Concentración de RU expresada en mg e.a./L.

Anormalidades morfológicas

La proporción de anomalías observadas en el grupo de control en todos los bioensayos fue inferior al 10%, excepto para la pérdida de filas de dientes en larvas de Gs36, que se observaron en el 20% de los controles.

Los resultados indican que el GLY indujo la pérdida de la mandíbula superior y/o inferior en los renacuajos de *L. latrans* de Gs25 ($F = 3,801$; $df = 7$; $p < 0,01$) y Gs36 ($F = 8,062$; $df = 7$; $p < 0,001$), con el mismo valor de LOEC de 30 mg/L detectado para ambos estadios de Gosner (prueba *post-hoc* de Dunnet, $p < 0,01$ para Gs25 y $p < 0,05$ para Gs36, Tablas 12 y 13, Figura 32 a y b). Por otra parte, en los renacuajos de Gs36 se encontraron diferencias significativas en la incidencia de edemas ($F = 3,917$; $df = 7$; $p < 0,05$), a partir de los 300 mg/L de GLY (prueba *post-hoc* de Dunnet; $p < 0,01$, Tabla 12 y 13, Figura 32 g y h).

Los resultados de anomalías en larvas expuestas a RU revelaron diferencias significativas en la presencia de edemas en los renacuajos de Gs25 ($F = 7,957$; $df = 14$; $p < 0,0001$), con un valor LOEC de 2,96 mg e.a./L (prueba *post-hoc* de Dunnet; $p < 0,0001$; Tabla 12 y 13; Figura 32 g y h). Además, los datos de Gs36 mostraron diferencias significativas en la incidencia de anomalías en las crestas dentarias ($F = 9,12$; $df = 6$; $p < 0,001$; Tabla 12 y 13, Figura 32 c y d) y la pérdida de filas de dientes ($F = 3,965$; $df = 5$; $p < 0,05$; Tabla 12 y 13; Figura 32 e y f), con valores LOEC de 2,22 mg e.a./L para ambas anomalías (prueba *post-hoc* de Dunnet; $p < 0,05$ ambas).

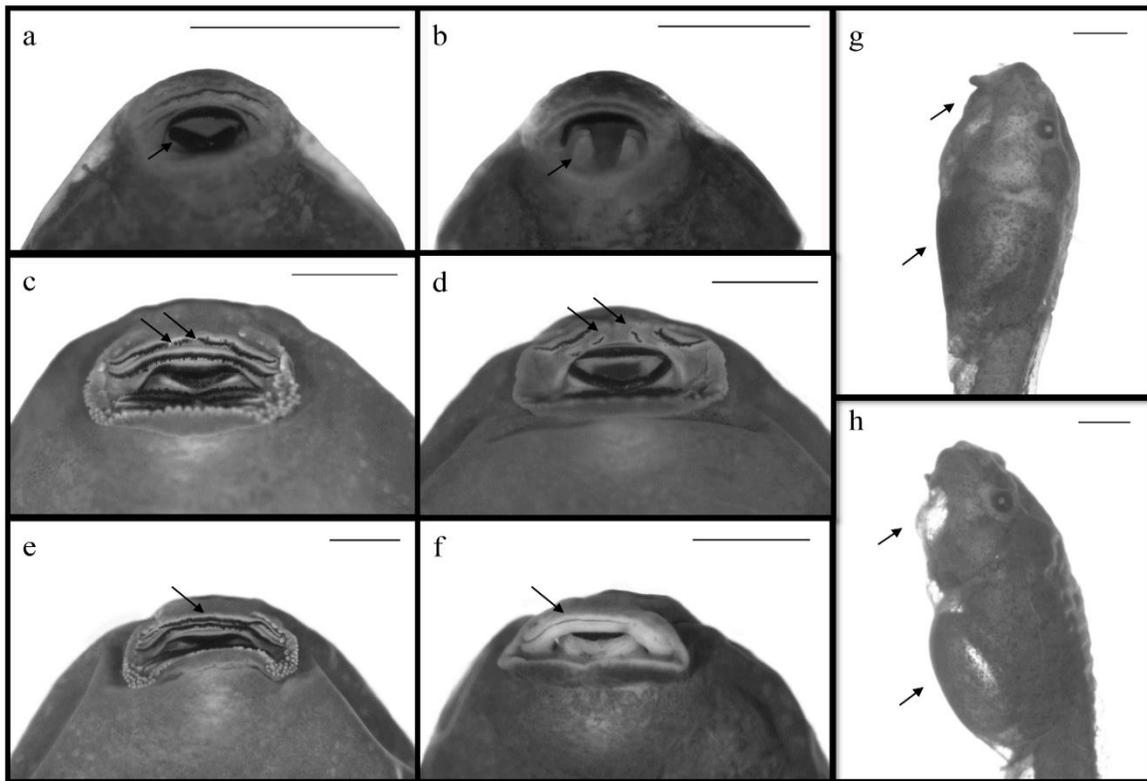


Figura 32. Anormalidades morfológicas inducidas por exposición a GLY y RU en larvas de *L. latrans* Gs25 y Gs36. a- disco oral de una larva Gs25 del grupo control; b- disco oral de una larva Gs25 expuesta a GLY mostrando la pérdida de la mandíbula inferior; c y e- disco oral de larvas de Gs36 del grupo control; d- disco oral de una larva Gs36 expuesta a RU ilustrando las anomalías de la cresta dentaria; f- disco oral de una larva Gs36 expuesta a RU que ejemplifica la pérdida de hileras de dientes; g- cuerpo de una larva Gs25 del grupo control; h- cuerpo de una larva Gs25 expuesta a RU con edema pronunciado. Las flechas negras señalan las anomalías. Escala corresponde a 1 mm.

Histología del hígado de *Leptodactylus latrans*

El hígado de los renacuajos de *L. latrans* de estadio Gs36 se caracterizó por presentar un parénquima formado por hepatocitos dispuestos en un cordón de una capa celular simple. Se observó un parénquima rodeado por sinusoides hepáticos, presentando eritrocitos y melanomacrófagos aislados, sin formar agrupaciones (o centros). Además, pudieron distinguirse vasos sanguíneos grandes a través del parénquima (Figura 33).

Efectos histopatológicos

El hígado de renacuajos expuestos a RU presentó un aumento significativo en el número de MMC/mm² ($F = 3,439$; $df: 4$; $p < 0,05$) en la concentración más baja de 0,37 mg e.a./L con respecto al grupo control ($p < 0,01$; Fig. 33). Del mismo modo, se observó un incremento significativo de MMC/mm² ($H = 10,60$; $df: 4$; $p < 0,05$) en las dos concentraciones más bajas de 0,37 mg e.a./L ($p < 0,05$; Figura 34) y 0,74 mg de e.a./L ($p < 0,05$; Figura 34). Además, las larvas expuestas a GLY también mostraron un incremento significativo en el número de MMC/mm² ($H = 12,39$; $df: 4$; $p < 0,05$) y de MMC/mm² ($H = 9,88$; $df: 4$; $p < 0,05$), en las concentraciones de 75 y 300 mg/L en el primer caso (prueba post hoc de Dunn, $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente, Figura 34 y 35 b); y en 300 mg/L en el segundo (prueba post hoc de Dunn, $p < 0,01$; Figura 34 y 35 b)

Los resultados del análisis histopatológicos revelaron que los renacuajos expuestos a ambos compuestos, RU y GLY, mostraron lesiones en el hígado (Figura 35 b-e). Como se dijera previamente, los puntos finales histopatológicos observados después de 96 h de exposición fueron infiltración, congestión y lipidosis (Figura 35 c-e, Tabla 12). Aunque se observó un aumento en la ocurrencia de puntos finales histopatológicos en las larvas expuestas a ambas formas del herbicida, hubo diferencias significativas en la ocurrencia de congestión ($F = 5,10$; $df: 4$; $p < 0,01$) y lipidosis ($F = 39,12$; $df: 4$; $p < 0,0001$) en las larvas expuestas a RU, mientras que no se observaron diferencias significativas en aquellas expuestas a GLY. La congestión y lipidosis resultaron significativamente mayores a partir de la concentración de 2,22 mg e.a./L ambas (prueba post-hoc de Dunnet, $p < 0,01$ y $p < 0,0001$, respectivamente).

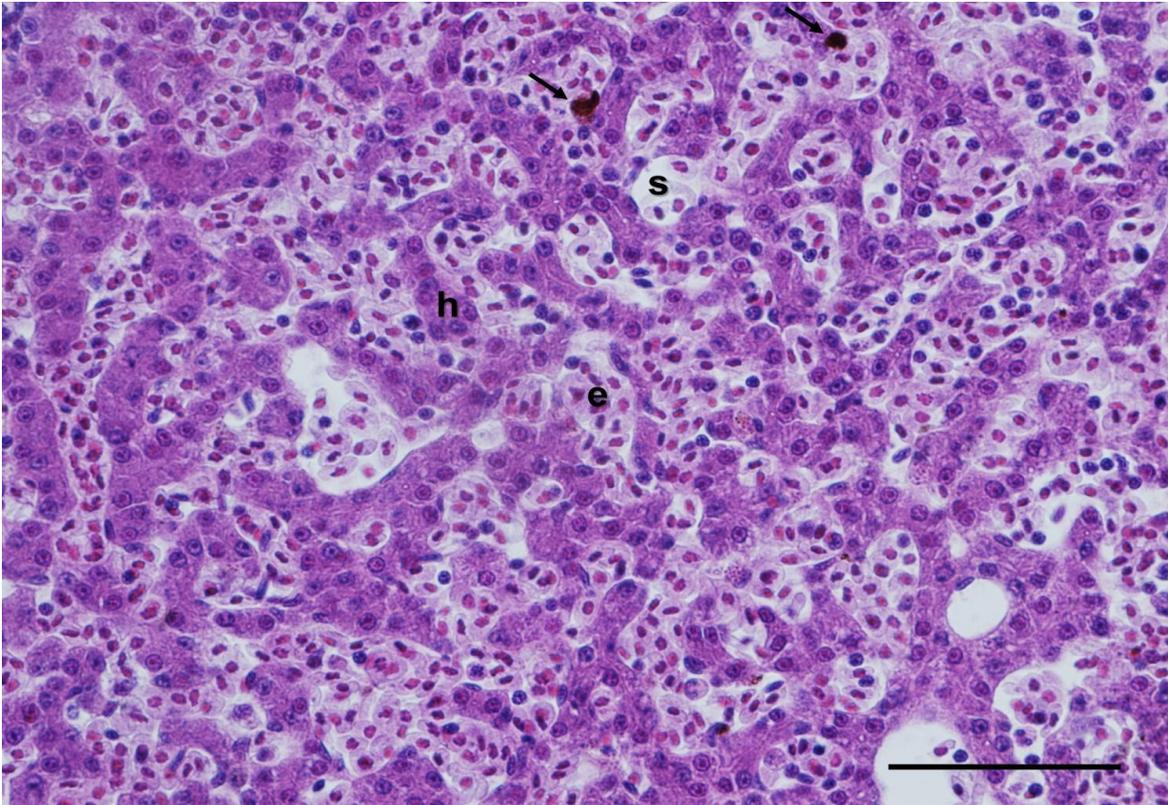


Figura 33. Histología del hígado de una larva Gs-36 de *L. latrans*. h: indica el parénquima hepático. S: indica los sinusoides hepáticos. e: indica la presencia de eritrocitos. Las flechas negras indican melanomacrófagos aislados. La escala representa 50µm.

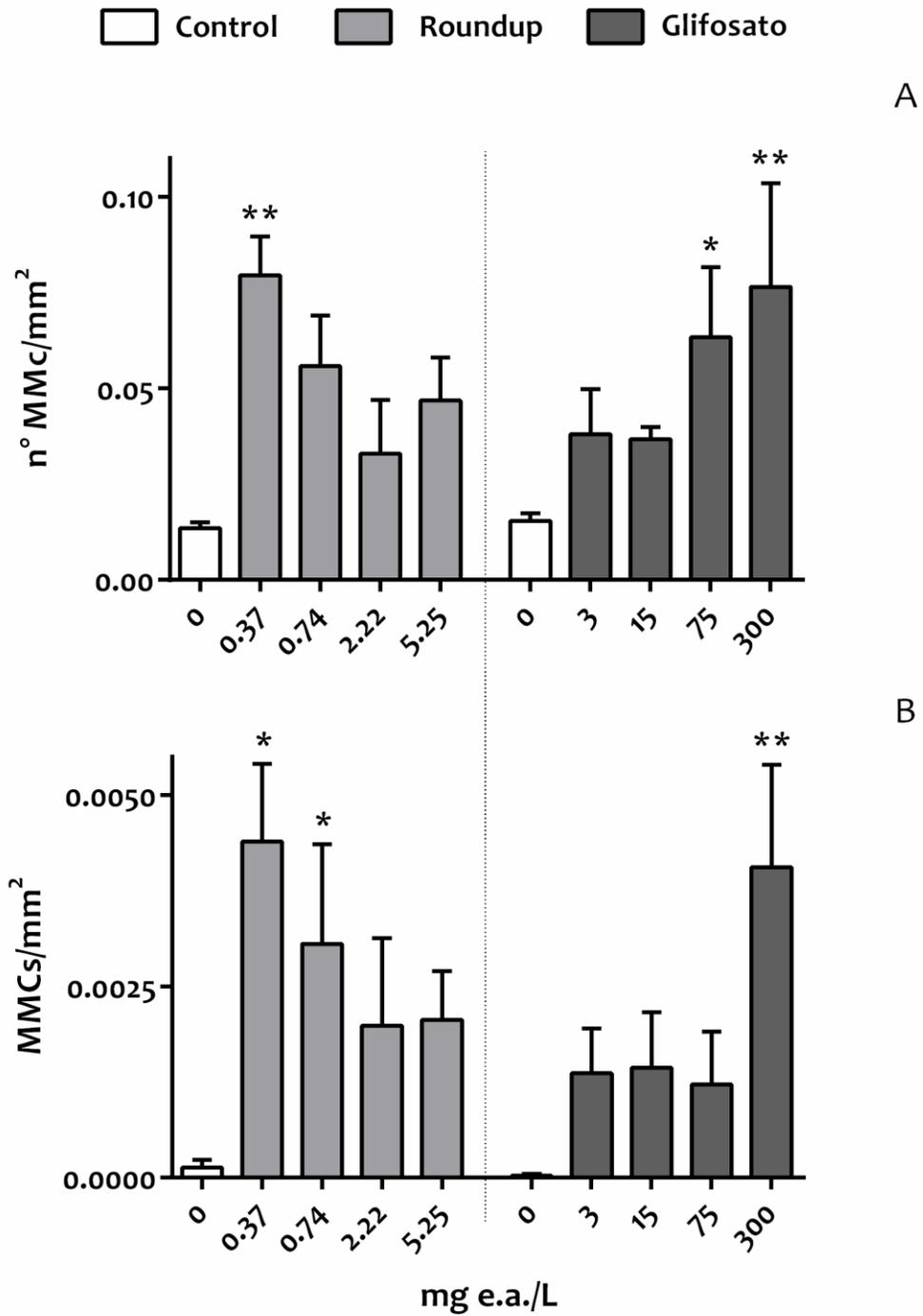


Figura 34. Efectos histológicos del hígado de larvas de *L. latrans* luego de la exposición a RU y GLY. A) Número de melanomacrófagos por mm². B) Número de centros melanomacrófagos por mm². Datos expresados como la media ± ES. (*): $p < 0,05$ y (**): $p < 0,01$; respecto al grupo control.

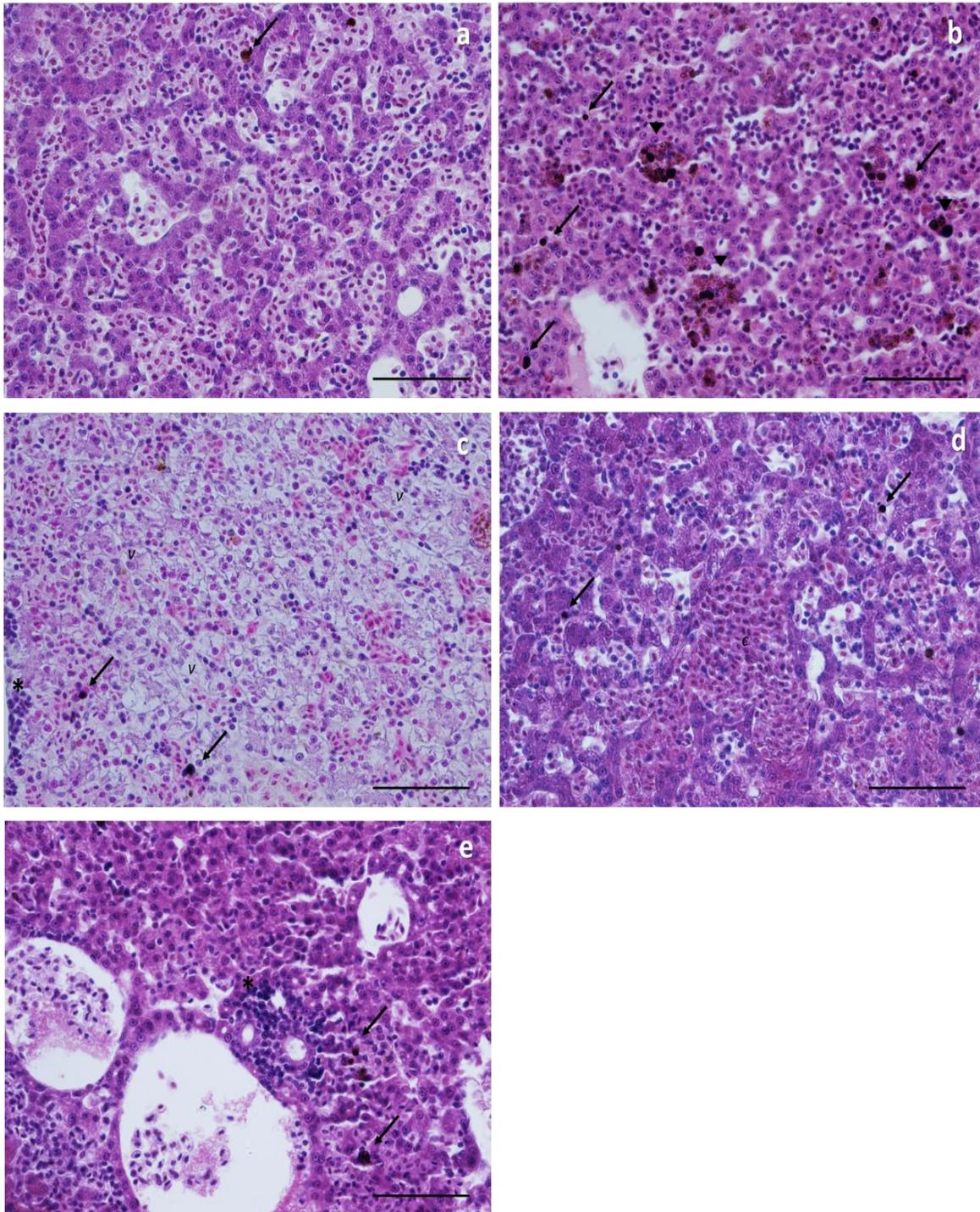


Figura 35. Efectos histopatológicos de GLY y RU sobre tejido hepático de larvas de *L. latrans*. A) grupo de control que muestra el aspecto normal del hígado con células melanomacróficas aisladas (flecha negra). B) hígado de un renacuajo expuesto a 300 mg / L de GLY mostrando un número incrementado de células melanomacróficas aisladas (flechas negras) y de centros melanomacróficos (puntas negras). C) hígado de un renacuajo expuesto a 75 mg / L de GLY mostrando lipodosis hepática (v), MMc aislado (flechas negras) e infiltración de células mononucleares (*). D) hígado de un renacuajo expuesto a 2,22 mg a.e./L de RU mostrando congestión (c) y MMc aislado (flechas negras). E) hígado de un renacuajo expuesto a 2,22 mg a.e./L de RU mostrando infiltración de células mononucleares (*) y MMc aisladas (flechas negras). La escala representa 50μm.

Efectos en la diferenciación sexual

El análisis histológico de la diferenciación sexual no mostró diferencias significativas en las proporciones sexuales observadas respecto a las esperadas en las larvas expuestas a GLY ($G = 0,33$; $df = 1$; $p = 0,56$; Figura 36) ni en las expuestas a RU ($G = 3,14$; $df = 1$; $p = 0,07$; Figura 36). Sin embargo, si bien no se detectaron diferencias significativas, la proporción de sexos observada en las larvas expuestas a RU, mostró una desviación en la proporción de sexos, observándose un 75% (9) de hembras y un 25% (3) de machos, respecto al grupo control, el cual contó con un 50% (6) de hembras y un 50% (6) de machos (Figura 36).

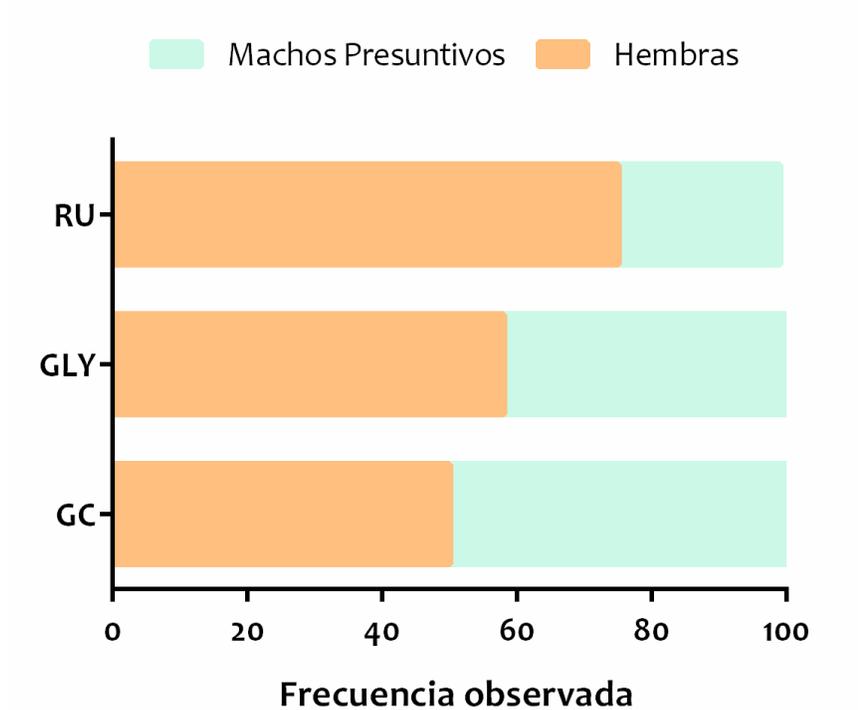


Figura 36. Proporción de sexos observada en larvas de *L. latrans* luego de un ensayo crónico. GLY: concentración de 100 mg/L. RU: concentración de 0,3 mg e.a./L.

Discusión

La formulación comercial Roundup Ultramax® indujo efectos agudos letales y subletales sobre los renacuajos de *L. latrans*. De acuerdo con las categorías establecidas por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, la formulación Roundup Ultramax® puede clasificarse como un agente ligeramente tóxico (clase III), mientras que el GLY puede clasificarse como un compuesto prácticamente no tóxico (clase IV).

El estadio de desarrollo más sensible fue el Gs25. La diferencia de sensibilidad entre ambos estadios (Gs25 y Gs36) concuerda con los hallazgos de estudios previos informando que los renacuajos de Gs25 son los más sensibles respecto a otros estadios del desarrollo (Mann y Bidwell 1999; Edginton 2004; Smith 2001; Howe y col. 2004; Brodeur y col. 2009). Esta diferencia puede atribuirse a: (1) la presencia de membranas protectoras en los embriones (Berril y col. 1998), (2) la falta de órganos diana en embriones y larvas muy jóvenes (Edginton y col. 2004) y (3) el tamaño mayor de los individuos en etapas avanzadas del desarrollo, que parece ser un factor mitigante de la toxicidad (Mann y Bidwell 1999). Sin embargo, otros estudios han demostrado que la relación entre desarrollo y sensibilidad no sigue un patrón claro (Howe y col. 1998, Natale y col. 2000). Esta falta de consenso puede estar relacionada con diferencias en los protocolos experimentales o en la biología de las diferentes especies de anuros involucradas.

Nuestros resultados indican que las larvas de *L. latrans* de Gs25 no superan las 72 h sin alimentación, demostrando que *L. latrans* requiere de suministro de alimento durante los bioensayos de toxicidad en los estadios tempranos del desarrollo, mientras que tal alimentación no es necesaria si los bioensayos son realizados con estadios avanzados. En ese sentido, si bien son pocos los trabajos existentes a la fecha, es llamativo que las investigaciones previas evaluando los efectos de contaminantes en larvas de *L. latrans* de Gs25 (Gosner 1960) fueron realizados con 12 (Araújo y col. 2014a, 2014b) y 48 h de exposición (Lajmanovich y col. 2015). Además, no se observaron diferencias en la toxicidad del GLY y RU entre ambos tipos de ensayos propuestos para Gs25 (c/a y s/a), lo que estaría indicando que la administración de alimento no influencia los efectos letales del glifosato en *L. latrans* bajo condiciones de exposición aguda. Debido a que las larvas de ciertas especies de anuros utilizadas para bioensayos de toxicidad, no pueden alcanzar las 96 h de exposición bajo las condiciones requeridas en los protocolos estandarizados (bioensayos sin alimentación), debido a la inanición (Mann y Bidwell 1999), los resultados

del presente capítulo pueden resultar relevantes a la hora de evaluar efectos tóxicos en especies con requerimientos de alimentación similares a *L. latrans*.

En estudios previos se ha demostrado que las larvas de anuros expuestas a GLY no muestran efectos letales, incluso a concentraciones elevadas (Bidwell y Gorrie 1995; Mann y Bidwell 1999; Giesy y col. 2000; Edginton y col. 2004; Howe y col. 2004; Puglis y Boone 2011; Moore y col. 2012). En este sentido, nuestros resultados soportan la ausencia de toxicidad en larvas de anuros expuestas a GLY hasta los 300 mg/L. En lo que respecta al formulado comercial, nuestros resultados coinciden con la información existente en la literatura para otras especies de anfibios, con valores de CL_{50} entre 0,8 y 24,78 mg e.a./L para diferentes formulaciones comerciales conteniendo glifosato (Mann y Bidwell 1999; Howe y col. 2004; Govindarajulu 2008; Bernal y col. 2009; Relyea y Jones 2009; Fuentes y col. 2011; Moore y col. 2012; Güngördü 2013; Yadav y col. 2013; Annett y col. 2014, Mikó y col. 2017; Bonfanti y col. 2017). Lajmanovich y col. (2011) reportaron que cuatro formulaciones comerciales de glifosato (Roundup Ultramax®, Infosato®, Glifoglex®, and C-KYuyos®) alcanzan la estabilización en las CL_{50} luego de 24 h de exposición en renacuajos de *Rhinella arenarum*. Nuestros resultados sugieren que la formulación RU induce un efecto letal durante los primeros días de exposición y alcanza el valor incipiente luego de 72 h en renacuajos de *L. latrans*.

De acuerdo a nuestro conocimiento, no existen trabajos previos que evalúen los efectos del GLY en la actividad natatoria de larvas de anuros. Nuestros resultados indican que no existen efectos en la actividad natatoria por exposición a GLY en larvas de *L. latrans* en ninguno de los estadios del desarrollo evaluados en este capítulo. Por otro lado, los efectos en la actividad natatoria por exposición a formulaciones comerciales de glifosato se han evaluado en renacuajos de ciertas especies de anuros. Por ejemplo, Wood y Welch (2015) reportaron que Roundup Weed y Grass Killer Super Concentrate® no afectan el comportamiento (actividad) de las larvas de *Anaxyrus terrestris*, mientras que Wojtaszek y col. (2004) observaron parálisis e imposibilidad de escape durante las primeras 24 h de exposición al formulado Vision® en larvas de *Lithobates pipiens* y *Lithobates clamitans* de estadio Gs25. Nuestros resultados indican que el RU produce alteraciones en la actividad natatoria en larvas de *L. latrans* en ambos estadios del desarrollo (Gs25 y Gs36), observándose en ambos casos nado irregular. Esta información puede resultar de interés al considerar los posibles efectos en el ambiente natural, ya que la natación está estrechamente relacionada con la capacidad de alimentarse, por lo que una alteración en

la actividad natatoria, puede resultar en una disminución en la alimentación, y como consecuencia, en la nutrición, desarrollo y crecimiento (Semlitsch 1993; Horat and Semlitsch 1994; Semlitsch y col. 1995; Rist 1997; Broomhall y Shine 2003; Denöel y col. 2013), lo que podría tener un impacto en la aptitud física en la vida de las ranas adultas (Berven and Gill 1983; Smith 1987). Asimismo, una reducción en la actividad natatoria puede también conducir a la incapacidad de escaparse de los predadores, resultando en un riesgo para la supervivencia de las larvas (Jung y Jagoe 1995, Feder 1983; Stauffer y Semlitsch 1993; Broomhall y Shine 2003).

En lo que respecta a los efectos del GLY en el crecimiento, pudimos observar un incremento significativo en las larvas de Gs25 debido a la exposición a GLY, mientras que no se observaron efectos en las larvas de Gs36 en ensayos agudos, ni en larvas Gs34 en ensayos de tipo crónico. Estudios previos (Howe y col. 2004) encontraron que el GLY no afecta el crecimiento de las larvas de Gs25, mientras que otros (Lanctôt y col. 2014) afirman que el GLY causa inhibición del crecimiento en renacuajos Gs25 al alcanzar los Gs 36-38. Asimismo, los resultados de nuestros análisis realizados con larvas de Gs25 expuestas a RU, indican un incremento significativo en el crecimiento. Estos resultados concuerdan con observaciones previas que revelan un incremento significativo en el crecimiento de larvas de anuros expuestas a formulaciones de glifosato (ej., para LHC: Wojtaszek y col. 2004; peso: Jones y col. 2011; Gahl y col. 2011; para LHC y peso: Navarro-Martín y col. 2014). Sin embargo, otros estudios indican que las formulaciones de glifosato no inducen efectos significativos en el crecimiento de larvas de los anuros (ej., para LHC: Edginton y col. 2004; Edge y col. 2012; el peso: Smith 2001; Williams y Semlitsch 2010), lo que correspondería con nuestras observaciones realizadas en larvas de Gs34 y Gs36 expuestas a RU; mientras que otros estudios incluso reportaron una inhibición en el crecimiento de larvas de anuros por exposición a formulaciones comerciales de glifosato (ej., para la LHC: Howe y col. 2004; para el peso: Relyea 2004, 2012; Cauble y Wagner 2005; Jones y col. 2010; para la LHC y el peso: Lanctôt y col. 2014). Como se puede observar, no existe consenso respecto a la información existente sobre los efectos de las formulaciones de glifosato en el crecimiento de las larvas de anuros, como así tampoco para los efectos del GLY. Estas discrepancias podrían ser el resultado de diferencias en la biología de las diferentes especies, o incluso diferencias entre las distintas formulaciones de glifosato.

Estudios previos evaluando los efectos del GLY en el desarrollo de larvas de anuros, han demostrado que este compuesto (como sal de isopropilamina) no induce efectos significativos en el desarrollo de las larvas (ej., respecto al tiempo a la metamorfosis: Howe y col. 2004; Lanctôt y col. 2014). Nuestros resultados no concuerdan con los resultados observados en las investigaciones previas, ya que en larvas expuestas en el mismo estadio (Gs25) se observó un incremento significativo en el desarrollo, mientras que en larvas de estadios mayores (Gs36 y Gs34) no se observaron efectos significativos, ya sea mediante exposiciones agudas como crónicas. Recientemente, algunos autores evaluaron los efectos de las formulaciones comerciales de glifosato sobre el desarrollo de larvas de anuros. El efecto observado con mayor frecuencia fue la reducción en la tasa de metamorfosis (finalización tardía de la metamorfosis: Howe y col. 2004; Williams y Semlitsch 2010; Gahl y col. 2011; Navarro-Martín y col. 2014), aunque la ausencia de efecto también ha sido observada (Smith 2001; Lanctôt y col. 2014; Wood y Welch 2015). Además, Cauble y Wagner (2005) observaron que los renacuajos expuestos a formulaciones comerciales de GLY se desarrollan más rápido que los controles. Nuestros datos mostraron que las larvas de Gs25 manifiestan un incremento significativo en la tasa de metamorfosis, apoyando las observaciones de Cauble y Wagner (2005), mientras que las larvas de Gs34 y Gs36 no mostraron efectos significativos luego de exposiciones crónicas y agudas a RU.

Al analizar los puntos finales evaluados, podemos ver que tanto el crecimiento como el desarrollo se encuentran directamente relacionados. El crecimiento larval está determinado por tres características principales: un período inicial de crecimiento casi exponencial, una desaceleración y finalmente una pérdida de tamaño corporal en el clímax metamórfico (Wilbur y Collins 1973). El desarrollo consiste tanto en el crecimiento como en la diferenciación, y esta relación varía según las condiciones ambientales (Wilbur y Collins 1973). Por ejemplo, se conoce que las larvas de anfibios pueden alcanzar la metamorfosis más temprano y a menor tamaño, como respuesta a condiciones de estrés (Wilbur y Collins 1973; Smith-Gill y Berven 1979; Morey y Reznick 2000; Denver y Crespi, 2006). Además, una larva debe alcanzar un tamaño corporal mínimo o umbral para sufrir la metamorfosis, mientras que por otro lado, existe un tamaño corporal máximo al cual todas las larvas necesariamente alcanzaran la metamorfosis (Wilbur y Collins 1973; Collins y Lewis 1979; Morey y Reznick 2000). En los experimentos llevados a cabo en esta tesis, se observó que la exposición a GLY y RU en estadios iniciales del desarrollo inducen un efecto de estimulación en el crecimiento y el desarrollo. En este sentido, nuestros resultados podrían estar indicando que el GLY puede considerarse un agente de estrés

para los renacuajos, causando un desarrollo acelerado y alcanzando la metamorfosis a una edad precoz. En este contexto, la ausencia de un efecto en los individuos de Gs36 en comparación a la aceleración del desarrollo observado en las larvas de Gs 25 podría explicarse como una adaptación que busca alcanzar el tamaño corporal mínimo requerido para lograr la metamorfosis. En este sentido sería interesante realizar nuevos experimentos con el objeto de medir cortisol en el cuerpo de los individuos expuestos.

Sobre la incidencia de anomalías morfológicas por exposición a GLY, se conocen estudios previos evaluando anomalías gonadales y daños en la cola en larvas de anuros expuestas a GLY, que indicaron que el compuesto no induce anomalías (Howe y col. 2004; Lanctôt y col. 2014), mientras que otro informe (Paganelli y col. 2010) indicó que los embriones expuestos a GLY presentan anomalías craneofaciales y oculares. Nuestros resultados indicaron que el GLY induce la pérdida de la mandíbula superior y/o inferior en los renacuajos de *L. latrans* de Gs25 y Gs36, así como una elevada frecuencia en la incidencia de edemas en Gs36. Respecto a la exposición a formulaciones comerciales de glifosato, se conoce que las mismas incrementan la ocurrencia de alteraciones morfológicas en anfibios. En general, se pueden observar anomalías orales, craneofaciales y oculares, colas flexionadas y reducción del cartílago branquial en larvas y embriones de anuros (larvas: Lajmanovich y col. 2003; embriones: Edginton y col. 2004, Paganelli y col. 2010). Además, se registraron anomalías intestinales en embriones y larvas de anuros (embriones: Edginton y col. 2004; larvas: Lenkowski y col. 2010), daños en la cola, y la presencia de gónadas intersexuales en renacuajos (Howe y col. 2004). No obstante, otros estudios no han detectado la presencia de alteraciones gonadales o morfológicas en larvas (Edginton y col. 2004, Lanctôt y col. 2014; Navarra-Martín y col. 2014). Nuestros resultados revelaron diferencias significativas en la presencia de edemas en los renacuajos de Gs25 expuestos a RU. Además, los datos de Gs36 mostraron diferencias significativas en la incidencia de anomalías en las crestas dentarias y la pérdida de filas de dientes.

La presencia de edemas resulta en un desplazamiento del centro de gravedad y una torsión del eje del cuerpo que también puede manifestarse como una anomalía en la natación (Uthpala y col. 2010). Esta patología podría conducir a la dificultad para escapar de los predadores o a una imposibilidad en la búsqueda de alimento, afectando así la supervivencia de los renacuajos en los agroecosistemas. El disco oral de los renacuajos, en casi todas las familias, está compuesto por estructuras orales queratinizadas

(mandíbulas y filas de dientes) que están rodeadas por estructuras orales blandas (labios y papilas). *Leptodactylus latrans* tiene la configuración más común de filas dentarias correspondientes a la fórmula 2/3 (Ceï 1980, Mc Diarmig y Altig 2000, Altig 2007). Durante la alimentación, las hileras de dientes funcionan anclando la boca al sustrato, y las mandíbulas, raspando las superficies para generar una suspensión de alimento particulado (Wassersug y Yamashita 2001). Por lo tanto, la presencia de anormalidades orales (particularmente en las mandíbulas, las crestas dentarias y las filas de dientes) puede definitivamente afectar la capacidad de alimentación de los renacuajos limitando el tipo y la cantidad de alimento que puede ser consumido. En consecuencia, estos individuos estarán gastando más recursos energéticos en la mera adquisición de alimentos, afectando así su crecimiento y desarrollo. Tales alteraciones morfológicas en los renacuajos tienen impactos bien establecidos en la aptitud de las ranas adultas que afectan en última instancia a su supervivencia (Rowe y col. 1996; Rowe y col. 2001; Venesky y col. 2010a y b; Venesky y col. 2013; Tolledo y col. 2014; Babini y col. 2015).

La organización del hígado de los renacuajos de *L. latrans* resultó similar a la descrita para otras especies de anuros, con hepatocitos formando un doble cordón, rodeados de sinusoides con eritrocitos; vasos sanguíneos grandes y melanomacrófagos aislados (Honrubia y col. 1993, McDiarmid y Altig, 1999, Franco-Belussi et al., 2012).

Estudios previos (Pérez-Iglesias et al., 2016) que evaluaron los efectos de GLY en *L. latinasus*, revelaron que el herbicida en su forma pura aumentó el área pigmentada, correspondiente a melanomacrófagos, en el hígado de ranas adultas. Nuestros resultados indican que no sólo GLY, sino también la formulación comercial RU, induce un incremento en el número de MMc y MMCs en el hígado de renacuajos de *L. latrans* de Gs36. Por lo tanto, esta actividad protectora de los melanomacrófagos actuaría no solo en individuos adultos, sino también en las larvas. Existen escasas evidencias de los efectos de los pesticidas en los melanomacrófagos hepáticos de las larvas y adultos de anuros. De Oliveira y col. (2016) encontraron efectos similares en larvas de anuros mediante la exposición de los renacuajos de *Lithobates catesbeianus* al herbicida Clomazone. Además, Cakici (2015) encontró un incremento en el número de MMc después de la exposición de individuos adultos de *Bufo viridis* al insecticida carbaryl y Paunescu y col. (2010) encontraron resultados similares después de la exposición de individuos adultos de *Rana (Pelophylax) ridibunda* a clorpirifos. Otros estudios revelaron que los xenobióticos, como los metales pesados (*Rana ridibunda*, Loumbourdis y Vogiatzi 2002) y los medicamentos

encontrados en el medio ambiente, como el Flutamide, un medicamento anti-androgénico (*Rhinella schneideri*, De Gregorio y col. 2016), o 17 β -estradiol y cipionato de testosterona (*Eupemphix nattereri*, Zieri y col., 2015), inducen los mismos efectos sobre la proporción de melanomacrófagos hepáticos en anuros adultos, como los producidos por agroquímicos. El aumento en el número de MMc y MMCs puede explicarse por su papel en los procesos de detoxificación de los xenobióticos y su relación con la respuesta inmune debido a su actividad fagocítica (Wolke 1992, Loumbourdis y Vogiatzis 2002, Sichel y col. 2002 Fenoglio y col. 2005). En este sentido, los antecedentes indican que el incremento de MMc y MMCs es una respuesta generalista y protectora del hígado que se produce por la exposición subletal a xenobióticos tanto en anuros adultos como en larvas. Por esta razón, algunos autores lo han propuesto como biomarcadores citológicos (de Oliveira y col. 2016, Pérez-Iglesias y col. 2016). Además, los datos presentes mostraron que los efectos de RU sobre MMc y MMC se observaron solo en las concentraciones más bajas probadas, mientras que lo contrario ocurrió con el GLY, donde se observó un aumento de MMc y MMC a altas concentraciones. Estos resultados muestran una diferencia en la toxicidad de dos órdenes de magnitud entre ambas formas del herbicida (RU y GLY), al comparar las concentraciones más bajas que indujeron un aumento en MMc (0,37 mg e.a./L de RU y 75 mg/L de GLY). Las diferencias en la toxicidad podrían explicarse por la acción de los adyuvantes en la formulación, ya sea porque son tóxicos o porque facilitan la penetración del glifosato en el organismo (Giesy y col. 2000; Howe y col. 2004; Edginton y col. 2004; Moore y col. 2012; Annet 2014; Bonfanti y col. 2018).

En ese sentido, observamos que el aumento en MMc y MMC debido a la exposición al Roundup fue sólo significativo a bajas concentraciones. Este hecho podría deberse a una respuesta no monotónica basada en un mecanismo de detoxificación del propio organismo, en el que un cierto grado de exposición tóxica desencadena respuestas fisiológicas que no son inducidas a una mayor exposición tóxica (Calabrese 2008; Vandenberg et al., 2012). Es importante señalar que los MMC respondieron a concentraciones más bajas de RU (0,37 y 0,74 mg e.a./L), mientras que otros efectos, que implicaban daño hepático, como lipidosis y congestión, se observaron a una concentración mayor (2,22 mg e.a./L), lo que indicaría que el RU induce otros tipos de respuestas en estas concentraciones. Estos resultados concuerdan con las observaciones acerca de los efectos dosis-respuesta no monotónicos sobre melanomacrófagos de *Rhinella schneideri* expuestos a flutamida (De Gregorio y col. 2016), y con las observaciones de lesiones hepáticas en el hígado por exposición a elevadas concentraciones de glifosato en ejemplares de *L. latinasus*, y una

actividad fagocítica predominante de MMC en las bajas concentraciones (Pérez Iglesias et al., 2016).

Por otro lado, también hemos encontrado que el GLY y RU producen lesiones histológicas, como congestión, infiltración y lipidosis, en el hígado de las larvas de *L. latrans* de Gs36. Perez-Iglesias y col. (2016) también observaron este tipo de lesiones hepáticas después de la exposición a GLY en individuos adultos de *L. latinasus*, quienes observaron que el GLY induce un incremento de la proporción de individuos con congestión hepática y vacuolización del citoplasma de los hepatocitos (lipidosis). Nuestro estudio revela que tanto GLY como RU inducen el mismo tipo de lesiones hepáticas en larvas de *L. latrans*, pero sólo aquellas expuestas a RU mostraron diferencias significativas con respecto al control. Esta diferencia en la toxicidad entre ambos compuestos se ha visto previamente, y los autores la atribuyen a los adyuvantes en la formulación que favorecen la biodisponibilidad del ingrediente activo, o bien a aditivos que contribuyen a la toxicidad (Giesy y col. 2000, Moore y col. 2012). Además, de Oliveira y col. (2016) encontraron que el herbicida clomazone induce lipidosis hepática en los renacuajos de *L. catesbeianus*. También se ha demostrado que los insecticidas producen tales efectos en anuros adultos; por ejemplo, Paunescu y col. (2010) reportaron la presencia de cariomegalia, poliploidia, infiltración y fibrosis en el hígado de *Pelophylax ridibundus* después de la exposición al insecticida Reldan 40EC. Paunescu y col. (2012) estudiaron las histopatologías hepáticas causadas por el insecticida Talstar 10EC en *Pelophylax ridibundus*, y encontraron vacuolización de hepatocitos, picnosis nuclear, fibrosis perisinusoidal y periportal, dilatación de sinusoides y presencia de infiltrados celulares. Cakici (2015) encontró vacuolización en hepatocitos, necrosis, infiltración, aumento de sinusoides, hemorragia y congestión en el hígado de ejemplares adultos de *Bufo viridis* expuestos a carbaryl. Además, Bernabó y col. 2014 encontraron vacuolización hepática después de la exposición del tritón italiano (*Lissotriton italicus*) al nonilfenol, un tensioactivo que podría ser usado en combinación con pesticidas en formulaciones comerciales.

Las patologías hepáticas observadas después de la exposición a RU y GLY, indican que el herbicida produce lesiones hepáticas en larvas de anuros. La infiltración de las células mononucleares está relacionada con los procesos inflamatorios y el sistema inmunológico, y también con el aumento y la función de los melanomacrófagos (Crawshaw y Weinkle 2000; Howerth 1984; Silva y col. 2013). La lipidosis, donde el citoplasma de los hepatocitos está cubierto de vacuolas lipídicas, podría explicarse por la alteración de la oxidación

lipídica, o también por un daño en el retículo endoplasmático rugoso, que induce la reducción de la síntesis proteica, resultando en acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (Greenfield y col. 2008, Bernabò y col. 2014). Finalmente, la congestión o hipervascularización es un aumento en la vascularización del hígado que podría estar relacionado con el aumento de melanomacrófagos y la infiltración de células mononucleares.

Por último, los resultados de las relaciones de sexos mostraron un incremento en la frecuencia observada de hembras (75%) en las larvas Gs34 expuestas a RU respecto al grupo control (50%). Si bien estos valores no arrojaron diferencias significativas en el test estadístico empleado, esta tendencia podría definirse aumentando el número de individuos muestreados por tratamiento. Estos resultados concuerdan con las observaciones de Howe y col. (2004), que observaron una desviación en la relación de sexos en renacuajos de *Lithobates pipiens* expuestos a Roundup, observándose una tendencia a la feminización con valores cercanos al 80% de hembras, así como presencia de animales intersexo. En este sentido se continuará trabajando bajo la hipótesis que RU tiene efectos feminizantes en nuestra especie modelo. Por otro lado, las larvas expuestas a GLY no mostraron diferencias significativas que sugieran un efecto sobre la feminización de las gónadas. En este sentido, Howe y col. (2004), tampoco encontraron diferencias significativas en la relación de sexos en renacuajos de *Lithobates pipiens* expuestos a GLY. Sin embargo, Lanctot y col. (2014), observaron un incremento significativo en la proporción de hembras en larvas de *Lithobates sylvaticus* expuestas a GLY respecto al control, tendencia que también fue observada por exposición al formulado Vision®, aunque sin arrojar diferencias significativas. En este sentido, Gasnier y col. (2009) encontraron efectos de perturbación endocrina, observando una interrupción en la actividad de la aromatasa y la transcripción en células hepáticas de seres humanos a partir de exposiciones *in vitro* a distintas formulaciones de glifosato. No obstante, estos efectos no fueron observados en el tratamiento con GLY. En este sentido, resultados similares de exposiciones *in vitro* en ratones y seres humanos demostraron que las formulaciones de glifosato inducen alteraciones en la actividad aromatasa del citocromo P450 en tejido no ovárico, en mayor proporción que el ingrediente activo (Walsh et al. 2000; Richard et al. 2005). De esta forma, el formulado comercial produciría un mayor efecto que el ingrediente activo, como ya se observó para otros efectos subletales e incluso para efectos letales. Probablemente, esto estaría indicando un efecto de interacción entre el coadyuvante y el GLY que favorecería la penetración del ingrediente activo (Richard et

al. 2005). Las herramientas generadas durante el desarrollo de esta tesis van a permitir en un futuro evaluar el comportamiento de genes relacionados con el proceso de diferenciación gonadal en animales expuestos tanto a GLY como RU. Probablemente, el comportamiento de estos genes pueda servir, debido a su sensibilidad, como herramienta de alerta temprana.

En resumen, la utilización de *L. latrans* en experimentos ecotoxicológicos permitió la detección de efectos adversos inducidos por la exposición a una formulación de glifosato (RU) y al ingrediente activo del herbicida (GLY). Los efectos letales y subletales fueron reproducibles bajo condiciones estandarizadas de laboratorio, señalando el uso de esta especie como un posible sustituto en los bioensayos de toxicidad para estudios ecotoxicológicos, en regiones donde la rana habita, especialmente en aquellos agroecosistemas afectados por el uso de plaguicidas en la agricultura extensiva, donde *L. latrans* se desarrolla y reproduce continuamente. Además, y con respecto a la metodología de los bioensayos, el presente estudio muestra por primera vez que el suministro de alimento en etapas tempranas del desarrollo de *L. latrans* no influye en los efectos letales del GLY en condiciones de exposición aguda.

El GLY de grado técnico produjo efectos subletales sobre el crecimiento y el desarrollo de las larvas de *L. latrans*, así como anomalías morfológicas, tales como anomalías orales y edemas. Esta investigación constituye el primer reporte documentando anomalías en el disco oral de larvas de anuros por exposición a GLY de grado técnico. Además, la formulación comercial (RU) indujo efectos subletales en todos los puntos finales agudos evaluados en larvas de Gs25 (actividad natatoria, crecimiento, desarrollo y anomalías morfológicas). Aunque el crecimiento y el desarrollo resultaron ser los puntos finales más sensibles, todos ellos podrían afectar el bienestar y la supervivencia de las ranas en los agroecosistemas, ya que la presencia, por ejemplo, de edemas puede conducir a dificultades en la natación. Además, la aparición de anomalías orales y alteraciones en la actividad natatoria tendrían efectos directos en la alimentación con consecuencias perjudiciales sobre el crecimiento y el desarrollo.

Respecto a los efectos subletales agudos, ambas formas del herbicida indujeron efectos subletales similares, aunque a diferentes concentraciones, siendo RU cinco órdenes de magnitud más tóxico que el GLY. Esta diferencia sugiere que los adyuvantes en la formulación pueden favorecer la biodisponibilidad del ingrediente activo, o bien, consistir

en aditivos que contribuyen a la toxicidad, como algunos autores han sugerido (Giesy y col. 2000, Edginton y col. 2004; Howe y col. 2004; Puglis y Boone 2011; Moore y col. 2012).

Sobre la base de las concentraciones ambientales de GLY reportadas para Argentina y considerando el peor escenario que se ha detectado de 0,7 mg e.a./L (nivel en el que se observaron efectos subletales sobre el crecimiento y desarrollo y la inducción de anormalidades morfológicas en el presente trabajo), podemos concluir que sería esperable encontrar estos efectos adversos afectando el bienestar de las larvas de anuros que habitan en los agroecosistemas de nuestro país, al igual que tales secuelas en otras partes del mundo de acuerdo con los niveles presentes del compuesto en el ambiente.

Además, este estudio representa la primera evidencia de los efectos negativos del GLY y del RU en el hígado de larvas de anuros en concentraciones ambientalmente relevantes. Contribuyendo además a la comprensión de la fisiología toxicológica de GLY y RU, y demostrando que, a pesar de que los efectos letales indican una ausencia de toxicidad del glifosato con respecto a las formulaciones comerciales, los efectos subletales indican similitudes en las respuestas producidas, reduciendo por lo tanto la brecha de toxicidad entre los dos compuestos.

Si bien los efectos del glifosato como ingrediente activo y el formulado RU sobre la diferenciación sexual de *L. latrans* no arrojaron diferencias significativas, pudo observarse una clara tendencia a la feminización en el tratamiento con RU, el cual podría resultar significativo al aumentar el número de individuos muestreados por tratamiento. No obstante, esta tendencia no se fue tan clara en el tratamiento con GLY por lo cual seguimos apoyando la hipótesis del efecto perjudicial de los coadyuvantes. De todos modos, estos resultados deberían poner en alerta sobre los posibles efectos del glifosato como perturbador endocrino teniendo en cuenta los efectos subletales encontrados en el crecimiento, desarrollo y proporción de sexos en concentraciones ambientalmente relevantes.

Finalmente, quisiéramos enfatizar la importancia de utilizar especies nativas, como *L. latrans*, para evaluar problemas locales y regionales.

Conclusiones finales

El objetivo general de esta Tesis fue estudiar el efecto del glifosato sobre la diferenciación gonadal de anfibios y en particular de *Leptodactylus latrans* (como especie representativa de los anuros autóctonos que habitan en agroecosistemas de la Región Pampeana). Se evaluaron parámetros morfológicos, histológicos, bioquímicos y moleculares. En ese sentido, y debido a que existían aspectos de la biología de la especie que permanecían desconocidos y eran necesarios para alcanzar el objetivo planteado, se formularon objetivos específicos vinculados a estos aspectos, los cuales fueron desarrollados en la primer etapa de esta Tesis, que abarca a los Capítulos I y II.

En el Capítulo I se generó información relevante para la reproducción de la especie en cautiverio a partir de monitoreos de campo y de la puesta a punto de la inducción hormonal de la reproducción. Pudieron determinarse aquellas las variables e índices morfométricos, a partir de caracteres externos, que permitieron inferir de manera no invasiva el estado reproductivo de hembras de *L. latrans*. Además, los monitoreos de campo permitieron determinar y actualizar algunas condiciones propias del micro-hábitat de desove y parámetros de los nidos de espuma que resultaron de utilidad para poner a punto el método de inducción de la reproducción AMPHIPLEX para la especie. De este modo, en el desarrollo de este Capítulo se alcanzaron los siguientes conocimientos:

- ✓ El ICR (Culley y col. 1982) es el índice externo que permitió distinguir de manera más precisa entre hembras reproductivas y no-reproductivas en *L. latrans*, obteniéndose un valor promedio para las hembras en condición reproductiva de ICR = 2,53.
- ✓ Las variables morfométricas e índices seleccionados, no permitieron diferenciar machos en diferente condición reproductiva, por lo que se concluye que los caracteres sexuales secundarios estacionales son el mejor indicativo de condición reproductiva en los machos de *L. latrans*.
- ✓ *L. latrans* deposita los nidos de espuma adheridos a la vegetación, en cuerpos de agua, a una profundidad promedio de 10,24 cm, y a una temperatura promedio del agua de 25,61 °C. Esta información resultó especialmente útil a la hora de acondicionar los tanques de reproducción para los experimentos de inducción hormonal.
- ✓ El número de huevos promedio por nido de espuma, en condiciones naturales, fue de 23.236 huevos, cifra que resulta de importancia a la hora de planificar un método de cría y reproducción en cautiverio.

- ✓ Se pudo observar que *L. latrans* manifiesta un comportamiento reproductivo con ocurrencia de machos satélite y nidos comunales en la naturaleza. A pesar que el hallazgo de machos satélite ya había sido previamente reportado para esta especie, la ocurrencia de nidos comunales representó el primer registro para la especie, e incluso para el género *Leptodactylus*.
- ✓ El método AMPHIPLEX resultó efectivo para los machos de *L. latrans* observándose la formación de amplexos en el 40% de los experimentos, y registrándose vocalizaciones nupciales en el 60% de los experimentos, mientras que la efectividad en las hembras fue significativamente inferior, registrándose 1 único caso de inducción efectiva.

Los resultados del Capítulo I, permitieron avanzar significativamente en la puesta a punto de la inducción hormonal de la reproducción. La ambientación de los tanques de reproducción fue mejorada de forma significativa con la información obtenida del microhábitat de los nidos de espuma en condiciones naturales. Los valores de ICR, permitieron hacer una selección más precisa de las hembras en condición reproductiva, obteniendo en los experimentos finales una inducción exitosa en una hembra con valor de ICR en el rango del promedio. Los resultados indican además que las hembras que no produjeron desove, poseían un ICR mayor o inferior al promedio, por lo que nuevas y más exhaustivas investigaciones en relación a este factor, incluyendo la posibilidad de realizar biopsias de los ovarios a lo largo del ciclo, son necesarias para corroborar la hipótesis del ICR promedio.

En el Capítulo II, se desarrolló una metodología para la cría de la especie en cautiverio, mediante la realización de experimentos que ponían a prueba distintas variables y condiciones de cría. A partir de estos experimentos, se determinaron las mejores condiciones de cría para la especie, las que se utilizaron para criar larvas desde huevo hasta después de la metamorfosis. A partir de la cría de *L. latrans* se pudieron obtener muestras en distintos estadios del desarrollo para la evaluación de los patrones de diferenciación sexual en la especie, a partir de los cuales se caracterizó el proceso de desarrollo gonadal y diferenciación sexual. En relación a esto se pudo determinar el momento de la diferenciación sexual y la proporción de sexos por estadio. Se logró también caracterizar parcialmente 4 ADN copia con potencial relación con la diferenciación morfológica de las gónadas de *L. latrans*. De este modo, durante el desarrollo de este Capítulo se alcanzaron los siguientes logros:

- ✓ *L. latrans* resultó una especie adecuada para la cría en cautiverio y que puede entonces utilizarse como modelo experimental. Resultando adecuados para una óptima cría, las densidades entre 5 y 10 individuos/L, con una frecuencia de alimentación cada 24 a 48 horas y utilizando como alimento de base el balanceado para peces omnívoros en cantidades de 0,02 a 0,04 g/id.
- ✓ La diferenciación gonadal en *L. latrans* desde el punto de vista histológico ocurrió durante su fase larval y antes del clímax metamórfico. Más específicamente, la diferenciación del ovario se hizo visible a nivel histológico en Gs37, mientras que el testículo se pudo diferenciar histológicamente en el Gs40. A nivel macroscópico las gónadas fueron diferenciables a simple vista, entre ovarios y testículos, una vez alcanzado el clímax metamórfico.
- ✓ La diferenciación tanto del ovario como del testículo en *L. latrans*, se adecuó a los patrones y tasas de diferenciación descritos en la bibliografía para otras especies de anuros. La relación de sexos por estadio resulto cercana a la relación 1:1, con algunas desviaciones en estadios específicos, luego de ocurrida la diferenciación gonadal.
- ✓ La comparación de las secuencias obtenidas, para su utilización como biomarcadores de diferenciación testicular (*dmrt1* y *cyp17*) y ovárica (*cyp19* y *foxl2*), con secuencias conocidas en otros anfibios confirmó que se trata de las secuencias de los genes en estudio. Este resultado es de importancia para futuras investigaciones con esta especie en las que se mida la expresión de estos genes a lo largo del desarrollo y se correlacione con la información obtenida de la histología de la gónada en la ontogenia.

Hasta aquí se generaron los conocimientos faltantes y necesarios para llevar a cabo el objetivo principal de esta Tesis, el cual fue abordado en el Capítulo III, donde se desarrolló la segunda etapa de esta Tesis que contemplaba la determinación de los efectos producidos por la exposición a glifosato, sobre el desarrollo gonadal y la diferenciación sexual de *L. latrans*, con bioensayos de toxicidad en laboratorio. Para tal fin, se necesitó en primer lugar, evaluar los efectos letales del herbicida (conteniendo glifosato) Roundup Ultramax (RU) y del glifosato grado técnico (GLY) en larvas de *L. latrans* en dos estadios del desarrollo, mediante la utilización de bioensayos de toxicidad aguda, con el objetivo de conocer el rango de toxicidad letal y subletal para la especie. Además se evaluaron los efectos subletales en ambas formas del herbicida mediante exposiciones agudas y

crónicas, evaluando distintos tipos de efectos: actividad natatoria, crecimiento, desarrollo, ocurrencia de anomalías morfológicas, efectos en la histología del hígado y de la gónada. Los conocimientos generados durante el desarrollo de este capítulo fueron:

- ✓ La especie *L. latrans* resultó un buen modelo experimental para la detección de efectos letales y subletales en ensayos ecotoxicológicos de laboratorio. Sin embargo, el trabajo con esta especie en etapas tempranas del desarrollo (Gs25), requirió del suministro de alimento, ya que la inanición resultó un factor influyente en la supervivencia a partir de las 72 horas. No obstante, pudimos demostrar que la inclusión de la alimentación en ensayos ecotoxicológicos, según la metodología empleada durante los ensayos agudos en este trabajo de Tesis, no afectó la toxicidad de los compuestos evaluados.
- ✓ La CL_{96h} de RU para *L. latrans* fue de 3,26 mg e.a./L para Gs25 y de 8,67 mg e.a./L para Gs36, resultando Gs25 el estadio más sensible respecto a Gs36.
- ✓ El RU indujo efectos subletales en la actividad natatoria, produciendo nado irregular. Asimismo, se detectó un incremento en el crecimiento y desarrollo en larvas de Gs25, resultando éstos los puntos finales más sensibles.
- ✓ El GLY produjo efectos subletales sobre el crecimiento y el desarrollo de las larvas de *L. latrans* Gs25, manifestando un incremento en ambos puntos finales.
- ✓ El RU, indujo además anomalías morfológicas en Gs25 y Gs36, y se detectaron anomalías en la histología del hígado de larvas Gs36, como una mayor frecuencia de MMC y MMCs y la evidencia de lesiones hepáticas.
- ✓ EL GLY también produjo anomalías morfológicas en ambos estadios y se detectaron las mismas anomalías en la histología del hígado de larvas Gs36, que las observadas por exposición a RU.
- ✓ El RU produjo una clara tendencia a la feminización por exposiciones crónicas de larvas Gs34. No obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, lo cual podría resolverse al aumentar el número de individuos muestreados por tratamiento.
- ✓ El GLY no produjo un desvío en la relación de sexos por lo cual seguimos apoyando la hipótesis del efecto perjudicial de los coadyuvantes.

El GLY produjo los mismos efectos subletales que el RU, con una diferencia máxima de toxicidad entre ambos compuestos de 5 órdenes de magnitud. La diferencia en la toxicidad observada entre ambas formas del herbicida sustenta la hipótesis que sugiere una mayor

penetración del principio activo por la interacción con los coadyuvantes, y la no toxicidad del coadyuvante en sí mismo. Las anormalidades inducidas podrían tener efectos perjudiciales en la aptitud física de las ranas adultas, pudiendo producir dificultades en la natación y la adquisición del alimento, tamaños menores a la metamorfosis, y en la madurez sexual, lo que generaría una disminución de la fecundidad. Por otra parte, los resultados de efectos subletales en el crecimiento y desarrollo, así como la alteración en las proporciones sexuales en concentraciones ambientalmente relevantes deberían poner en alerta sobre los posibles efectos del glifosato como perturbador endocrino teniendo en cuenta además, la bibliografía existente en otros grupos de vertebrados.

Finalmente, si bien no pudo comprobarse estadísticamente un efecto en la diferenciación sexual, ni en el desarrollo gonadal por exposición a RU ni GLY, pudo observarse una tendencia a la feminización en la relación de sexos obtenida de los experimentos ecotoxicológicos. Estos resultados podrían ser indicadores de un posible efecto estrogénico por parte del RU y del GLY sobre las larvas de anfibios. En este sentido, sería necesario ampliar los estudios de este trabajo de Tesis, incluyendo las mediciones de la expresión génica de los genes obtenidos para su utilización como biomarcadores de diferenciación sexual en ensayos ecotoxicológicos.

BIBLIOGRAFIA

- Agius, C. & Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of fish diseases* 26, 499-509.
- Agostini, M. G., & Burrowes, P. A. (2015a). Infection patterns of the chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, on anuran assemblages in agro-ecosystems from Buenos Aires Province, Argentina. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology* 142, 113-126.
- Agostini, M. G., Cortelezzi, A., Berkunsky, I., Soler, G. & Burrowes, P. (2015b). First record of *Batrachochytrium dendrobatidis* infecting threatened populations of Tandilean Red-belly toad (*Melanophryniscus* aff. *montevidensis*) in Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86, 826-828.
- Agostini, M. G., Kacoliris, F., Demetrio, P., Natale, G. S., Bonetto, C. & Ronco, A. E. (2013). Abnormalities in amphibian populations inhabiting agroecosystems in northeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 104, 163-171.
- Aizen, M. A., Garibaldi, L. A. & Dondo, M. (2009). Expansión de la soja y diversidad de la agricultura argentina. *Ecología Austral* 19, 45-54.
- Akmentins, M. S. & Cardozo, D. E. (2010). American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) invasion in Argentina. *Biological Invasions* 12, 735-737.
- Alford, R. A., Dixon, P. M. & Pechmann, J. H. (2001). Ecology: Global amphibian population declines. *Nature* 412, 499-500.
- Al-Rajab, A. J. & Hakami, O. M. (2014). Behavior of the non-selective herbicide glyphosate in agricultural soil. *American Journal of Environmental Sciences* 10, 94-101.
- Altieri, M. A. & Pengue, W. (2006). GM soybean: Latin America's new colonizer. *Seedling* 1, 13-17.
- Altig, R. (2007). Comments on the descriptions and evaluations of tadpole mouthpart anomalies. *Herpetological Conservation and Biology* 2, 1-4.
- Álvarez, D. & Nicieza, A.G. (2002). Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. *Functional Ecology* 16, 640-648.
- Andrade, M. L., Reyzabal, M. L., Covelo, E. F. & Vega, F. A. (2005). Organochlorine pesticides in soils of the horticultural belt of Bahia Blanca (Argentina). *Canadian Journal of Soil Science* 85, 273-282.
- Andrade de Lacerda, J. V., de Assis, B., Tolledo, J., Lima, L. H. R. & Feio, R. N. (2010). Registro de ninho comunal em *Physalaemus* aff. *olfersii* (Anura, Leiuperidae), Viçosa, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Zoociências* 11, 167-170.
- Andreone, F., Cadle, J. E., Cox, N., Glaw, F., Nussbaum, R. A., Raxworthy, C. J., Stuart, S. M., Vallan, D. & Vences, M. (2005). Species review of amphibian extinction risks in

Madagascar: conclusions from the Global Amphibian Assessment. *Conservation Biology* 19, 1790-1802.

Angulo A., Rueda-Almonacid J. V., Rodríguez-Mahecha J. V. & La Marca E. (Eds). (2006). Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina. Conservación Internacional. Serie Manuales de Campo N° 2. Panamericana Formas e Impresos S.A., Bogotá D.C. 298 pp.

Annett, R., Habibi, H. R. & Hontela A. (2014). Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology* 34, 458-479.

Antón, R. I., Caviades-Vidal, E., Cid, F. D., Jofré, M. B., Navarro Becerra, N. & Rodríguez, N. G. (2003). Ecotoxicología de los embalses de la zona centro de la provincia de San Luis. Organoclorados. *Acta Toxicológica Argentina* 11, 69-70.

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, 1866-1873.

Arak, A. (1988). Callers and satellites in the natterjack toad: evolutionarily stable decision rules. *Animal Behaviour* 36, 416-432.

Araújo, C. V. M., Shinn, C., Moreira-Santos, M., Lopes, I., G. Espíndola, E. L. & Ribeiro, R. (2014a). Copper-driven avoidance and mortality in temperate and tropical tadpoles. *Aquatic Toxicology* 146, 70-75.

Araújo, C. V. M., Shinn, C., Vasconcelos, A. M., Ribeiro, R. & Espíndola, E. L. G. (2014b). Preference and avoidance responses by tadpoles: the fungicide pyrimethanil as a habitat disturber. *Ecotoxicology* 23, 851-860.

Arellano, M. L., Ferraro, D. P., Steciow, M. M. & Lavilla, E. O. (2009). Infection by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in the yellow belly frog (*Elachistocleis bicolor*) from Argentina. *The Herpetological Journal* 19, 217-220.

Arellano, M. L., Natale, G. S., Grilli, P. G., Barrasso, D., Steciow M. & Lavilla, E.O. (2017). Host-pathogen relationships between the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* and tadpoles of five South American anuran species. *Herpetological Journal* 27, 33-39.

Arendt, J. & Hoang, L. (2005). Effect of food level and rearing temperature on burst speed and muscle composition of western spadefoot toad (*Spea hammondi*). *Functional Ecology* 19, 982-987.

Arias, A. H., Pereyra, M. T. & Marcovecchio, J. E. (2011). Multi-year monitoring of estuarine sediments as ultimate sink for DDT, HCH, and other organochlorinated pesticides in Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment* 172, 17-32.

Arzabe, C. (1999). Reproductive activity patterns of anurans in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. *Revista Brasileira de Zoologia* 16, 851-864.

ASTM. (2007). ASTM E729-96(2007). Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates and amphibians. American Society for Testing and Materials International. Pennsylvania, USA.

ASTM. (1991). ASTM E 1439 - 91. Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (Fetax). American Society for Testing and Materials. Pennsylvania, USA. 11 pp.

Atlin, G. N., Cairns, J. E. & Das, B. (2017). Rapid breeding and varietal replacement are critical to adaptation of cropping systems in the developing world to climate change. *Global Food Security* 12, 31-37.

Babini M. S., Bionda C. de L., Salas N. E. & Martino A. L. (2015). Health status of tadpoles and metamorphs of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) that inhabit agroecosystems and its implications for land use. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 118, 118-125.

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, 23959-23971.

Bai, Y., Li, X. Y., Liu, Z. J. & Zhang, Y. H. (2017). Effects of octylphenol on the expression of StAR, CYP17 and CYP19 in testis of *Rana chensinensis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 51, 9-15.

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* 4, e2641.

Bantle, J. A., Dumont, J. N., Finch, R. A., Linder, G. & Fort, D. J. (1996). Atlas of abnormalities. A guide for the performance of FETAX. Second ed. Oklahoma State University. Oklahoma, USA. 71 pp.

Barrasso, D. A., Cajade, R., Nenda, S. J., Baloriani, G. & Herrera, R. (2009). Introduction of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Anura: Ranidae) in natural and modified environments: an increasing conservation problem in Argentina. *South American Journal of Herpetology* 4, 69-75.

Barreto, L. & Andrade, G. V. (1995). Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, 16, 67-76.

Barrionuevo, J. S. & Ponssa, L. M. (2008). Decline of three species of the genus *Telmatobius* (Anura: Leptodactylidae) from Tucumán Province, Argentina. *Herpetologica* 64, 47-62.

Baudino, O. M., Suero, E. A., Augusto, M., Gimenez, M. E. & Flores, N. (2003). Monitoring organochlorine pesticides in surface and ground water in San Juan Argentina. *Journal of the Chilean Chemical Society* 48, 7-12.

- Bawa, V., Kondal, J. K., Hundal, S. S. & Kaur, H. (2017). Biochemical and Histological Effects of Glyphosate on the Liver of *Cyprinus carpio* (Linn.). *American Journal of Life Sciences* 5, 71-80.
- Benbrook C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Science Europe* 28, 3-18.
- Benedetti, A. L., de Lourdes Vituri, C., Trentin, A. G., Domingues, M. A. C. & Alvarez-Silva, M. (2004). The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb®. *Toxicology Letters* 153, 227-232.
- Bernabò, I., Biasone, P., Macirella, R., Tripepi, S. & Brunelli, E. (2014). Liver histology and ultrastructure of the Italian newt (*Lissotriton italicus*): Normal structure and modifications after acute exposure to nonylphenol ethoxylates. *Experimental and Toxicologic Pathology* 66, 455-468.
- Bernal, M. H., Solomon, K. R. & Carrasquilla, G. (2009). Toxicity of Formulated Glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to Larval Colombian Frogs 1. Laboratory Acute Toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 72, 961-965.
- Berril, M., Bertram, S., Wilson, A., Louis, S., Brigham, D. & Stromberg, C. (1993). Lethal and sublethal impacts of pyrethroid insecticides on amphibian embryos and tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 525-539.
- Berrill, M.; Coulson, D.; McGillivray, D. & Pauli, B. (1998). Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anuran amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 1738-1744.
- Berven, K.A. & Chandra, B.G. (1988). The relationship among egg size, density and food level on larval development in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Oecologia* 75, 67-72.
- Berven, K.A. & Gill, D.E. (1983). Interpreting geographic variation in life-history traits. *American Zoologist* 23, 85-97.
- Bidwell, J. R. & Gorrie, J. R. (1995). Acute toxicity of a pesticide to selected frog species. Final Report. Department of Environmental Protection. Perth, Western Australia.
- Bielby, J., Cooper, N., Cunningham, A. A., Garner, T. W. J. & Purvis, A. (2008). Predicting susceptibility to future declines in the world's frogs. *Conservation Letters* 1, 82-90.
- Bindraban, P. S., Franke, A. C., Ferraro, D. O., Ghersa, C. M., Lotz, L. A. P., Nepomuceno, A., Smulders, M.J.M. & Van de Wiel, C. C. M. (2009). GM-related sustainability: agro-ecological impacts, risks and opportunities of soy production in Argentina and Brazil. *Plant Research International BV, Wageningen*. 50 pp.
- Blaustein, A. R. & Kiesecker, J. M. (2002). Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology letters* 5, 597-608.

- Blaustein, A. R., Romansic, J. M., Kiesecker, J. M. & Hatch, A. C. (2003). Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* 9, 123-140.
- Bögi, C., Levy, G., Lutz, I. & Kloas, W. (2002). Functional genomics and sexual differentiation in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 133, 559-570.
- 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* 284, 20170493.
- Bonfanti, P., Saibene, M., Bacchetta, R., Mantecca, P. & Colombo, A. (2018). A glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology* 195, 103-113.
- Borggaard, O. K. & Gimsing, A. L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science* 64, 441-456.
- Bradshaw, L. D., Padgett, S. R., Kimball, S. L. & Wells, B. H. (1997). Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Technology* 11, 189-198.
- Brodeur, J. C., Candiotti, J. V., Soloneski, S., Larramendy, M. L. & Ronco, A. E. (2012). Evidence of reduced feeding and oxidative stress in common tree frogs (*Hypsiboas pulchellus*) from an agroecosystem experiencing severe drought. *Journal of Herpetology*, 46, 72-78.
- Brodeur, J. C., Svartz, G., Perez-Coll, C. S., Marino, D. J. G. & Herkovits, J. (2009). Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: Non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquatic Toxicology* 91, 161-170.
- Brooks, T. M., Mittermeier, R. A., da Fonseca, G. A., Gerlach, J., Hoffmann, M., Lamoreux, J. F., Mittermeier, C. G., Pilgrim, J. D. & Rodrigues, A. S. (2006). Global biodiversity conservation priorities. *Science* 313, 58-61.
- Broomhall, S. & 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, 221-226.
- Browne, R. K., Clulow, J., & Mahony, M. (2002). The short-term storage and cryopreservation of spermatozoa from hylid and myobatrachid frogs. *CryoLetters* 23, 129-136.
- Browne, R. K., Seratt, J., Vance, C. & Kouba, A. (2006). Hormonal priming, induction of ovulation and in-vitro fertilization of the endangered Wyoming toad (*Bufo baxteri*). *Reproductive Biology and Endocrinology* 4, 1.
- Browne, R. K. & Zippel, K. (2007). Reproduction and larval rearing of amphibians. *ILAR Journal* 48, 214-234.

- 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, 135-142.
- Buchholz, D. R., Fu, L., & Shi, Y. B. (2004). Cryopreservation of *Xenopus* transgenic lines. *Molecular reproduction and development*, 67(1), 65-69.
- Çağlar, S. & Kolankaya, D. (2008). The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 25, 57-62.
- Çakıcı, Ö. (2015). Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). *Experimental and Toxicologic Pathology* 67, 237-243.
- Calabrese, E. J. (2008). Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1451-1474.
- Capel, B. (1996). The Role of Sry in Cellular Events Underlying Mammalian Sex Determination. *Current Topics in Developmental Biology* 32, 1-37.
- Capel, B. (2017). Vertebrate sex determination: evolutionary plasticity of a fundamental switch. *Nature Reviews Genetics* 18, 675.
- Carr, B. A., Geaghen, J. P. & Culley, D. D. (1984). Effect of two types of light on survival, growth and ovary development of *Rana catesbeiana*. *Aquaculture* 40, 163-169.
- Carr, J. A., Gentles, A., Smith, E. E., Goleman, W. L., Urquidi, L. J., Thuett, K., Kendall, R. J., Giesy, J. P., Gross, T. S., Solomon, K. R. & Van Der Kraak, G. (2003). Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 396-405.
- Carrasco, A. E., Sánchez, N. E., & Tamagno L. E. (2012). Modelo agrícola e impacto socioambiental en la Argentina: monocultivo y agronegocios. Serie Monográfica Sociedad y Ambiente: Reflexiones para una nueva América Latina. ISSN 2314-1743 , Monografía N° 1.
- CASAFE. (2015). Mercado argentino de productos fitosanitarios. 2015. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. Buenos Aires, Argentina.
- Cauble, K. & Wagner, R. S. (2005). Sublethal Effects of the Herbicide Glyphosate on Amphibian Metamorphosis and Development. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75, 429-435.
- Cei, J. M. (1948). El ritmo estacional en los fenómenos cíclicos endocrinos sexuales de la rana criolla, *Leptodactylus ocellatus* (L.) del norte argentino. *Acta Zoológica Lilloana* 6, 283-331.
- Cei, J. M. (1980). Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano (Nova Serie) Monographies* 2, 1-609.

CITES (2015). Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna. Appendices. <<https://cites.org/sites/default/files/eng/app/2015/E-Appendices-2015-02-05.pdf>>. Acceso 31 de Julio de 2016.

Clements, C., Ralph, S. & Petras, M. (1997). Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29, 277-288.

Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N. & Hackbarth, H. (1996). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Laboratory Animals* 30, 293-316.

Clulow, J., Trudeau, V. L. & Kouba, A. J. (2014). Amphibian declines in the twenty-first century: why we need assisted reproductive technologies. In *Reproductive Sciences in Animal Conservation*. Springer New York (pp. 275-316)

Collins, J. P. & Storer, A. (2003). Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and distributions* 9, 89-98.

Collins, J. P. & Lewis, M. A. (1979). Overwintering tadpoles and breeding season variation in the *Rana pipiens* complex in Arizona. *The Southwestern Naturalist* 24, 371-373.

Colombo, J. C., Khalil, M. F., Arnac, M., Horth, A. C. & Catoggio, J. A. (1990). Distribution of chlorinated pesticides and individual polychlorinated biphenyls in biotic and abiotic compartments of the Rio de La Plata, Argentina. *Environmental Science & Technology* 24, 498-505.

CONICET (2005). Marco de Referencia Ético para la Investigación Biomédica: Principios Éticos para la Investigación con Animales de Laboratorio, Granja y Animales Silvestres.

Cooke, A. S. (1981). Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. *Environmental Pollution Series A* 25, 123-133.

Costa, M. J., Monteiro, D. A., Oliveira-Neto, A. L., Rantin, F. T. & Kalinin, A. L. (2008). Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. *Ecotoxicology* 17, 153-163.

Coupe, R. H., Kalkhoff, S. J., Capel, P. D. & Gregoire, C. (2012). Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest Management Science* 68, 16-30.

Crawshaw, G. J. & Weinkle, T. K. (2000). Clinical and pathological aspects of the amphibian liver. In *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* Vol. 9, No. 3.. Elsevier. pp. 165-173

Crump, M. L. (1974). Reproductive Strategies in a Tropical Anuran Community. *Miscellaneous Publication* 61. University of Kansas. Museum of Natural History.

Culley, D. D., Othman, A. M. & Easley, K. A. (1982). Predicting ovulation in the frog, *Rana catesbeiana* by morphometry. *Journal of Herpetology* 16, 311-314.

- Dash, M.C. & Hota, A.K. (1980). Density effects on the survival, growth rate, and metamorphosis of *Rana tigrina* tadpoles. *Ecology* 61, 1025-1028.
- Davidson, C., Bradley Shaffer, H. & Jennings, M. R. (2001). Declines of the California red-legged frog: climate, UV-b, habitat, and pesticides hypotheses. *Ecological Applications* 11, 464-479.
- De Brito Rodrigues, L., de Oliveira, R., Abe, F. R., Brito, L. B., Moura, D. S., Valadares, M. C., Grisolia, C. K., de Oliveira, D. P. & de Oliveira, G. A. R. (2017). Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36, 1755-1763.
- de Gerónimo, E., Aparicio, V. C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S. & Costa, J. L. (2014). Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere* 107, 423-431.
- de Gregorio, L. S., Franco-Belussi, L., Gomes, F. R. & de Oliveira, C. (2016). Flutamide effects on morphology of reproductive organs and liver of Neotropical Anura, *Rhinella schneideri*. *Aquatic Toxicology* 176, 181-189.
- de Oliveira, C. R., Fraceto, L. F., Rizzi, G. M., Salla, R. F., Abdalla, F. C., Costa, M. J. & Silva-Zacarin, E. C. M. (2016). Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. *Chemosphere* 149, 304-313.
- Delgado, C.S., Natale, G.S., Herrera, R.H. & Barrasso, D.A. (2012). First Record of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leiuperidae) for Buenos Aires province, Argentina. *Herpetological Review* 43, 84-85.
- Demetrio, P. M. (2012). Study of biological effects of pesticides used in soybean RR and evaluation of adverse impacts on agro-ecosystems of the Pampas. PhD Dissertation. National University of La Plata.
- 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, 945-951.
- Denver, R. J. & Crespi, E. J. (2006). Stress hormones and human developmental plasticity. *NeoReviews* 7, 183-188.
- Domingo Yagüez, J., Ferreyra, A., Langhi, R., Pausich, G., Pezzola, A. & Coma, C. (2011). Soy Campaign 2010-2011. Buenos Aires, Argentina: National Institute of Agricultural Technology, Ministry of Agriculture, Livestock and Fisheries.
- Duarte-Guterman, P., Langlois, V. S., Hodgkinson, K., Pauli, B. D., Cooke, G. M., Wade, M. G. & Trudeau, V. L. (2009). The aromatase inhibitor fadrozole and the 5-reductase inhibitor finasteride affect gonadal differentiation and gene expression in the frog *Silurana tropicalis*. *Sexual Development* 3, 333-341.
- Duellman, W. E. & Trueb, L. (1994). *Biology of amphibians*. JHU press. 696p.

- Dufour, S., Weltzien, F.A., Sebert, M.E., Le Belle, N., Vidal, B., Vernier, P. & Pasqualini, C. (2005). Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1040, 9-21.
- Duke, S. O. & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* 64, 319-325.
- Dumont, J. N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology* 136, 153-179.
- Edge, C. B., Thompson, D. G., Hao, C. & Houlahan, J. E. (2012). A silviculture application of the glyphosate-based herbicide Vision MAX to wetlands has limited direct effects on amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 2375-2383.
- Edginton, A. N., Sheridan, P. M., Stephenson, G. R., Thompson, D. G. & Boermans, H. J. (2004). Comparative effects of pH and Vision® herbicide on two life stages of four anuran amphibian species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:, 815-822.
- 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, 1382-1397.
- Eggert, C. (2004). Sex determination: the amphibian models. *Reproduction nutrition development* 44, 539-549.
- El Jamil, A., Magre, S., Mazabraud, A. & Penrad-Mobayed, M. (2008). Early aspects of gonadal sex differentiation in *Xenopus tropicalis* with reference to an antero-posterior gradient. *Journal of Experimental Zoology A* 309, 127-137.
- Elorriaga, Y., Marino, D. J., Carriquiriborde, P. & Ronco, A. E. (2013). Human pharmaceuticals in wastewaters from urbanized areas of Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 90, 397-400.
- Etchegoyen, M. A., Ronco, A. E., Almada, P., Abelando, M. & Marino, D. J. (2017). Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. *Environmental Monitoring and Assessment* 189(2), 63.
- Evenson, R. E. & Gollin, D. (2003). Assessing the impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. *Science* 300, 758-762.
- Falconi, R., Dalpiaz, D. & Zaccanti, F. (2004). Ultrastructural aspects of gonadal morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia Anura) 1. Sex differentiation. *Journal of Experimental Zoology A*. 301, 378-388.
- Falconi, R., Dalpiaz, D. & Zaccanti, F. (2007). Morphological aspects of gonadal morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia: Anura): Bidder's organ differentiation. *The Anatomical Record* 290, 801-813.
- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., Komatsu, T., Morohashi, K., Hayes, T. B., Takayanagi, R. & Nawata, H. (2007). Atrazine-induced

aromatase expression is SF-1 dependent: Implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environmental Health Perspectives* 115, 720-727.

FAO-AMIS. (2017). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Agricultural Market Information System. <<http://statistics.amis-outlook.org/data/index.html#COMPARE>>. Accedido el 29 de diciembre de 2017.

Feder, M. E. (1983). The relation of air breathing and locomotion to predation on tadpoles, *Rana berlandieri*, by turtles. *Physiological Zoology* 56, 522-531.

Fenoglio, C., Boncompagni, E., Fasola, M., Gandini, C., Comizzoli, S., Milanese, G. & Barni, S. (2005). Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 259-268.

Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed. Cambridge University Press. Cambridge, England.

Flament, S. (2016). Sex reversal in amphibians. *Sexual Development* 10, 267-278.

Forester, D. C. & Lykens, D. V. (1986). Significance of satellite males in a population of spring peepers (*Hyla crucifer*). *Copeia* 719-724.

Fox, S. F., Greer, A. L., Torres-Cervantes, R. & Collins, J. P. (2006). First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 72, 87-92.

Franco-Belussi, L., de Lauro Castrucci, A. M. & de Oliveira, C. (2013). Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle4, D-Phe7- α -melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. *Zoology* 116, 316-324.

Franco-Belussi, L., Santos, L. R. D. S., Zieri, R., Vicentini, C. A., Taboga, S. R. & de Oliveira, C. D. (2012). Liver anatomy, histochemistry, and ultrastructure of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) during the breeding season. *Zoological Science* 29, 844-848.

Freitas, T. M. D. S., Almeida, V. H. D. C., Montag, L. F. D. A., Rocha, R. M. D. & Fontoura, N. F. (2011). Seasonal changes in the gonadosomatic index, allometric condition factor and sex ratio of an achenipterid catfish from eastern Amazonia. *Neotropical Ichthyology* 9, 839-847.

Guyton, K.Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scocciati, C., Mattock, H. & Straif, K. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology* 16, 490-491.

Frost, D. R. (2016). *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.0. Base de datos electrónica accesible en <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.htm>>. Accedido el 19 de Julio de 2016. American Museum of Natural History, New York, USA.

- Fuentes, L., Moore, L. J., Rodgers, J. H., Bowerman, W. W., Yarrow, G. K. & Chao, W. Y. (2011). Comparative toxicity of two glyphosate formulations (original formulation of Roundup® and Roundup WeatherMAX®) to six North American larval anurans. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2756-2761.
- Fulton TW. (1904). The rate of growth of fishes. *Fish Board of Scotland Annual Report* 22, 141-241.
- Gahl, M. K., Pauli, B. D. & Houlahan, J. E. (2011). Effects of chytrid fungus and a glyphosate-based herbicide on survival and growth of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*). *Ecological Applications* 21,2521-2529.
- Gallardo, J. M. (1974). *Anfibios de los alrededores de Buenos Aires*. EUDEBA. 231p.
- Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M. C., & Séralini, G. E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262, 184-191.
- Gendron, A. D., Marcogliese, D. J., Barbeau, S., Christin, M. S., Brousseau, P., Ruby, S., Cyr, D. & Fournier, M. (2003). Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. *Oecologia* 135, 469-476.
- 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, 129-133.
- Ghirardi, R., Perotti, M. G., Steciow, M. M., Arellano, M. L. & Natale, G. S. (2011). Potential distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Argentina: implications in amphibian conservation. *Hydrobiologia* 659, 111-115.
- Giaretta, A. A. & Menin, M. (2004). Reproduction, phenology and mortality sources of a species of *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae). *Journal of Natural History* 38, 1711-1722.
- Giesy, J. P., Dobson, S. & Solomon, K. R. (2000). Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, ed. G. W. Ware. Springer. New York, USA. pp. 35-120.
- Gill, J. P. K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S. & Girdhar, M. (2018). Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters* En prensa.
- Goldberg, J. (2013). A first case of bilateral hermaphroditism in a wild-caught tadpole (*Scinax fuscovarius*). *The Herpetological Journal* 23, 167-169.
- Goldberg, J. (2014). Gonadal differentiation and development in the snouted treefrog, *Scinax fuscovarius* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Journal of Herpetology* 49, 468-478.

Gonzalez, M., Miglioranza, K. S., Aizpún, J. E., Isla, F. I. & Peña, A. (2010). Assessing pesticide leaching and desorption in soils with different agricultural activities from Argentina (Pampa and Patagonia). *Chemosphere* 81, 351-358.

Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16, 183-190.

Govindarajulu, P. P. (2008). Literature review of impacts of glyphosate herbicide on amphibians: What risks can the silvicultural use of this herbicide pose for amphibians in B.C.? Wildlife Report No. R-28. B.C. Ministry of Environment. Victoria, BC.

Gramapurohit, N. P., Shanbhag, B. A. & Saidapur, S. K. (2000). Pattern of gonadal sex differentiation, development, and onset of steroidogenesis in the frog, *Rana curtipes*. *General and Comparative Endocrinology* 119, 256-264.

Grau, H. R., Aide, T. M. & Gasparri, N. I. (2005). Globalization and soybean expansion into semiarid ecosystems of Argentina. *Ambio* 34, 265-266.

Greenfield, B. K., Teh, S. J., Ross, J. R., Hunt, J., Zhang, G., Davis, J. A., Ichikawa, G., Crane, D., Hung, S.S.O., Deng, D., The, F. & Green, P.G. (2008). Contaminant concentrations and histopathological effects in Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55, 270-281.

Grenyer, R., Orme, C. D. L., Jackson, S. F., Thomas, G. H., Davies, R. G., Davies, T. J., Jones, K. E., Olson, V. A., Ridgely, R. S., Rasmussen, P. C., Ding, T.S., Bennett, P. M., Blackburn, T. M., Gaston, K. J., Gittleman, J. L. & Ding, T. S. (2006). Global distribution and conservation of rare and threatened vertebrates. *Nature* 444, 93-96.

Gunderson, M. P., Veldhoen, N., Skirrow, R. C., Macnab, M. K., Ding, W., van Aggelen, G. & Helbing, C. C. (2011). Effect of low dose exposure to the herbicide atrazine and its metabolite on cytochrome P450 aromatase and steroidogenic factor-1 mRNA levels in the brain of premetamorphic bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*). *Aquatic Toxicology* 102, 31-38.

Güngördü, A. (2013). Comparative toxicity of methidathion and glyphosate on early life stages of three amphibian species: *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis*, and *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology* 140-141, 220-228.

Haczkiwicz, K. & Ogielska, M. (2013). Gonadal sex differentiation in frogs: how testes become shorter than ovaries. *Zoological Science* 30, 125-134.

Haddad, C. F. (1991). Satellite behavior in the Neotropical treefrog *Hyla minuta*. *Journal of Herpetology* 25, 226-229.

Harris, M. L., Chora, L., Bishop, C. A. & Bogart, J. P. (2000). Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 64, 263-270.

Harris, M. L., Bishop, C. A., Struger, J., van den Heuvel, M. R., Van Der Kraak, G. J., Dixon, D. G., Ripley, B. & Bogart, J. P. (1998). The functional integrity of northern leopard

frog (*Rana pipiens*) and green frog (*Rana clamitans*) populations in orchard wetlands. I. Genetics, physiology, and biochemistry of breeding adults and young-of-the-year. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 1338-1350.

Hayes, T. B. (1998). Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *Journal of Experimental Zoology A* 281, 373-399.

Hayes, T. B. (2004). There is no denying this: defusing the confusion about atrazine. *AIBS Bulletin* 54, 1138-1149.

Hayes, T. B., Stuart, A. A., Mendoza, M., Collins, A., Noriega, N., Vonk, A., Johnston, G., Liu, R. & Kpodzo, D. (2006). Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17beta-estradiol): Support for the demasculinization/feminization hypothesis. *Environmental Health Perspectives* 114, 134-141.

Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C. & Vonk, A. (2003). Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environmental Health Perspectives* 111, 568-575.

Herkovits, J. & Pérez-Coll, C. S. (1991). Antagonism and synergism between lead and zinc in amphibian larvae. *Environmental Pollution* 69, 217-221.

Herkovits, J. & Perez-Coll, C. S. (2003). AMPHITOX: a customized set of toxicity tests employing amphibian embryos. In *Multiple stressor effects in relation to declining amphibian populations*. ASTM International.

Herrera, R. A., Steciow, M. M. & Natale, G. S. (2005). Chytrid fungus parasitizing the wild amphibian *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) in Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 64, 247-252.

Heyer, R., Langone, J., La Marca, E., Azevedo-Ramos, C., di Tada, I., Baldo, D., Lavilla, E., Scott, N., Aquino, L. & Hardy, J. (2010). *Leptodactylus latrans*. In *The IUCN Red List of Threatened Species*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. www.iucnredlist.org. Accessed on 16 April 2016

Hogan, N. S., Duarte, P., Wade, M. G., Lean, D. R. & Trudeau, V. L. (2008). Estrogenic exposure affects metamorphosis and alters sex ratios in the northern leopard frog (*Rana pipiens*): identifying critically vulnerable periods of development. *General and Comparative Endocrinology* 156, 515-523.

Hödl, W. (1992). Reproductive behaviour in the neotropical foam-nesting frog *Pleurodema diplolistris* (Leptodactylidae). *Amphibia-Reptilia* 13, 263-274.

Honrubia, M. P., Herráez, M. P. & Alvarez, R. (1993). The carbamate insecticide ZZ-Aphox® induced structural changes of gills, liver, gall-bladder, heart, and notochord of *Rana perezi* tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 25, 184-191.

- Horat, P. & Semlitsch, R.D. (1994). Effects of predation risk and hunger on the behavior of two species of tadpoles. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 34, 393-401.
- Hota, A.K. & Dash, M.C. (1981). Growth and metamorphosis of *Rana tigrina* larvae: effects of food level and larval density. *Oikos* 37, 349-352.
- Hoskins, T. D. & Boone, M. D. (2017). Atrazine feminizes sex ratio in Blanchard's cricket frogs (*Acris blanchardi*) at concentrations as low as 0.1 µg/L. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37, 427-435.
- Houlahan, J. E., Findlay, C. S., Schmidt, B. R., Meyer, A. H. & Kuzmin, S. L. (2000). Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404, 752-755.
- 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, 1928-1938.
- Howe, G.; Gillis, R. & Mowbray R.C. (1998). Effect of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 519-525.
- Howerth, E. W. (1984). Pathology of naturally occurring chlamydiosis in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Veterinary Pathology* 21, 28-32.
- Hued, A. C., Oberhofer, S., Bistoni, M.A. (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, 107-117.
- IUCN (2016). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-1. <www.iucnredlist.org>. Accedido el 7 de julio de 2016.
- Iwade, R., Maruo, K., Okada, G. & Nakamura, M. (2008). Elevated expression of P450c17 (CYP17) during testicular formation in the frog. *General and comparative endocrinology* 155, 79-87.
- Jamieson, B.G.M. (Ed.). (2003). Reproductive biology and phylogeny of anura. Science Publishers. 452 pp.
- Janiot, L.J.R., Janiot, O.E. & Roses, O.E. (1992). Distribución de pesticidas clorados entre agua y material en suspensión en el Río de la Plata (No. 504.42 JOR). Comisión Oceanográfica Intergubernamental Unesco. p. 101-108.
- 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, 817-826.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E. S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S. & Pokethitoyook, P. (2003). Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology*, 18, 260-267.

- Jofré, M.B., Antón, R.I. & Caviedes-Vidal, E. (2012). Lead and cadmium accumulation in anuran amphibians of a permanent water body in arid Midwestern Argentina. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 2889-2897.
- Jones, D. K., Hammond, J. I. & Relyea, R. A. (2010). Roundup® and amphibians: The importance of concentration, application time, and stratification. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2016-2025.
- 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, 446-454.
- Josende, M.E., Tozetti, A.M., Alalan, M.T., Mathies Filho, V., da Silva Ximenez, S., da Silva Júnior, F.M.R. & Martins, S.E. (2015). Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. *Ecological Indicators* 49, 83-87.
- Jung, R.E. & 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, 2171-2183.
- Junges, C. M., Vidal, E. E., Attademo, A. M., Mariani, M. L., Cardell, L., Negro, A. C., Cassano, A., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C. & Zalazar, C. S. (2013). Effectiveness evaluation of glyphosate oxidation employing the H₂O₂/UVC process: Toxicity assays with *Vibrio fischeri* and *Rhinella arenarum* tadpoles. *Journal of Environmental Science and Health B* 48, 163-170.
- Kehr, A.I. (1987). Crecimiento individual de larvas de *Hyla pulchella pulchella* y *Bufo fernandezae* en condiciones controladas de coexistencia y densidad (Amphibia: anura). *Cuadernos de Herpetología* 3, 1-6.
- Kehr, A.I. (1989). Factores dependientes de la densidad y su influencia sobre el crecimiento individual de los estados larvales de *Hyla pulchella pulchella* (Amphibia: Anura). *Limnobiós* 2, 757-761.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., & Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351, 117.
- Kouba, A. J., Vance, C. K., Milam, C. & Carr, M. (2012). A comparison of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone releasing hormone on the induction of spermiation and amplexus in the American toad (*Anaxyrus americanus*). *Reproductive Biology and Endocrinology* 10, 1.
- Kupferberg, S. J. (1997). The role of larval diet in anuran metamorphosis. *American Zoologist*, 37, 146-159.
- Lajmanovich, R. C. (1994). Contribución al conocimiento de la alimentación de larvas de la rana criolla *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia, Leptodactylidae) en el Paraná medio, Argentina. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 29, 55-61.

- Lajmanovich, R. C. (1996). Dinámica trófica de juveniles de *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae), en una isla del Paraná, Santa Fe, Argentina. Cuadernos de Herpetología 10, 1-2.
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Junges, C. M. & Cabagna, M. C. (2011). Toxicity of Four Herbicide Formulations with Glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) Tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase Inhibitors. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 60, 681-689.
- Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Cabagna-Zenklusen, M. C. & Basso, A. (2013). Individual and Mixture Toxicity of Commercial Formulations Containing Glyphosate, Metsulfuron-Methyl, Bispyribac-Sodium, and Picloram on *Rhinella arenarum* Tadpoles. Water, Air & Soil Pollution 224, 1-13.
- Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Maglianesi, M., Marquez, V. E. & Beccaria, A. J. (2015). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in aqueous suspension on the South American common frog *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles. Environmental Research 136, 205-212
- Lajmanovich, R. C., Sandoval, M. T. & Peltzer, P. M. (2003). Induction of Mortality and Malformation in *Scinax nasicus* Tadpoles Exposed to Glyphosate Formulations. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 70, 612-618.
- Lambert, M. R., Stoler, A. B., Smylie, M. S., Relyea, R. A. & Skelly, D. K. (2016). Interactive effects of road salt and leaf litter on wood frog sex ratios and sexual size dimorphism. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 74, 141-146.
- Lañcôt, 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.
- Lañcôt, C., Robertson, C., Navarro-Martín, L., Edge, C., Melvin, S. D., Houlihan, J. & Trudeau, V. L. (2013). Effects of the glyphosate-based herbicide Roundup WeatherMax® on metamorphosis of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) in natural wetlands. Aquatic Toxicology 140-141, 48-57.
- Langlois, V. S., Carew, A. C., Pauli, B. D., Wade, M. G., Cooke, G. M. & Trudeau, V. L. (2010). Low levels of the herbicide atrazine alter sex ratios and reduce metamorphic success in *Rana pipiens* tadpoles raised in outdoor mesocosms. Environmental Health Perspectives 118(4), 552.
- Larsen, K., Najle, R., Lifschitz, A. & Virkel, G. (2012). Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. Environmental Toxicology and Pharmacology 34, 811-818.

- Laufer, G., Gobel, N., Mautone, J. M., Galán, M. & de Sá, R. O. (2014). First report of satellite males during breeding in *Leptodactylus latrans* (Amphibia, Anura). *Cuadernos de Herpetología* 28, 37-38.
- Laufer, G. & Maneyro, R. (2008). Experimental test of intraspecific competition mechanisms among tadpoles of *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). *Zoological Science* 25, 286-290.
- Lavilla, E. O. (2001). Amenazas, declinaciones poblacionales y extinciones en anfibios argentinos. *Cuadernos de Herpetología* 15, 59-82.
- Lavilla, E. O. & Heatwole, H. (2010). Status of amphibian conservation and decline in Argentina. *Amphibian Biology* 9, 30-78.
- Lavilla, E. O. & Rouges, M. (1992). Reproducción y desarrollo de anuros argentinos. *Asociación Herpetológica Argentina Serie de Divulgación* 5, 66.
- Leguizamón, A. (2014). Modifying Argentina: GM soy and socio-environmental change. *Geoforum* 53, 149-160.
- Lenkowski, J. R., Sanchez-Bravo, G. & McLaughlin, K. A. (2010). Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. *Journal of Environmental Sciences* 22, 1305-1308.
- Lescano, J. N., Longo, S. & Robledo, G. (2013). Chytridiomycosis in endemic amphibians of the mountain tops of the Córdoba and San Luis ranges, Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 102, 249-254.
- Levy, G., Lutz, I., Krüger, A. & Kloas, W. (2004). Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environmental Research* 94, 102-111.
- Li, H., Wei, Y., Lydy, M. J. & You, J. (2014). Inter-compartmental transport of organophosphate and pyrethroid pesticides in South China: implications for a regional risk assessment. *Environmental pollution* 190, 19-26.
- Licht, P. (1979). Reproductive endocrinology of reptiles and amphibians: gonadotropins. *Annual Review of Physiology* 41, 337-351.
- Licht, P. & Porter, D. A. (1987). Role of gonadotropin-releasing hormone in regulation of gonadotropin secretion from amphibian and reptilian pituitaries. In *Hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles* (pp. 61-85). Springer US.
- Licht, P., McCreery, B. R., Barnes, R. & Pang, R. (1983). Seasonal and stress related changes in plasma gonadotropins, sex steroids, and corticosterone in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *General and Comparative Endocrinology* 50, 124-145.
- Liu, P. Y., Meng, T., Li, Y. Y., Cai, M., Li, X. H., Chen, J. & Qin, Z. F. (2017). Tetrabromoethylcyclohexane affects gonadal differentiation and development in the frog *Pelophylax nigromaculatus*. *Aquatic Toxicology* 192, 40-47.

- López, S., Aiassa, D., Benítez-Leite, S., Lajmanovich, R., Mañas, F., Poletta, G., Sánchez, N., Simoniello, M. F. & Carrasco, A. E. (2012). Pesticides Used in South American GMO-Based Agriculture: A Review of Their Effects on Humans and Animal Models. In *Advances in Molecular Toxicology*, ed. J. C. Fishbein and J. M. Heilman. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. pp. 41-75.
- Loumbourdis, N. S. & Vogiatzis, A. K. (2002). Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 53, 52-58.
- Luco, J. M., Aguilar, E. G., Silva, P. G. & Baudino, O. M. (1992). Determination of Organochloride Pesticides in Waters of the Province of San Luis (Argentina). *Acta Farmaceutica Bonaerense* 11, 121-121.
- Lüddecke, H. (2002). Variation and trade-off in reproductive output of the Andean frog *Hyla labialis*. *Oecologia* 130, 403-410.
- Lupi, L., Miglioranza, K. S., Aparicio, V. C., Marino, D., Bedmar, F. & Wunderlin, D. A. (2015). Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Science of the Total Environment* 536, 687-694.
- Mac Loughlin, T. M., Peluso, L. & Marino, D. J. (2017). Pesticide impact study in the peri-urban horticultural area of Gran La Plata, Argentina. *Science of the Total Environment* 598, 572-580.
- Maitra, S., Sahu, R., Trehan, N., Garg, S. K., & Nath, P. (2007). Circannual variation in plasma vitellogenin and gonadotropin II levels in relation to annual ovarian cycle in female mrigal, *Cirrhinus mrigala*. *Aquaculture* 265, 370-384.
- Malatesta, M., Boraldi, F., Annovi, G., Baldelli, B., Battistelli, S., Biggiogera, M. & Quaglino, D. (2008). A long-term study on female mice fed on a genetically modified soybean: effects on liver ageing. *Histochemistry and Cell Biology* 130, 967-977.
- Maneyro, R., Naya, D. E., Rosa, I. D., Canavero, A. & Camargo, A. (2004). Diet of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura, Leptodactylidae) in Uruguay. *Iheringia. Série Zoologia* 94, 57-61.
- Mann, R. M. & Bidwell, J. R. (1999). The Toxicity of Glyphosate and Several Glyphosate Formulations to Four Species of Southwestern Australian Frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36, 193-199.
- 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, 2903-2927.
- Marino, D. & Ronco, A. (2005). Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75, 820-826.
- Martínez, I., Álvarez, R. & Herráez, M. (1996). Growth and metamorphosis of *Rana perezi* in culture: effects of larval density. *Aquaculture* 142, 173-170.

Maruo, K., Suda, M., Yokoyama, S., Oshima, Y. & Nakamura, M. (2008). Steroidogenic gene expression during sex determination in the frog *Rana rugosa*. *General and Comparative Endocrinology* 158, 87-94.

McDiarmid, R. W. & Altig, R. (1999). *Tadpoles: the biology of anuran larvae*. University of Chicago Press. 458 pp.

Menone, M. L., De Moreno, J. A., Moreno, V. J., Lanfranchi, A. L., Metcalfe, T. L. & Metcalfe, C. D. (2001). Organochlorine pesticides and PCBs in a southern Atlantic coastal lagoon watershed, Argentina. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40, 355-362.

Merchant-Larios, H., & Villalpando, I. (1981). Ultrastructural events during early gonadal development in *Rana pipiens* and *Xenopus laevis*. *The Anatomical Record* 199, 349-360.

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: U.S. Geological Survey Techniques and Methods. Techniques and Methods 5-A10. U.S. Geological Survey. Virginia, USA.

Miglioranza, K. S. B., de Moreno, J. A., Moreno, V. J., Osterrieth, M. L. & Escalante, A. H. (1999). Fate of organochlorine pesticides in soils and terrestrial biota of "Los Padres" pond watershed, Argentina. *Environmental Pollution* 105, 91-99.

Miglioranza, K. S., Aizpún de Moreno, J. E. & Moreno, V. J. (2003). Dynamics of organochlorine pesticides in soils from a southeastern region of Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 712-717.

Miglioranza, K. S., de Moreno, J. E. & Moreno, V. J. (2004). Organochlorine pesticides sequestered in the aquatic macrophyte *Schoenoplectus californicus* (CA Meyer) Sojak from a shallow lake in Argentina. *Water Research* 38, 1765-1772.

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, 562-569.

Millitelo, M., Bach, N., Pérez-Iglesias, J. M. *Lithobates catesbeianus* (American Bullfrog). *Herpetological Review*, Geographic distribution 48, 807.

Miura, I. (2017). Sex Determination and Sex Chromosomes in Amphibia. *Sexual Development* En prensa. doi: 10.1159/000485270.

Montealegre-Delgado, X.K., Avendaño-Casadiago, K. & Bernal, M.H. (2013). Efecto del tamaño del hábitat en la supervivencia, desarrollo y crecimiento en renacuajos de *Engystomops pustulosus* (Anura: Leiuperidae) y *Rhinella humboldti* (Anura: Bufonidae). *Papéis Avulsos de Zoología* 53, 209-314.

Moore, L. J., Fuentes, L., Rodgers Jr., J. H., Bowerman, W. W., Yarrow, G. K., Chao, W. Y. & Bridges Jr., W. C. (2012). Relative toxicity of the components of the original

formulation of Roundup® to five North American anurans. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78, 128-133.

Morey, S. & Reznick, D. (2000). A comparative analysis of plasticity in larval development in three species of spadefoot toads. *Ecology* 81, 1736-1749.

Nace, G. W. (1977). Breeding amphibians in captivity. *International Zoo Yearbook* 17, 44-50.

Nace, G. W., Culley, D. D., Emmons, M. B., Gibbs, E. L., Hutchison, V. H. & McKinnell, R. G. (1974). *Amphibians: Guidelines for the Breeding, Care, and Management of Laboratory Animals*, Institute of Laboratory Animal Resources, NAS/NRC, Washington, DC.

Nakamura, M. (2009). Sex determination in amphibians. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20, 271-282.

Nakamura, M. (2010). The mechanism of sex determination in vertebrates—are sex steroids the key-factor?. *Journal of Experimental Zoology A* 313, 381-398.

Nakamura, M. (2013). Is a sex-determining gene (s) necessary for sex-determination in amphibians? Steroid hormones may be the key factor. *Sexual Development* 7, 104-114.

Natale, G. S. (2006). Ecotoxicological analysis of a community of anurans in the Pampa region: effect of Cr (VI) on embryos and larvae of different species of a taxo-community. PhD Dissertation, National University of La Plata.

Natale, G. S., Ammassari, L. L., Basso, N. G. & Ronco, A. E. (2006). Acute and chronic effects of Cr (VI) on *Hypsiboas pulchellus* embryos and tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms* 72, 261-267.

Natale, G.S.; Basso, N.E. & Ronco, A.E. (2000). Effect of Cr(VI) on early life stages of three species of Hylid frogs (Amphibia, Anura) from South America. *Environmental Toxicology* 15, 509-512.

National Research Council of the National Academies. (2011). *Guide for care and use of laboratory animals*. 8th Edition. The National Academies Press. Washington, DC, USA.

Navarro-Martín, L., Lanctôt, C., Jackman, P., Park, B. J., Doe, K., Pauli, B. D. & Trudeau, V. L. (2014). Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. I: Chronic laboratory exposures to VisionMax®. *Aquatic Toxicology* 154, 278-290.

Navarro-Martín, L., Velasco-Santamaría, Y. M., Duarte-Guterman, P., Robertson, C., Lanctôt, C., Pauli, B. & Trudeau, V. L. (2012). Sexing frogs by real-time PCR: using aromatase (cyp19) as an early ovarian differentiation marker. *Sexual Development* 6, 303-315.

Nešković, N. K., Poleksić, V., Elezović, I., Karan, V. & Budimir, M. (1996). Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56, 295-302.

Newman, M. C. (2015). Fundamentals of ecotoxicology. The science of pollution. 4th Edition. CRC Press. Taylor & Francis group. Florida, USA.

Newman, M.C. & Unger, M.A. (2003). Fundamentals of Ecotoxicology. CRC/Lewis Press. Boca Raton, Florida.

Norris, D. O. & Lopez, K. H. (2011). Hormones and reproduction of vertebrates. Vol. 2: Amphibians. 240 pp.

Obschatko, E. S. (1988). La transformación económica y tecnológica de la agricultura pampeana 1950-1984 (Nº. E14 O14t). Ediciones Culturales.

Othman, M. S., Khonsue, W., Kitana, J., Thirakhupt, K., Robson, M. G. & Kitana, N. (2016). Morphometric and gravimetric indices of two populations of rice frog (*Fejervarya limnocharis*) naturally exposed to different environmental cadmium levels. Malaysian Journal of Health Sciences, 14, 57-64.

Ogielska, M. (2009). Reproduction of amphibians. Science Publishers. 422p.

Ogielska, M. & Kotusz, A. (2004). Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anuran amphibians. Journal of Morphology 259, 41-54.

Ogielska, M., Rozenblut, B., Augustyńska, R., & Kotusz, A. (2010). Degeneration of germ line cells in amphibian ovary. Acta Zoologica 91, 319-327.

Ogielska, M. & Wagner, E. (1990). Oogenesis and development of the ovary in European green frog, *Rana ridibunda* (Pallas). I, Tadpole stages until metamorphosis. Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere 120, 211-221.

Oka, T., Tooi, O., Mitsui, N., Miyahara, M., Ohnishi, Y., Takase, M., Kashiwagi, A., Shinkai, T., Santo, N. & Iguchi, T. (2008). Effect of atrazine on metamorphosis and sexual differentiation in *Xenopus laevis*. Aquatic Toxicology 87, 215-226.

Okada, E., Yoshimoto, S., Ikeda, N., Kanda, H., Tamura, K., Shiba, T., Takamatsu, N. & Ito, M. (2009). *Xenopus* W-linked DM-W induces Foxl2 and Cyp19 expression during ovary formation. Sexual Development 3, 38-42.

Olmstead, A. W., Kosian, P. A., Korte, J. J., Holcombe, G. W., Woodis, K. K. & Degitz, S. J. (2009). Sex reversal of the amphibian, *Xenopus tropicalis*, following larval exposure to an aromatase inhibitor. Aquatic Toxicology 91, 143-150.

Orton, F. & Routledge, E. (2011). Agricultural intensity in ovo affects growth, metamorphic development and sexual differentiation in the Common toad (*Bufo bufo*). Ecotoxicology 20, 901-911.

Orton, F. & Tyler, C. R. (2015). Do hormone-modulating chemicals impact on reproduction and development of wild amphibians?. Biological Reviews 90, 1100-1117.

Oshima, Y., Naruse, K., Nakamura, Y. & Nakamura, M. (2009). Sox3: a transcription factor for Cyp19 expression in the frog *Rana rugosa*. Gene 445, 38-48.

- Oshima, Y., Uno, Y., Matsuda, Y., Kobayashi, T. & Nakamura, M. (2008). Molecular cloning and gene expression of Foxl2 in the frog *Rana rugosa*. *General and Comparative Endocrinology* 159, 170-177.
- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S. L. & Carrasco, A. E. (2010). Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical Research in Toxicology* 23, 1586-1595.
- Paruelo, J. M., Guerschman, J. P., Piñeiro, G., Jobbagy, E. G., Verón, S. R., Baldi, G. & Baeza, S. (2006). Cambios en el uso de la tierra en Argentina y Uruguay: marcos conceptuales para su análisis. *Agrociencia* 10, 47-61.
- Paunescu, A., Ponopal, C. M., Drghici, O. & Marinescu, A. G. (2010). Liver histopathologic alterations in the frog *Rana (Pelophylax) ridibunda* induce by the action of Reldan 40EC insecticide. *Annals of Oradea University* 17, 166-169.
- Pelegrín, E., Fraga, I., Alvarez, S. & Galindo, J. (2004). Efecto de diferentes niveles de proteína en la dieta de renacuajos de Rana Toro (*Rana catesbeiana*). Comunicación científica del III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, 557-565. <http://www.civa2004.org>
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., Repetti, M. R., Sigríst, M.E. & Beldoménico, H. (2013). Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98, 142-151.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Sanchez, L. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Bionda, C. L., Martino, A. & Basso, A. (2011). Morphological abnormalities in amphibian populations. *Herpetological Conservation and Biology* 6, 432-442.
- Pengue, W. (2005). Agricultura industrial y agricultura familiar en el Mercosur: el pez grande se come al chico...siempre?. *Le Monde Diplomatique*, Edición Cono Sur, 71, 7-9.
- Pengue, W. A. (2002). Aspectos tecnológicos, ambientales y socioeconómicos de la agricultura pampeana durante la última década: Impactos, resultados y consecuencias. Documento presentado en Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. 9 pp.
- Penkala, J. E. (1978). Some environmental and endocrine factors regulating ovarian cycling in *Rana catesbeiana*. M.S. Tesis, Louisiana State University. 94 pp.
- Pereira, M. M., Ribeiro Filho, O. P., Zanuncio, J. C., Troni, A. R., Navarro, R. D. & Takamura, A. E. (2013). Buserelin acetate-induced spermiation in *Leptodactylus ocellatus* and evaluation of semen characteristics. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 35, 1-7.
- Pereyra, M. O., Baldo, J. D. & Krauczuk, E. R. (2006). La "rana toro" en la selva atlántica interior Argentina: un nuevo problema de conservación. *Cuadernos de Herpetología* 20, 37-40.

- Pérez-Iglesias, J. M., Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., de Oliveira, C. & Natale, G.S. (2016). Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 9852-9861.
- Perotti, M. G. (1997). Modos reproductivos y variables reproductivas cuantitativas de un ensamble de anuros. *Revista Chilena de Historia Natural* 70, 277-280.
- 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, 61-66.
- Pettersson, I. & Berg, C. (2007). Environmentally relevant concentrations of ethynylestradiol cause female-biased sex ratios in *Xenopus tropicalis* and *Rana temporaria*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1005-1009.
- Pettersson, I., Arukwe, A., Lundstedt-Enkel, K., Mortensen, A. S., & Berg, C. (2006). Persistent sex-reversal and oviducal agenesis in adult *Xenopus (Silurana) tropicalis* frogs following larval exposure to the environmental pollutant ethynylestradiol. *Aquatic Toxicology*, 79(4), 356-365.
- Pinto-Erazo, M. A., Goldberg, J. & Jerez, A. (2016). Gonadal development in the Neotropical high Andean frog *Dendropsophus labialis* (Amphibia: Hylidae). *Cuadernos de Herpetología* 30, 57-68.
- Piprek, R. P., Pecio, A., Laskowska-Kaszub, K., Kubiak, J. Z. & Szymura, J. M. (2013). Sexual dimorphism of AMH, DMRT1 and RSPO1 localization in the developing gonads of six anuran species. *International Journal of Developmental Biology* 57, 891-895.
- Phuge, S. K. & Gramapurohit, N. P. (2013). Gonadal sex differentiation, development up to sexual maturity and steroidogenesis in the skipper frog, *Euphlyctis cyanophlyctis*. *General and Comparative Endocrinology* 181, 65-71.
- Prado, C. P. A. & Haddad, C. F. (2003). Testes size in leptodactylid frogs and occurrence of multimale spawning in the genus *Leptodactylus* in Brazil. *Journal of Herpetology* 37, 354-362.
- Primost, J. (2013). Study of environmental levels of glyphosate and AMPA in a model of intensive agriculture area around Urdirrain, Entre Rios. Graduate Dissertation, National University of La Plata.
- Primost, J. E., Marino, D. J., Aparicio, V. C., Costa, J. L. & Carriquiriborde, P. (2017). Glyphosate and AMPA, “pseudo-persistent” pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environmental Pollution* 229, 771-779.
- Puglis, H. J. & Boone, M. D. (2011). Effects of technical-grade active ingredient vs. commercial formulation of seven pesticides in the presence or absence of UV radiation on

survival of green frog tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 145-155.

Rabb, G. B. (1990). Declining amphibian populations. *Species* 13, 33-34.

Reboratti, C. (2010). Un mar de soja: la nueva agricultura en Argentina y sus consecuencias. *Revista de Geografía Norte Grande* 45, 63-76.

Relyea, R. A. (2004). Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1737-1742.

Relyea, R. A. (2012). New effects of Roundup on amphibians: Predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. *Ecological Applications* 22, 634-647.

Relyea, R. A. & Jones, D. K. (2009). The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2004-2008.

Rengel, D. & Pisanó, A. (1991). The arsenic action during the *Bufo arenarum* gonad development (Anura: Bufonidae). *Cuadernos de Herpetología* 6, 7-11.

Rengel, D., Pisanó, A. & Lavilla, E. O. (1995). Diferenciación sexual de *Phyllomedusa boliviana* (Anura: Hylidae). *Cuadernos de Herpetología* 9, 15-20.

Rengel, D., Pisanó, A. & Montero, R. (1991). La posición de *Pleurodema borellii* en las razas sexuales (Anura: Leptodactylidae). *Cuadernos de Herpetología* 6, 1-6.

Rezende dos Santos, A. P., Rocha, T. L., Borges, C. L., Bailão, A. M., de Almeida Soares, C. M. & de Sabóia-Morais, S. M. T. (2017). A glyphosate-based herbicide induces histomorphological and protein expression changes in the liver of the female guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere* 168, 933-943.

Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., & Seralini, G. E. (2005). Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental health perspectives* 113, 716.

Rissoli, R. Z., Abdalla, F. C., Costa, M. J., Rantin, F. T., McKenzie, D. J. & Kalinin, A. L. (2016). Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original® and Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. *Chemosphere* 156, 37-44.

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, 735-742.

Rodríguez, C. R. M. (2004). Reproducción de *Pleurodema brachyops* (Anura: Leptodactylidae) en los llanos del Estado Apure, Venezuela. *Memoria de la Fundación La Salle Ciencias Naturales* 2002, 117-125.

Ronco, A., Díaz Báez M. C. & Pica Granados Y. (2004). Conceptos generales. En: Castillo Morales G. (Ed.) *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas:*

estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, 17-22 pp.

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, 1-13.

Rovedatti, M. G., Castañé, P. M., Topalián, M. L. & Salibián, A. (2001). Monitoring of organochlorine and organophosphorus pesticides in the water of the Reconquista River (Buenos Aires, Argentina). *Water Research* 35, 3457-3461.

Rowe C. L., Hopkins W. A. & Congdon J. D. (2001). Integrating individual-based indices of contaminant effects. How multiple sublethal effects may ultimately reduce amphibian recruitment from a contaminated breeding site. *The Scientific World* 1, 703-712.

Rowe C. L., Kinney O. M., Fiori A. P. & Congdon J. D. (1996). Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. *Freshwater Biology* 36, 723-730.

Rugh, R. (1962). *Experimental embryology: techniques and procedures*. Burgess Pub. Co. 501p.

Riuz De Arcaute, C., Salgado Costa, C., Demetrio, P. M., Natale, G. S. & Ronco, A. E. (2012). Influence of existing site contamination on sensitivity of *Rhinella fernandezae* (Anura, Bufonidae) tadpoles to Lorsban® 48E formulation of chlorpyrifos. *Ecotoxicology* 21, 2338-2348.

Sanchez, L. C., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Manzano, A. S., Junges, C. M. & Attademo, A. M. (2014). First evidence of the effects of agricultural activities on gonadal form and function in *Rhinella fernandezae* and *Dendropsophus sanborni* (Amphibia: Anura) from Entre Rios Province, Argentina. *Acta Herpetologica* 9, 75-88.

Säfholm, M., Jansson, E., Fick, J. & Berg, C. (2015). Mixture effects of levonorgestrel and ethinylestradiol: Estrogenic biomarkers and hormone receptor mRNA expression during sexual programming. *Aquatic Toxicology* 161, 146-153.

SAGyP (2017). Estimaciones Agrícolas. Datos de la Dirección de Información Agrícola y Forestal. Secretaria de Agricultura Ganaderia y Pesca. <http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/>

Saidapur, S. K., Gramapurohit, N. P. & Shanbhag, B. A. (2001). Effect of sex steroids on gonadal differentiation and sex reversal in the frog, *Rana curtipes*. *General and Comparative Endocrinology* 124, 115-123.

Sakurai, N., Maruo, K., Haraguchi, S., Uno, Y., Oshima, Y., Tsutsui, K., Matsuda, Y., Do Rego, J-L., Pelletier, G., Vaudry, H. & Nakamura, M. (2008). Immunohistochemical detection and biological activities of CYP17 (P450c17) in the indifferent gonad of the frog *Rana rugosa*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 112, 5-12.

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. Universidad Nacional de La Plata, SEDICI, 243 <http://hdl.handle.net/10915/52069>.

Salgado Costa, C., Ronco, A.E., Trudeau, V.L., Marino, D. & Natale, G.S. (2018). Tadpoles of the horned frog *Ceratophrys ornata* exhibit high sensitivity to chlorpyrifos for conventional ecotoxicological and novel bioacoustic variables. *Environmental Pollution* 235, 938-947.

Sanabria, E. A., Debandi, G., Quiroga, L. B., Martínez, F. & Corbalán, V. (2011). First record of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) in Mendoza province, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 25, 55-58.

Sanabria, E. A., Quiroga, L. B. & Acosta, J. C. (2005). Dieta de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Anura: Leptodactylidae) en un humedal del oeste de Argentina. *Revista Peruana de Biología* 12, 473-477.

Sanchez, L. C., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Manzano, A. S., Junges, C. M. & Attademo, A. M. (2014). First evidence of the effects of agricultural activities on gonadal form and function in *Rhinella fernandezae* and *Dendropsophus sanborni* (Amphibia: Anura) from Entre Rios Province, Argentina. *Acta Herpetologica* 9, 75-88.

Sargent, M. G., & Mohun, T. J. (2005). Cryopreservation of sperm of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Genesis*, 41(1), 41-46.

Sarre, S. D., Ezaz, T. & Georges, A. (2011). Transitions between sex-determining systems in reptiles and amphibians. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 12, 391-406.

Silva, J. P., da Silva, D. C., Melo, F. T., Giese, E. G., Furtado, A. P. & Santos, J. N. (2013). Liver histopathology in the cane toad, *Rhinella marina* (Amphibia: Bufonidae), induced by *Ortleppascaris* sp. larvae (Nematoda: Ascarididae). *The Journal of Parasitology* 99, 250-256.

Schaefer, E. F., Hamann, M. I., Kehr, A. I., González, C. E. & Duré, M. I. (2006). Trophic, reproductive and parasitological aspects of the ecology of *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) in Argentina. *The Herpetological Journal* 16, 387-394.

Schaefer, E. F. & Kehr, A. I. (2010). Comportamiento reproductivo de *Physalaemus albonotatus* (Steindachner, 1864) (Anura, Leiuperidae) en el nordeste argentino. *Revista Española de Herpetología* 24, 27-39.

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, 1419-1423.

Semlitsch, R.D. (1993). Adaptive genetic variation in growth and development of tadpoles of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *Evolution* 47, 1805-1818.

- Shiogiri, N. S., Paulino, M. G., Carraschi, S. P., Baraldi, F. G., da Cruz, C. & Fernandes, M. N. (2012). Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34, 388-396.
- Shugart, L. R., McCarthy, J. F. & Halbrook, R. S. (1992). Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Analysis* 12, 353-360.
- Shibata, K., Takase, M. & Nakamura, M. (2002). The Dmrt1 expression in sex-reversed gonads of amphibians. *General and Comparative Endocrinology* 127, 232-241.
- Sichel, G., Scalia, M. & Corsaro, C. (2002). Amphibia kupffer cells. *Microscopy Research and Technique* 57, 477-490.
- Smith, D.C. (1987). Adult recruitment in chorus frogs: Effects of size and date at metamorphosis. *Ecology* 68, 344-350.
- 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* 67:483-488.
- Smith-Gill, S. J. & Berven, K. A. (1979). Predicting amphibian metamorphosis. *American Naturalist* 113, 563-585.
- Solé, M., Dias, I. R., Rodrigues, E. A., Marciano-Jr, E., Branco, S. M., Cavalcante, K. P. & Rödder, D. (2009). Diet of *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) from a cacao plantation in southern Bahia, Brazil. *Herpetology Notes* 2, 9-15.
- Sparling, D.W. & Fellers, G.M. (2009). Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 1696-1703
- Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A. & Krest, S. (2010). *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles, Second Edition*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry Press. Florida: USA. 903 pp.
- Stauffer, H.P. & Semlitsch R.D. (1993). Effects of visual, chemical and tactile cues of fish on the behavioural responses of tadpoles. *Animal Behaviour* 46, 355-364.
- Stebbins, R.C. & Cohen, N.W. (1997). *A Natural History of Amphibians*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Steinel, N. C. & Bolnick, D. I. (2017). Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in Immunology* 8, 827.
- Stevenson, R. D. & Woods Jr, W. A. (2006). Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integrative and Comparative Biology* 46, 1169-1190.
- Strüssman, C., Ribeiro do Vale, M. B., Meneghini, M. H. & Magnusson, W. E. 1984. Diet and foraging mode of *Bufo marinus* and *Leptodactylus ocellatus*. *Journal of Herpetology* 18, 138-146.

- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L. & Waller, R. W. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306, 1783-1786.
- Suda, M., Uno, Y., Fujii, J., Matsuda, Y. & Nakamura, M. (2011). Isolation and characterization of the CYP17A1 gene and its processed pseudogene in *Rana rugosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 160, 54-61.
- Sugita, J., Takase, M. & Nakamura, M. (2001). Expression of Dax-1 during gonadal development of the frog. *Gene* 280, 67-74.
- Takase, M. (1998). Differences in genetic backgrounds affecting gonadal differentiation between two local populations of the Japanese wrinkled frog (*Rana rugosa*). *Anatomy and Embryology* 198, 141-148.
- Taylor, A.C. & Kollros, J. (1946). Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anatomical Records* 94, 7-23.
- Teixeira, R. L. & Vrcibradic, D. (2003). Diet of *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) from coastal lagoons of southeastern Brazil. *Cuadernos de Herpetologia* 17, 111-118.
- Tolledo J., Silva E. T., Nunes-de-Almeida C. H. L. & Toledo L. F. (2014). Anomalous tadpoles in a Brazilian oceanic archipelago: implications of oral anomalies on foraging behaviour, food intake and metamorphosis. *Herpetological Journal* 24, 237-243.
- Tompsett, A. R., Wiseman, S., Higley, E., Pryce, S., Chang, H., Giesy, J. P. & Hecker, M. (2012). Effects of 17 α -ethynylestradiol on sexual differentiation and development of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 156, 202-210.
- Trudeau, V. L., Somoza, G. M., Natale, G. S., Pauli, B., Wignall, J., Jackman, P., Doe, K. & Schueler, F. W. (2010). Hormonal induction of spawning in 4 species of frogs by coinjection with a gonadotropin-releasing hormone agonist and a dopamine antagonist. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8, 1.
- Truhaut, R. (1977). *Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1, 151-173.
- U.S. EPA. (1975). *Methods for Acute Toxicity Tests with Fish, Macroinvertebrates, and Amphibians*. USEPA 660/3-75-009. Ecological Research series, U.S. Environmental Protection Agency. Washington DC, USA, 62 pp.
- U.S. EPA. (1999). *EPA Probit Analysis Program Used for Calculating LC/EC Values*. Version 1.5. Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency. OHIO, USA.
- U.S. EPA. (2002a). *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. U.S. Environmental Protection Agency Washington DC. 335 pp.

U.S. EPA. (2002b). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to fresh water and marine organisms. USEPA 821-R-02-012. U.S. Environmental Protection Agency. Washington DC, USA. 266 pp.

U.S. EPA. (2011). Amphibian Metamorphosis Assay. OCSP Guideline 890.1100 Standard Evaluation Procedure (SEP), Endocrine Disruptor Screening Program. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC. 51 pp.

Úbeda, C. & Grigera, D. (2007). El grado de protección de los anfibios patagónicos de Argentina. *Ecología Austral* 17, 269-279.

Uren Webster, T. M., Laing, L. V., Florance, H. & Santos, E. M. (2014). Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology* 48, 1271-1279.

Uthpala, A. J., Rupika, S. R., Ayanthi, N. N. & Priyani, H. A. (2010). Toxicity of agrochemicals to common hourglass Tree frog (*Polypedates cruciger*) in acute and chronic exposure. *IJAB Online Issues* 12, 641-648.

Vaira, M., Akmentins, M., Attademo, M., Baldo, D., Barrasso, D. A., Barrionuevo, S., Basso, N., Blotto, B., Cairo, S., Cajade, R., Céspedes, J., Corbalán, V., Chilote, P., Duré, M., Falcione, C., Ferraro, D., Gutierrez, R., Ingaramo, M. del R., Junges, C., Lajmanovich, R., Lescano, J.N., Marangoni, F., Martinazzo, L., Marti, R., Moreno, L., Natale, G.S., Pérez Iglesias, J.M., Peltzer, P., Quiroga, L., Rosset, S., Sanabria, E., Sanchez, L., Schaefer, E., Úbeda, C. & Zaracho, V. (2012). Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26, 131-159.

Valetti, J.A., Grenat, P. R., Baraquet, M. & Ludovico Martino, A. (2014). Reproductive biology of *Pleurodema guayapae* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae). *Revista de Biología Tropical* 62, 184-193.

Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs Jr, D. R., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T. & Myers, J.P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews* 33, 378-455.

Vaz-Ferreira, R. & Gehrau, A. (1975). Comportamiento epimelético de la rana común *Leptodactylus ocellatus* (L.) (Amphibia, Leptodactylidae) I. Atención de la cría y actividades alimentarias y agresivas relacionadas. *Physis* 34, 1-14.

Venesky M. D., Rossa-Feres D. C., Nomura F., Vasconcellos de Andrade G., Leite Pezzuti T., Thiemi Tsutae de Sousa V., Anderson C. V. & Wassersug R. J. (2013). Comparative feeding kinematics of tropical hylid tadpoles. *The Journal of Experimental Biology* 216, 1928-1937.

Venesky M. D., Wassersug R. J. & Parris M. J. (2010a). How does a change in labial tooth row number affect feeding kinematics and foraging performance of a ranid tadpole (*Lithobates sphenoccephalus*)? *The Biological Bulletin* 218, 160-168.

- Venesky M. D., Wassersug R. J. & Parris M. J. (2010b). The impact of variation in labial tooth number on the feeding kinematics of tadpoles of southern leopard frog (*Lithobates sphenocephalus*). *Copeia* 3, 481-486.
- Villalba, A. (2009). Resistencia a herbicidas: Glifosato. *Ciencia, Docencia y Tecnología* 39, 169-186.
- Wallace, H., Badawy, G. M. I. & Wallace, B. M. N. (1999). Amphibian sex determination and sex reversal. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55, 901-909.
- Walsh, L. P., McCormick, C., Martin, C. & Stocco, D. M. (2000). Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environmental Health Perspectives* 108, 769-776.
- Waltz, E. C. (1982). Alternative mating tactics and the law of diminishing returns: the satellite threshold model. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 10, 75-83.
- Wassersug R. J. & Yamashita M. (2001). Plasticity and constraints on feeding kinematics in anuran larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 131, 183-195.
- Wells, K.D. (1977). Territoriality and male mating success in the green frog (*Rana clamitans*). *Ecology* 58, 750-762.
- Wells, K. D. (2007). *The ecology and behavior of amphibians*. University of Chicago Press. 1148 pp.
- Whitaker, B.R. 2001. Reproduction. In: Wright, K.M. & Whitaker, B.R., eds. *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Malabar FL: Krieger Publishing Company. 285-307 pp.
- Wilbur, H.M. & Collins, J.P. (1973). Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science* 182, 1305-1314.
- Williams, B.K. & 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, 819-827.
- Witschi, E. (1929). Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. I. Development and sexual differentiation of the gonads of *Rana sylvatica*. *Journal of Experimental Zoology* 52, 235-265.
- Witschi, E. (1957). The Inductor Theory of Sex Differentiation (With 2 Text-figures). *Journal of the Faculty of Science Hokkaido University Series VI. Zoology* 13, 428-439.
- Wojtaszek, B.F., Staznik, B., Chartrand, D.T., Stephenson, G.R. & Thompson, D.G. (2004). Effects of Vision® herbicide on mortality, avoidance response, and growth of amphibian larvae in two forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 832-842.
- Wolke, R. E. (1992). Piscine macrophage aggregates: a review. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 91-108.

- Wood, L. & 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, 667-676.
- Yadav, S.S., Giri, S., Singha, U., Boro, F. & Giri, A. (2013). Toxic and genotoxic effects of Roundup on tadpoles of the Indian skittering frog (*Euflyctis cyanophlyctis*) in the presence and absence of predator stress. *Aquatic Toxicology* 132-133, 1-8.
- Yoshimoto, S., Ikeda, N., Izutsu, Y., Shiba, T., Takamatsu, N. & Ito, M. (2010). Opposite roles of DMRT1 and its W-linked paralogue, DM-W, in sexual dimorphism of *Xenopus laevis*: implications of a ZZ/ZW-type sex-determining system. *Development* 137, 2519-2526.
- Yoshimoto, S. & Ito, M. (2011). A ZZ/ZW-type sex determination in *Xenopus laevis*. *The FEBS Journal* 278, 1020-1026.
- Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T., & Ito, M. (2008). A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 2469-2474.
- Young, B. E., Lips, K. R., Reaser, J. K., Ibáñez, R., Salas, A. W., Cedeño, J. R., Coloma, L. A., Ron, S., La Marca, E., Meyer, J. R., Muñoz, A., Bolaños, F., Chaves, G. & Muñoz, A. (2001). Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology* 15, 1213-1223.
- Young, B.E., Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A. & Boucher, T.M. (2004). *Disappearing Jewels: The Status of New World Amphibian*. Nature Serve. Virginia, USA.
- Yu, T.L., Han, Y.T. & Zhang, S.P. (2016). Plasticity in metamorphic traits of *Rana kukunoris* tadpoles: The interactive effects of food level and rearing temperature. *Russian Journal of Ecology* 47, 552-556.
- Zar, J.H. (2010). *Biostatistical Analysis*. Fifth edition. Ed. Pearson Education, Inc. Upper Saddle River, New Jersey. 760 pp.
- Zhang, D., Duarte-Guterman, P., Langlois, V.S. & Trudeau, V.L. (2010). Temporal expression and steroidal regulation of piRNA pathway genes (mael, piwi, vasa) during *Silurana (Xenopus) tropicalis* embryogenesis and early larval development. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 152, 202-206.
- Zieri, R., Franco-Belussi, L., de Souza Santos, L. R., Taboga, S. R. & de Oliveira, C. (2015). Sex hormones change visceral pigmentation in *Eupemphix nattereri* (Anura): effects in testicular melanocytes and hepatic melanomacrophages. *Animal Biology* 65, 21-32.
- Zina, J. (2006). Communal nests in *Physalaemus pustulosus* (Amphibia: Leptodactylidae): experimental evidence for female oviposition preferences and protection against desiccation. *Amphibia-Reptilia* 27, 148-150.

ANEXO I

Monitoreos y colecta de anfibios aprobada por la Dirección de Flora y Fauna, Ministerio de Asuntos Agrarios de la provincia de Buenos Aires (Expte. 22500-33442/16, Disposición N°54).

Durante las horas de luz se realizaron actividades asociadas con el relevo del área de estudio. Los muestreos exhaustivos se realizaron al atardecer hasta pasada la medianoche, abarcando el pico de actividad de la especie. También se tomaron datos de los cuerpos de agua (características morfológicas de los mismos y parámetros fisicoquímicos) y características del clima. La búsqueda de anfibios se realizó de manera aleatoria mediante caminatas por márgenes de cuerpos de agua y de caminos de rutas provinciales. La captura de huevos se realizó extrayendo porciones de aproximadamente 10-25% de los nidos de espuma. En el caso de las larvas, las mismas fueron colectadas mediante redes. Huevos y larvas recolectados, fueron transportados en bolsas de polietileno, o recipientes plásticos con tapa, conteniendo agua y aire del sitio de colecta, para asegurar su supervivencia. La colecta de ejemplares adultos se realizó de manera directa, facilitada en época de reproducción por la emisión del canto de los machos. Las parejas se capturaron manualmente y fueron transportadas vivas al laboratorio, en recipientes plásticos y/o bolsas de polietileno, en ambos casos conteniendo aire y agua del sitio de captura. Una vez transportados hacia el laboratorio, huevos, larvas y adultos fueron aclimatados y mantenidos bajo condiciones controladas (Temperatura = $25^{\circ}\text{C}\pm 1$, Fotoperíodo = 16:8; pH = 7,65-8,30, dureza 180-250g $\text{CO}_3\text{Ca}/\text{L}$, utilizando agua de red declorinada). Los huevos fueron contados y mantenidos en laboratorio bajo las condiciones previamente mencionadas y alimento *ad-libitum*, con el objetivo de hacer un seguimiento del desarrollo hasta la metamorfosis. Se seleccionaron larvas de todos los estadios, las cuales fueron fijadas en solución Bouin a 4°C por 24 horas, y conservadas en etanol 70%, para realizar cortes histológicos. Las larvas colectadas fueron utilizadas para la realización de ensayos ecotoxicológicos con herbicidas de interés regional. Las parejas de adultos transportadas al laboratorio, fueron inducidas para su reproducción con el método de inducción artificial de la reproducción AMPHIPLEX (Trudeau et al., 2010), el cual no provoca la muerte de los organismos parentales y presenta ventajas sobre las clásicas técnicas basadas en hormonas, ya que permite tanto obtener huevos fecundados en cualquier época del año como disminuir el estrés al inyectar ambos sexos al mismo tiempo;

asimismo posibilita la reproducción en laboratorio con los patrones propios de cada especie. La información biológica y fisicoquímica del sitio de colecta y aquella que surja durante la experimentación, fue asentada en planillas in situ y utilizada para la realización de una tesis de doctoral en la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP).

ANEXO II. Planillas de relevo en campo

PLANILLA CONDICIONES AMBIENTALES

Planilla N°

Lugar :Sector :

ATM: Temperatura atmosférica Hg: Tomada con termómetro de mercurio

SMN: tomada por el la estación meteorológica del Sistema Meteorológico Nacional.

FECHA	HORA	ULTIMA LLUVIA (días/hs)	TEMPERATURA (°C)				HUMEDAD	COND CLIMATICAS			
			ATM		AGUA	SUSTRATO		CIELO (Despejado/parc nublado/nubl)	TIEMPO (Seco/humedo/neblina/llovizna/lluvia)	VIENTO (Calmo/suave/ moderado/fuerte)	LUNA (Llena/ cres/ meng/ nueva)
			Hg	SMN	Hg	Hg					

PLANILLA DE RELEVOS VISUAL

Planilla N°

Fecha Lugar :Sector :Hora de iniciaciónHora de finalización
 Observador.....

Especie	<i>Microhabitat</i>			Actividad				Observaciones
	Sustrato	T° sustr.	Prof. (cm)	Amplexo	Canto	Errante	Aliment	
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								
<i>L. latrans</i>								

PLANILLA DE ATRIBUTOS EXTERNOS *in situ*

Planilla N°

Fecha Lugar: Sector:..... Observadores

DIO: Distancia Interocular DV: Diametro del vientre

ID	SEXO	PESO (gr)	LHC (mm)	DIO (mm)	DV (mm)	FOTO	OBSERVACIONES
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							

PLANILLA NIDOS DE ESPUMA

Planilla N° ...

Fecha Lugar: Observadores.....

Microhabitat (sustrato)

w: agua libre

v: vegetacion sobre el agua

s: suelo nundado

Espumon (forma)

c: circular

a: anular

m: amorfo

Rana

a: ausente

o: en orificio

f: fuera del nido

N°	Sector	Hora	Microhabitat			Nido de espuma								Rana	observaciones
			Prof	Sustrato	Muestra sustrato	Forma	Diametro mayor	Diametro menor	Con orificio	Diametro orificio	Colecta (si/no)	Volumen	N° de huevos/vol muestra		

PLANILLAS DE VARIABLES MORFOMETRICAS INT Y EXT *ex situ*

Planilla N°

ID: Número de identificación único. ER: Estado Reproductivo P: Peso LHC: Longitud Hocico-Cloaca
 DIOE: Distancia Inter-Ocular Externa DV: Diámetro del Vientre H: peso del Hígado G: peso de la Gónada
 CG: peso de los Cuerpos Grasos

Especie	Fecha	Procedencia	ID	Sexo	ER	P	LHC	DIOE	DV	H	G	CG	Foto	Observaciones
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														
<i>L. latrans</i>														

ANEXO III

Shulet® Carassius (Escamado):

Alimento completo balanceado para carassius y otros peces omnívoros.

Ingredientes: Harina de pescado, carne, cereales, hígado, soja y algas de mar. Germen de trigo, caseína, levadura en polvo, huevo en polvo, espinaca deshidratada y aceite de pescado con BHT. Colorantes aprobados. Vitaminas y minerales añadidos: Vitaminas A, D3 y E, Menadiona, Tiamina, Riboflavina, Piridoxina, Ácido Pantoténico, Biofina, Niacina, Ácido Fólico, Cianocobalamina y Ácido ascórbico. Selenio Iodo, Cobre, Zinc, Hierro, Manganeso y Cobalto.

Análisis Nutricional: Mínimo de proteína bruta: 40%. Mínimo de lípidos totales: 10%. Máximo de fibra cruda: 5%. Máximo de minerales totales: 10%. Máximo de humedad: 6%. Calcio: 1,9-3,2%. Fósforo: 1-1,7%.