Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Evaluación de la toxicidad de los contaminantes Cobre, Nonilfenol y Diazinón sobre embriones y larvas de Rhinella (Bufo) arenarum

Aronzon, Carolina Mariel

2013-03-18

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Aronzon, Carolina Mariel. (2013-03-18). Evaluación de la toxicidad de los contaminantes Cobre, Nonilfenol y Diazinón sobre embriones y larvas de Rhinella (Bufo) arenarum. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Aronzon, Carolina Mariel. "Evaluación de la toxicidad de los contaminantes Cobre, Nonilfenol y Diazinón sobre embriones y larvas de Rhinella (Bufo) arenarum". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-03-18.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Evaluación de la toxicidad de los contaminantes Cobre, Nonilfenol y Diazinón sobre embriones y larvas de *Rhinella (Bufo) arenarum*.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Carolina Mariel Aronzon

Director de tesis:	Dra. Cristina Perez-Coll.
Consejero de Estudios:	Dra. Paula Vissio.
Lugares de trabajo:	Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental-Universidad Nacional de General San Martín.
	Instituto de Ciencias Ambientales y Salud – Fundación PROSAMA

Buenos Aires, 2012

Resumen

Evaluación de la toxicidad de los contaminantes Cobre, Nonilfenol y Diazinón sobre embriones y larvas de *Rhinella (Bufo) arenarum*.

La exposición de *Rhinella arenarum* a Cobre, Nonilfenol y Diazinón causó importantes efectos tóxicos letales y subletales sobre las etapas tempranas de su ciclo de vida. El Cobre resultó el más tóxico: la CL50-168h para los embriones y larvas fue de 19,5 µg Cu^{2+}/L y 51 µg Cu^{2+}/L, respectivamente, y el Potencial Teratogénico fue de 2. En la evaluación de la susceptibilidad estadio-dependiente al Cobre los embriones en los estadios de blástula y gástrula mostraron la más alta resistencia al Cobre, mientras que los estadios organogénicos fueron los más susceptibles. La toxicidad del Cobre por exposición continua de larvas tempranas alcanzó su valor máximo durante las primeras 24 h. Se confirmó el carácter pro-oxidante del metal. En larvas tempranas la primera vía de defensa antioxidante es la Superóxido Dismutasa. Se encontraron diferencias en la susceptibilidad al Cobre en camadas provenientes de sitios con diverso grado de contaminación, lo que fue relacionado con los mecanismos de defensa antioxidantes. El Nonilfenol resultó la segunda sustancia más tóxica. La susceptibilidad de los organismos expuestos al Nonilfenol a partir del inicio del desarrollo embrionario y larval fue tiempo-dependiente, aunque el período larval resultó significativamente más sensible, así la CL50-168h para embriones y larvas fue de 0,96 mg Nonilfenol/L y 0,37 mg Nonilfenol/L, respectivamente. El Diazinón resultó el menos tóxico, sin embargo, el Potencial Teratogénico fue mayor a 2 y el plaguicida causó severos efectos neurotóxicos. La susceptibilidad de los organismos expuestos al Diazinón a partir del inicio del desarrollo embrionario y larval fue tiempo-dependiente, aunque el período larval resultó significativamente más sensible, así la CL50-168h para embriones y larvas fue de 20 mg Diazinón/L y 6,7 mg Diazinón/L, respectivamente. La incorporación del Diazinón resultó concentración-dependiente, disminuyendo con el tiempo de exposición, y estadio-dependiente, con un Factor de Bioconcentración de 107 en los estadios embrionarios. La toxicidad conjunta de las diferentes mezclas Cobre-Diazinón y Cobre-Nonilfenol tanto para los embriones como para las larvas resultaron en un patrón general de antagonismo. Las diferentes mezclas de Diazinón y Nonilfenol presentaron un comportamiento entre aditivo y sinérgico principalmente durante el período agudo.

Palabras Claves: Desarrollo Embrio- Larval, Anfibios, Cobre, Nonilfenol, Diazinón, Mezclas

Abstract

Embryo-Larval toxicity of pollutants, Copper, Nonylphenol and Dizinon on *Rhinella (Bufo) arenarum*.

The exposure to Copper, Nonylphenol and Diazinon on *Rhinella arenarum* caused important lethal and sublethal toxic effects on early life stages of the development. Copper was the most toxic, with a LC50-168h for embryos and larvae of 19.5 µgCu^{2+}/L and 51 µgCu^{2+}/L, respectively and the Teratogenic Potential was 2. In the stage-dependent evaluation to copper, embryos at blastula and gastrula stages were the most resistant to copper, whereas the organogenic period were the most susceptible. Toxicity of continuous exposure from larvae reached the maximal value at the first 24h. It was confirmed the pro-oxidant character of the metal. The fisrt antioxidant defense pathway in larvae was the Superoxide Dismutase. There were differences in the susceptibility to Copper in litters captured in sites with different degrees of pollution, this were related with antioxidant defenses. Nonylphenol was the second most toxic compound evaluated. The susceptibility of organisms exposed to Nonylphenol from the beginning of the embryonic development was time-dependent, although the larval period was significantly more sensitive, so the LC50-168h for embryos and larvae was 0.96 mg Nonilfenol/L and 0.37 mg Nonilfenol/L, respectively. Diazinon was the less toxic compound. However, the teratogenic potential was more than 2 and the pesticide caused severe neurotoxic effects. The susceptibility of organisms exposed to Diazinón from the beginning of the embryonic development was time-dependent, although the larval period was significantly more sensitive, so the LC50-168h for embryos and larvae of 20 mg Diazinón/L and 6.7 mg Diazinón/L, respectively. Diazinón uptake was concentration-dependent, decreasing with time of exposure, and stage-dependent, with a Bioconcentration Factor of 107 in embryonic stages.The joint toxicity of copper-diazinon and copper-nonylphenol both for embryos and larvae was a general pattern of antagonist. In the case of diazinon - nonylphenol mixture the behavior was between additive and synergistic, especially in the acute period.

Key words: Embryo-larval development; Amphibian, Copper, Nonylphenol; Diazinon, Mixtures

Agradecimientos

Quiero agradecer a todos aquellos que en mayor o menor medida, me ayudaron y acompañaron en este camino.

A Cristina, por sus aportes, por haberme abierto las puertas del laboratorio y guiarme en este proceso. Por apoyar mis iniciativas con libertad y entusiasmo.

Un especial agradecimiento a Ianina, Gabriela y Abelardo, no solo por sus aportes y por tener que aguantarme día a día, sino por su inmensa amistad, que alegró e hizo placentero cada día.

A María del Carmen, por su colaboración y paciencia. Por estar siempre dispuesta a ayudar.

A mis amigas, las que me dejó la carrera, Lau, Lau y Flora que a pesar de las distancias espaciotemporales, están siempre. Las quiero.

A mis amigas de la vida, Natali y Luciana, que junto a mis hermosos sobrinos, Florencia, Vicente y Lautaro, me acompañan tan especialmente en la vida.

A mi hermano, por los años transitados, por su compañía incondicional, porque a pesar de ser menor, es ejemplo. Por mi sobrina, Julieta, hermosa y buena. El primer Sol de la familia, que nos llena de tanta felicidad.

A mis viejos, Carlos y Alejandra, por su apoyo constante e incondicional, por haberme ayudado y enseñado a crecer. Por ser ejemplo de vida, que me guían.

A Pablo, porque es el mejor compañero, por estar, por apoyarme, por ayudarme, por su amor de cada día.

“A Pablo y Matheo, la luz de mi vida”.

Índice

Contenido

Resumen 2
Abstract 3
Agradecimientos 4
Dedicatoria 5
Índice 6
Glosario 12
Capítulo 1: Introducción general. 13
1.1.La contaminación ambiental 14
1.2.Toxicología ambiental. 15
1.3.Contaminación acuática 16
1.4.Ecotoxicología. 17
1.5.Bioensayos de toxicidad. 18
1.6.Especies utilizadas para bioensayos de toxicidad. 22
1.7.Los anfibios 23
*1.8.*Desarrollo embrionario y larval de *Rhinella arenarum*. 27
1.9.Utilización de los anfibios en bioensayos de toxicidad. 30
1.10.Objetivos generales. 34
Capítulo 2: Cobre 35
2.1. Objetivos e hipótesis. 36
2.1.1. Objetivos. 36
2.1.2. Hipótesis. 36
2.2. Introducción. 37
2.2.2. Conceptos generales del estrés oxidativo. 43
2.2.2.2. El estrés oxidativo en el desarrollo de los anfibios. 46
2.2.2.3. El cobre como generador de estrés oxidativo. 47
2.2.3. Evaluación de la sensibilidad de larvas de anfibios obtenidos de un ecosistema urbano contaminado. 49
2.3. Materiales y métodos 52
2.3.1 Obtención de material biológico 52
2.3.1.1 Obtención y selección de adultos. 52

2.3.1.2. Mantenimiento de adultos. 52
2.3.1.3.Ovulación y fecundación. 52
2.3.2. Criterio de aceptación del material biológico. 54
2.3.3. Protocolos experimentales 54
2.3.3.1. Exposición continua. 54
2.3.3.2. Exposición por 24 horas al cobre a partir de distintos estadios del desarrollo embrionario y larval. 56
2.3.4. Condiciones generales de los tratamientos. 56
2.3.5. Evaluación de los efectos teratogénicos. 57
2.3.6. Evaluación de la sensibilidad al cobre de larvas de anfibio obtenidas en ecosistemas urbanos contaminados. 58
2.3.7. Evaluación de parámetros relacionados con el estrés oxidativo. 61
2.3.7.1. Evaluación de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en diferentes estadios del desarrollo de *Rhinella arenarum*. 61
2.3.7.2. Evaluación de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en larvas de *Rhinella arenarum* en estadio de opérculo completo (E.25) expuestas a cobre en forma crónica. 61
2.3.7.3. Evaluación de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en larvas de anfibio obtenidas en ecosistemas urbanos contaminados. 62
2.3.8. Protocolos para las determinaciones de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo 62
2.3.8.1. Proteínas Totales 63
2.3.8.2. Sustancias Reactivas con el Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). 64
2.3.8.3. Actividad Catalasa. 65
2.3.8.4. Actividad Superóxido Dismutasa: 66
2.3.8.5. Actividad Glutation-S-Transferasa. 67
2.3.8.6. Glutation reducido (GSH). 68
2.3.9. Preparación de las soluciones. 69
2.3.10. Análisis de datos 69
2.4. Resultados 71
2.4.1. Determinación de la toxicidad del Cobre sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4) por 168h. 71
2.4.1.1 Efectos letales. 71
2.4.1.2 Efectos subletales 73
2.4.2. Determinación de la toxicidad del Cobre sobre larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) por 168h. 76

2.4.2.1. Efectos letales 76

2.4.3. Determinación de la toxicidad del Cobre sobre larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a partir del estadio de Esbozo de los Miembros Posteriores (E. 28) por 168h. 77

2.4.3.1 Efectos letales. 77

2.4.4. Determinación de la toxicidad del Cobre sobre *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4), hasta completar la metamorfosis (1128 h). ..78

2.4.5. Determinación de la toxicidad del Cobre sobre *Rhinella arenarum* expuestos por 24 horas a partir de distintos estadios del desarrollo embrionario y larval. 83

2.4.5.1. Efectos letales 83

2.4.5.2. Efectos subletales. 84

2.4.6. Sensibilidad de larvas de anfibios de un ecosistema urbano contaminado 88

2.4.6.1. Comparación de la susceptibilidad al cobre en larvas de *Rhinella arenarum* provenientes de distintos sitios. 88

2.4.6.2.Comparación de la susceptibilidad al Cobre de larvas de *Rhinella arenarum* y *Rhinella fernandezae* provenientes de distintos sitios urbanos contaminados. 89

2.4.7. Evaluación de parámetros relacionados con el estrés oxidativo, como consecuencia de la exposición a cobre. 90

2.4.7.1. Evaluación de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en diferentes estadios del desarrollo de *Rhinella arenarum*. 90

2.4.7.2. Evaluación de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en larvas de *Rhinella arenarum* en estadio de opérculo completo (E.25) expuestas a cobre en forma crónica. 92

2.4.7.3.Evaluación de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en larvas de anfibio obtenidas en ecosistemas urbanos contaminados. 96

2.5. Discusión 101

Capítulo 3: Nonilfenol 111

3.1. Objetivos e hipótesis. 112

3.1.1. Objetivos 112

3.1.2. Hipótesis. 112

3.2. Introducción 113

3.3. Materiales y métodos 118

3.3.1. Obtención de material biológico 118

3.3.2. Criterio de aceptación del material biológico. 118

3.3.3. Protocolos experimentales 118

3.3.3.1 Exposición continua. 118

3.3.4. Condiciones generales de los tratamientos 119

3.3.5. Evaluación de los efectos teratogénicos. 119

3.3.6.Preparación de las soluciones. 120

3.3.7.Análisis de datos 120

3.4. Resultados 121

3.4.1. Determinación de la toxicidad del Nonilfenol sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4) por 168h. 121

3.4.1.1.Efectos Letales. 121

3.4.1.2.Efectos subletales. 122

3.4.2.Determinación de la toxicidad del Nonilfenol en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a partir del estadio de Opérculo completo (E.25) por 168h. 125

3.4.2.1.Efectos Letales. 125

3.4.2.2.Efectos subletales 126

3.4.3.Comparación de la sensibilidad de los embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a dos alquilfenoles en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4) por 336h. 127

3.4.4.Comparación de la sensibilidad de larvas de *Rhinella arenarum* expuestos a dos alquilfenoles en forma continua a partir del estadio Opérculo Completo (E.25) hasta completar la metamorfosis. 130

3.5.Discusión 134

Capítulo 4: Diazinón 139

4.1. Objetivos e hipótesis. 140

4.1.1. Objetivos 140

4.2. Introducción 141

4.3. Materiales y Método 150

4.3.1. Obtención de material biológico 150

4.3.2. Criterio de aceptación del material biológico. 150

4.3.3. Protocolos experimentales 150

4.3.3.1. Exposición continua. 151

4.3.3.2. Exposición por 24 horas al Diazinón a partir de distintos estadios del desarrollo embrionario y larval. 151

4.3.4. Condiciones generales de los tratamientos 151

4.3.5. Evaluación de los efectos teratogénicos. 152

4.3.6. Efectos sobre el comportamiento. 152

4.3.7. Evaluación del riesgo ambiental. 152

4.3.8. Incorporación del Diazinón. 153

4.3.8.1. Ensayos preliminares para la evaluación de la incorporación del Diazinón. 153

4.3.8.2. Ensayos definitivos para la evaluación de la incorporación del Diazinón. 153
4.3.8.2.1. Exposición continua desde el inicio del desarrollo embrionario. 153
4.3.8.2.2 Exposición continua desde el final del desarrollo embrionario. 154
4.3.8.3 Protocolo para la determinación de la incorporación del Diazinón. 154
4.3.9. Preparación de las soluciones. 155
4.3.10. Análisis de datos 155
4.4. Resultados 157
4.4.1 Determinación de la toxicidad del Diazinón sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4) por 168h 157
4.4.1.1. Efectos letales. 157
4.4.1.2. Efectos subletales. 158
4.4.2. Exposición por pulsos de 24 horas al Diazinón a partir de distintos estadios del desarrollo embrionario y larval. Seguimiento por 168 h. 161
4.4.3. Determinación de la toxicidad del Diazinón sobre larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) por 168h. 163
4.4.3.1. Efectos Letales 163
4.4.3.2. Efectos Subletales 164
4.4.4. Incorporación de Diazinón. 166
4.4.4.1. Ensayos preliminares: 166
4.4.4.2. Ensayos definitivos 168
4.4.4.2.1. Exposición continua desde el inicio del desarrollo embrionario. 168
Bioensayos de toxicidad con los embriones provenientes de la ovulación en la cual se analizó la incorporación de Diazinón. 168
Incorporación del Diazinón en embriones expuestos desde el inicio del desarrollo embrionario (E.4) por 504 h. Ensayo definitivo. 169
4.4.4.2.2 Exposición continua desde el inicio del desarrollo larval (E.25). 171
Bioensayos de toxicidad con los embriones provenientes de la ovulación en la cual se analizó la incorporación de Diazinón. 171
Incorporación de Diazinón en larvas tempranas expuestas desde el final del desarrollo embrionario (E.25) por 504h. 172
4.5Discusión 174
Capítulo 5: Toxicidad de las Mezclas. 182
5.1. Objetivos e hipótesis. 183
5.1.1. Objetivos 183
5.1.2. Hipótesis. 183
5.2. Introducción 184

5.3. Materiales y Métodos.....189
5.3.1. Obtención de material biológico.....189
5.3.2. Criterio de aceptación del material biológico.....189
5.3. 3.Protocolos experimentales.....189
5.3.3.1. Exposición continua.....189
5.3.4. Condiciones generales de los tratamientos.....190
5.3.4. Preparación de las soluciones.....190
5.3.5 Análisis de datos.....191
5.4. Resultados.....192
5.4.1. Determinación de la toxicidad conjunta de Cobre y Nonilfenol sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4) por 168h.....192
5.4.2. Determinación de la toxicidad conjunta de Cobre y Nonilfenol sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) por 168h.....196
5.4.3. Determinación de la toxicidad conjunta de Cobre y Diazinón sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4) por 168h.....200
5.4.4. Determinación de la toxicidad conjunta de Cobre y Diazinón sobre larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) por 168h.....203
5.4.5. Determinación de la toxicidad conjunta de Diazinón y Nonilfenol sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4) por 168h.....207
5.4.6. Determinación de la toxicidad conjunta de Diazinón y Nonilfenol sobre larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a partir del estadio de Opérculo completo (E.25) por 168h.....209
5.5.Discusión.....213
Conclusiones generales.....219
ANEXO.....225
Bibliografía.....233

Glosario

ANFITOX: Bioensayos de toxicidad estandarizado con embriones/larvas de anfibio.

CA: Sitio de muestreo aledaño al Canal Aliviador.

CAT: Catalasa.

CE50: Concentración que produce un efecto en el 50% de los individuos.

CL10: Concentración Letal para el 10% de los individuos.

CL50: Concentración Letal para el 50% de los individuos.

CL90: Concentración Letal para el 90% de los individuos.

Cu: Cobre.

Dz: Diazinón.

E: Estadio del desarrollo según tablas en ANEXO.

FBC: Factor de Bioconcentración.

GSH: Glutatión reducido.

GST: Glutatión-S-transferasa.

M: Magnificación

MEB: Microscopía Electrónica de Barrido.

NOEC: del inglés: No Observable Effect Concentration. Máxima concentración que no produce un efecto observable.

NP: Nonilfenol.

PE: Potencial Teratogénico.

PI: Sitio de muestreo aledaño al Parque Industrial de Tigre.

PMM: Peso Medio a la Metamorfosis. Promedio del peso del 50% de los primeros individuos metamorfoseados.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

RR: Sitio de muestreo aledaño al Río Reconquista Chico.

S.A.: Solución ANFITOX (control).

SOD: Superóxido Dismutasa.

TBARS: Sustancias Reactivas con el Ácido Tiobarbitúrico.

TMM: Tiempo medio a la metamorfosis. Promedio del tiempo del 50% de los primeros individuos metamorfoseados.

TOPs: Perfiles de isotoxicidad.

UT: Unidades de Toxicidad.

S: Índice de mezclas, sumatoria de las Unidades Tóxicas de las sustancias en las mezclas.

Capítulo 1:
Introducción general.

"La divinización del mercado, que compra cada vez menos y paga cada vez peor, permite atiborrar de mágicas chucherías a las grandes ciudades del sur del mundo, drogadas por la religión del consumo, mientras los campos se agotan, se pudren las aguas que los alimentan y una costra seca cubre los desiertos que antes fueron bosques".

Eduardo Galeano (Úselo y tírelo)

1.1. La contaminación ambiental

La contaminación ambiental se define como el efecto negativo o desequilibrio de un ecosistema, generado por un agente físico químico asociado a la actividad antrópica.

La toxicología y el reconocimiento de los efectos nocivos de ciertas sustancias se remontan a las más tempranas etapas de la humanidad, en las que se utilizaban venenos animales y vegetales, para la caza, la guerra y aún, el asesinato. Incluso desde la prehistoria, se observó la capacidad y necesidad de identificar ciertas plantas y hongos como nocivos o seguros. En la edad Moderna, Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim, mejor conocido como Paracelso (1493-1541) contribuyó con los corolarios que sentaron las bases de la toxicología, argumentando que la experimentación era esencial para el análisis de las respuestas del organismo a los productos químicos. Así, debía realizarse una distinción entre las propiedades terapéuticas y tóxicas de las sustancias químicas, que estas propiedades eventualmente, podían ser indistinguibles salvo por la dosis, y finalmente que se podía determinar el grado de especificidad de los productos químicos y su acción terapéutica o sus efectos tóxicos.

A partir del siglo XV, los riesgos laborales asociados a los metales comenzaron a ser reconocidos. En 1700, Ramazzini, ampliando el campo de estudio discutió los riesgos asociados a las actividades laborales de los trabajadores de las minas, imprentas, tejedores y alfareros. El desarrollo de la revolución industrial aumentó las enfermedades ocupacionales. En el siglo XIX, marcado por la revolución industrial, tiene su inicio la química orgánica. En 1825, se sintetizaron el fosgeno y el gas mostaza que luego se utilizaron en la Primera Guerra Mundial. Para 1880, se habían sintetizado más de 10.000 compuestos orgánicos. Sin embargo no fue sino hasta el fin de la Segunda Guerra Mundial coincidente con dos dramáticos episodios de intoxicación por contaminación con metales en Japón que estos temas fueron reconsiderados desde una visión ambiental. Estos hechos desterraron el paradigma de la dilución, que minimizaba la problemática de la contaminación alegando que la misma podía solucionarse con la dilución de los contaminantes. Así, este paradigma fue remplazado por el del "efecto boomerang", por el que se alertaba que "todo lo que se desecha puede volver y causar daño" (Newman 1998).

En los últimos tiempos, el crecimiento poblacional, la síntesis de nuevas moléculas, el aumento en el uso de productos y el tipo de sistemas productivos, así como la expansión de la barrera agropecuaria y la intensificación de la producción mediante el uso de agroquímicos incrementada por las posibilidades derivadas de la ingeniería genética, han acrecentado la contaminación ambienta en forma sustancial.

1.2. Toxicología ambiental.

Como consecuencia del cambio de paradigma y la necesidad de evaluar y dar respuestas a la contaminación ambiental surgieron la toxicología ambiental y la ecotoxicología. Si bien algunas definiciones de ecotoxicología parecieran excluir de la discusión al hombre, excepto como responsable de la contaminación, en la definición de Truhaut (1977) están incluidos los efectos sobre los humanos, y el concepto de ecotoxicología como rama de la toxicología que estudia los efectos tóxicos causados tanto por contaminantes naturales como sintéticos, sobre los componentes de los ecosistemas,

animales (incluyendo al hombre), vegetales y microbios, en un contexto integrado con el ambiente fisicoquímico.

1.3. Contaminación acuática

Desde el comienzo del último siglo, la contaminación de los ambientes acuáticos con una gran cantidad y diversidad de químicos, muchas veces con efectos no deseados en los ecosistemas ha alcanzado tanto la escala local, como regional y mundial (Schwarenbach *et al.* 2006). La contaminación del agua consiste en la incorporación de sustancias o materia indeseables o la inducción de condiciones que de modo directo o indirecto deterioran su calidad, entendiéndose la calidad como la aptitud para los usos que tenía originalmente, como soporte para la vida acuática, riego, consumo humano y recreación. La materia indeseable puede ser tanto compuestos inertes orgánicos o inorgánicos, como materia viva en el caso de microorganismos.

El aumento poblacional, la diversidad y complejidad de los procesos agrícolaganaderos e industriales, y la necesidad de producir en gran escala, han incrementado considerablemente la utilización del agua, que al ser reintegrada a los cuerpos receptores, puede estar alterada físico-química o microbiológicamente. Diversos contaminantes pueden alcanzar los cuerpos de agua por procesos de escorrentía, lixiviación, volatilización y precipitación, modificando las condiciones para los diferentes usos del agua. Las principales fuentes de contaminación pueden clasificarse en función de su uso en tres grandes clases, doméstica, la que contribuye con detergentes, insecticidas, jabones, grasas, materia orgánica, bacterias, virus y parásitos; industrial, con aporte de metales, detergentes, solventes, colorantes, ácidos, grasas, sales, pigmentos, y muchas otras sustancias químicas; minera, que conlleva una importante carga contaminante por el aporte de metales pesados y sustancias derivadas de los procesos de extracción; y agrícolaganadera, que en las últimas décadas, dada su expansión e intensificación, ha ganado un gran protagonismo, contribuyendo a la contaminación del agua con un amplio

espectro de insecticidas, plaguicidas, fertilizantes sales inorgánicas, minerales, hormonas, desechos de animales, etc.

1.4. Ecotoxicología.

El término "ecotoxicología" fue concebido por R. Truhaut (1977), y después por Butler (1978), quienes la definieron como una rama de la toxicología que estudia los efectos tóxicos de las sustancias naturales o artificiales en organismos vivos, sean animales o vegetales, terrestres o acuáticos, que constituyen las poblaciones y comunidades de los ecosistemas (Rand 1995).

La esencia de la ecotoxicología reside principalmente sobre dos áreas: el estudio del medio ambiente, con origen en la ecología, y el estudio de las interacciones y mecanismos de las sustancias tóxicas en los organismos vivos, o sea la toxicología. Si bien es una ciencia que deriva de distintas disciplinas, y puede producir confusión entre las escalas y las asociaciones estudiadas, Caswell en 1996 estableció que "…los procesos que ocurren en un nivel de organización de la materia toman sus mecanismos del nivel inferior y encuentran consecuencias en el nivel superior…", dando lugar a la idea de que no existen explicaciones "fundamentales", y hace posible estudiar lo que ocurre entre niveles, dándole igual importancia a cada nivel para el cuidado del medio ambiente.

La definición de ecotoxicología ha sido ampliada, y hoy presenta un importante aspecto predictivo, que implica el uso de ensayos específicos que permitan evaluar el posible impacto de un químico o mezcla de químicos. El objetivo de estas investigaciones es lograr un manejo sustentable de los recursos naturales y de todas las actividades antrópicas que tienen consecuencias sobre el medio ambiente (Kendal y Akerman 1992).

Así, la ecotoxicología acuática es definida actualmente como el estudio de los efectos tanto de sustancias químicas manufacturadas provenientes de actividades antrópicas, como de materiales naturales presentes en organismos acuáticos a diferentes niveles de organización, desde el subcelular, pasando por el de organismo, población,

comunidad y ecosistema. Si bien los efectos pueden ser tanto positivos como negativos, la ecotoxicología acuática se focaliza en las desviaciones adversas. Los efectos adversos a nivel de organismo pueden incluir tanto letalidad a corto o largo plazo, así como también efectos subletales que abarcan desde el comportamiento, crecimiento, desarrollo, reproducción, incorporación y detoxificación (Rand 1995).

1.5. Bioensayos de toxicidad.

En ecotoxicología acuática, los ensayos son comúnmente llamados bioensayos, según Finney en 1978, "Un ensayo biológico (bioensayo) es un experimento para estimar la naturaleza, constitución o potencia de un material por medio de la reacción que produce su aplicación a un organismo vivo". Un bioensayo típico implica un estímulo ya sea de una exposición externa o una dosis absorbida conocida que es aplicada sobre un organismo que responde a dicho estímulo, y cuya respuesta puede ser estimada mediante la medición de alguna característica biológica o el estado del organismo. Los bioensayos de toxicidad constituyen una herramienta sumamente útil para evaluar el riesgo potencial que podría representar la exposición a sustancias químicas de diverso origen. Asimismo, aportan la información necesaria para evaluar el riesgo de los ecosistemas por exposición a dichas sustancias químicas, y pueden ser utilizadas con fines de regulación. Como los bioensayos de toxicidad son utilizados para evaluar la concentración de un químico o el tiempo de exposición necesario para producir el/los efecto/s causados, estos test representan metodologías estandarizadas cuyo paradigma fundamental está basado en la relación dosis/concentración respuesta[1] (**Figura 1.1**), que a su vez está basada en el concepto de dosis efectiva individual (DEI) (**Figura 1.1.a**). De acuerdo a este concepto, existe una dosis/concentración mínima necesaria para causar la muerte de un organismo expuesto. Esta DEI es una característica de cada individuo, y en cada población estadística existirá un

[1] Los términos dosis respuesta y concentración respuesta son utilizados indistintamente. El análisis de los dos modelos son idénticos, solo varían en la forma de administración de la droga. El modelo dosis respuesta se asocia a la aplicación de la droga en el propio organismo ya sea vía inyectable, vía oral, etc; mientras que el modelo de concentración respuesta está asociado a una concentración de exposición en el medio externo.

rango de sensibilidades individuales con una distribución normal. Esta respuesta diferencial se debe a la variabilidad biológica, reflejando la composición genética de la población y las condiciones de los individuos. Así, cuando se expone aleatoriamente una cantidad "n" de individuos a cada tratamiento, dicho rango de sensibilidades es el que hace posible que se forme un gradiente a través de la serie creciente de concentraciones, por el cual determinada proporción responde al tratamiento, mientras que los restantes no (**Figura 1.1.b**), resultando en una típica curva sigmoidea dosis/concentración respuesta. La transformación log-normal de la distribución de las DEI (**Figura 1.1.a**), es la base de la transformación Probit, el método más habitual utilizado para el análisis de los datos de los bioensayos de dosis/concentración respuesta (**Figura 1.2)**. Otros métodos como el Litchfield y Wilcoxin, Spearman-Karber o la transformación log-logística pueden ser utilizados, pero si la información obtenida lo permite el método comúnmente utilizado es el Probit (Landis y Yu 1998). Así, la trasformación Probit, permite la obtención de una relación lineal de la información concentración-efecto, y la obtención de la Concentración Letal 50 (CL50) y sus correspondientes intervalos de confianza, que es la concentración que produce letalidad en el 50% de los individuos expuestos durante un tiempo determinado. Este parámetro permite tanto la comparación de la toxicidad de las diferentes sustancias, como la sensibilidad de los diferentes organismos y el cambio en la misma a distintos tiempos. También son muy utilizados parámetros como la CL10, CL90, NOEC (máxima concentración a la cual no se observan efectos) y LOEC (mínima concentración a la cual se observan efectos). Metodológicamente, también son muy útiles los TOPs (Toxicity Profiles Curves) (Herkovits *et al.* 1997; Pérez-Coll y Herkovits 2004), curvas de isoletalidad que consisten en la representación de los valores correspondientes a la CL 50, CL 90 y la CL10; estos dos últimos como valores cercanos a la mortalidad de todos los organismos y al NOEC, respectivamente; en función del tiempo. Estos perfiles proveen mayor información y comprensión de los umbrales de toxicidad en función de la concentración y tiempo de exposición a una determinada muestra o sustancia.

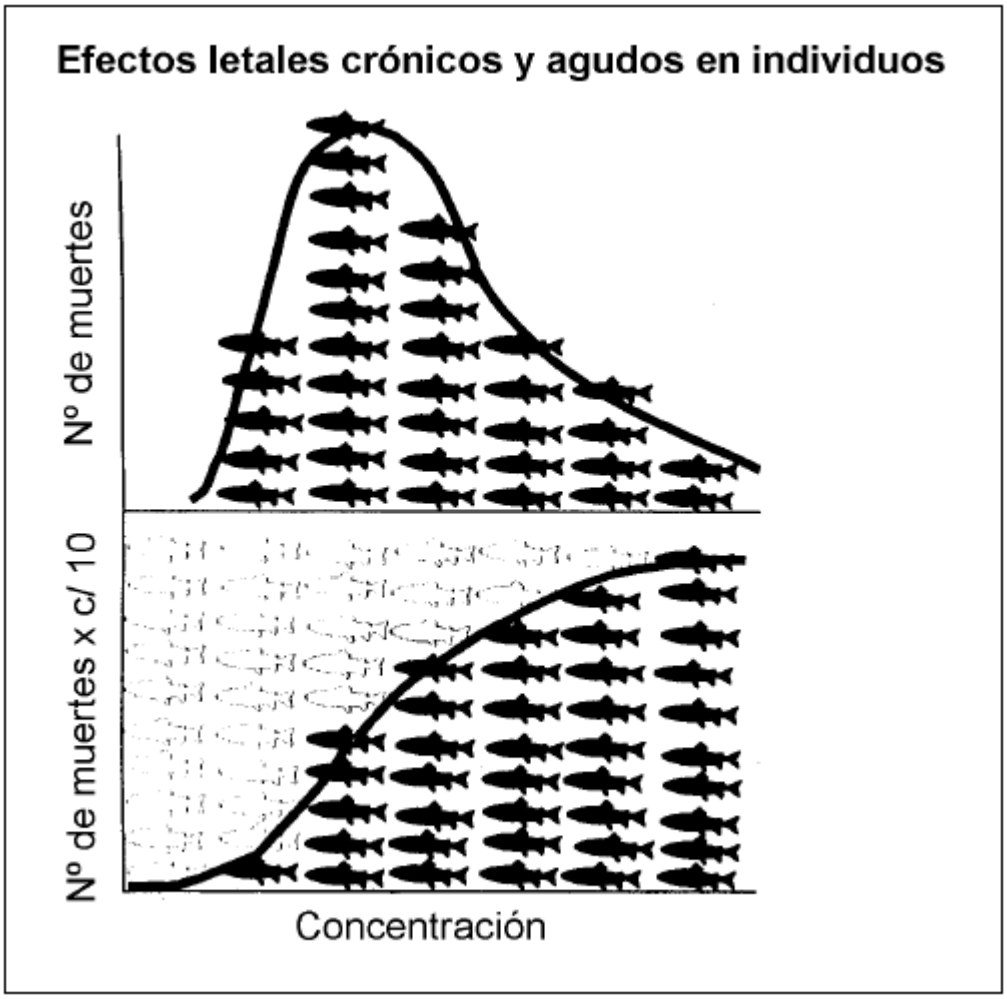


Figura 1.1. a) Representación del concepto Dosis Efectiva Individual (DEI). Demuestra la distribución de la dosis/concentración efectiva individual entre 35 peces tomados al azar de una población. Cada respuesta individual se ubica en una categoría (columna) basada en donde cayó su DEI dentro de los seis rangos diferentes. La distribución log normal resultante de dichos valores DEI, dentro de una población, resulta una curva asimétrica, con muy pocos individuos altamente tolerantes. **b)** Representación del resultado de la exposición de grupos de 10 individuos de la misma población a una serie de dosis/concentraciones por un periodo de tiempo. Los peces sobrevivientes (blancos) tienen valores de DEI mayores que la dosis/concentración de exposición, mientras que los peces muertos (negros) tienen DEI menores o iguales a la dosis/concentración de exposición. El resultado, es una típica curva sigmoidea dosis/concentración-respuesta. (Figura tomada de (Newman 1998))

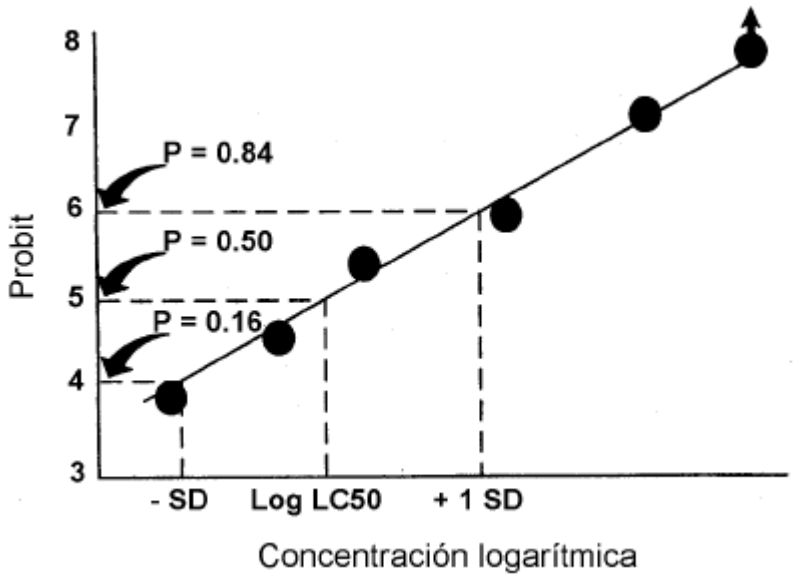


Figura 1.2. Representación del método Probit, para el cálculo de la concentración letal 50 y la desviación estándar. En abscisas, las concentraciones en escala logarítmica; en ordenadas, las proporciones afectadas en escala probit. (Figura tomada de (Newman 1998)).

Otro parámetro importante para los bioensayos es la duración de los mismos, ya a comienzos de la ecotoxicología se diferenciaron las exposiciones agudas y crónicas. Mientras que las exposiciones agudas en los test de toxicidad son generalmente de hasta 96 h, las exposiciones crónicas, por convención, deberían corresponder por lo menos al 10% del periodo de vida evaluado. Otra distinción importante en los bioensayos se puede hacer basándose en los diferentes estadios de vida empleados. Muchos estudios se realizan con organismos en determinado estadio del ciclo de vida, generalmente algún estadio temprano asumiendo que la etapa temprana del ciclo de vida es la más susceptible. Sin embargo, los estudios de toxicidad que exponen individuos en diferentes etapas del desarrollo y en estadios específicos (Aronzon *et al.* 2011a; Aronzon *et al.* 2011b; Pérez-Coll y Herkovits 1990), permiten evaluar la toxicidad estadio-dependiente y los potenciales efectos adversos relacionados con la diferenciación celular específica y los procesos morfogenéticos, proporcionando posibles explicaciones basadas en las características conocidas del desarrollo y en los mecanismos de toxicidad.

1.6. Especies utilizadas para bioensayos de toxicidad.

Existen diversos organismos tanto internacionales como nacionales que han desarrollado protocolos de laboratorio estandarizados entre ellos, USEPA (United States Environmental Protection Agency); ASTM (American Society for Testing and Materials); OECD (Organization for Economic Cooperation and Development); ISO (International Organization for Standarization), AOAC (Association of Oficial Analytical Chemists). En nuestro país, existe un Subcomité de Métodos biológicos dentro de IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Clasificación) encargado de la estandarización de métodos de muestreo y bioensayos de toxicidad. Estas organizaciones han desarrollado herramientas de diagnóstico, que permiten evaluar en forma efectiva y eficiente los efectos tóxicos agudos y crónicos de la contaminación sobre los organismos, el riesgo potencial producido por determinados químicos orgánicos e inorgánicos, formulados, muestras ambientales como efluentes, lixiviados, sedimentos, suelos y agua superficiales y subterráneas. Estas herramientas brindan importantísima información disponible para los organismos decisorios en función de la protección del medio ambiente y la salud humana, a fin de obtener un manejo sustentable del ambiente. La estandarización de los métodos brinda uniformidad y comparabilidad de los test, permite la reproducibilidad de los resultados por otros laboratorios, establece criterios en cuanto a la idoneidad de los datos para la toma de decisiones, y finalmente, la información obtenida puede ser compilada y comparada por diferentes laboratorios.

Si bien las especies utilizadas en la mayoría de los protocolos estandarizados abarcan un amplio número de taxones y muchas de las especies utilizadas poseen una amplia distribución, existen escasos protocolos estandarizados para especies neotropicales y autóctonas de nuestro país. Esto plantea un problema al momento de tomar decisiones o sacar conclusiones en base a la evaluación del impacto de una sustancia o mezcla sobre algún ecosistema acuático de una región específica. Por ello resulta sumamente importante también la utilización de especies nativas diferentes a las recomendadas por los organismos mencionados.

Las especies utilizadas deben cumplir con una serie de pautas o criterios importantes; el primero de ellos la sensibilidad; también deben conocerse los aspectos biológicos, ecológicos y fisiológicos de la especie elegida. Son preferibles aquellas que posean hábitos de vida relacionados con la problemática a evaluar, que sean fáciles de obtener y mantener en los laboratorios, que se reproduzcan con facilidad, en un amplio periodo del año, y que produzcan abundante cantidad de individuos, que sean fáciles de mantener y preferentemente posean ciclos de vida cortos y dimensiones manejables, de tamaño reducido, para facilitar la obtención de un mayor número de datos.

1.7. Los anfibios

El nombre anfibios proviene del griego "Amphibia" (amphi: dos y bios: vida), así el término puede ser interpretado en cualquiera de sus dos variantes, tanto como un animal que pasa parte de su ciclo de vida en el agua, cambiando después a una vida fuera del agua como adulto, o como un animal que alterna su vida dentro y fuera del agua. Los anfibios constituyen la etapa evolutiva intermedia entre los peces y los amniotas terrestres. El ancestro más antiguo encontrado fue un tetrápodo laberintodonto, así denominado por los pliegues de dentina de los dientes, del periodo Devónico que comenzó hace 416 ± 2,8 millones de años y terminó hace 359 ± 2,5 millones de años. Éstos vivían en agua dulce y probablemente por fenómenos de desecación estacional de los lodazales y búsqueda de alimento, debían desplazarse hacia sitios más favorables. Los laberintodontos no se parecían mucho a los anfibios modernos, ya que sus cabezas planas estaban recubiertas de una armadura ósea, su cuerpo tenía sección redonda y escamas óseas, al menos en el vientre, y sus patas eran cortas y dispuestas en ángulo recto respecto al cuerpo (Hickman 1967). A pesar de que este organismo representa un ensamble morfológico diverso, comparte las características únicas de los tetrápodos como son: el esmalte de los dientes replegado laberínticamente, caja craneal sólida, región posterior del cráneo longitudinalmente compacta, presencia de hendidura ótica, carpos, tarsos y dactilares, entre otras (Duellman y Trueb 1986). Los laberintodontos se extinguieron al final del período

Triásico, después de haber dado lugar a los anfibios anuros (ranas y sapos). Los otros anfibios, salamandras y gimnofionos, proceden de otros grupos de anfibios primitivos, los lepospóndilos, contemporáneos de los laberintodontos. Éstos que eran pequeños y con forma de serpiente se adaptaron a nichos ecológicos subterráneos y a lodazales, donde los laberintodontos no se encontraban habitualmente (Hickman 1967).

Los anfibios se convirtieron en un exitoso grupo con una amplia diversidad de tipos morfológicos y ecológicos que les permitió colonizar diversos ambientes terrestres, aunque siempre asociados al ambiente húmedo, indispensable para el funcionamiento de su piel, que interviene de un modo crítico en el intercambio gaseoso y en la osmorregulación, y la reproducción en muchas de las especies.

La clase Anfibia, subclase Lissamphibia, está compuesta por 6.888 especies, distribuidas en tres órdenes diferentes: Anura (ranas y sapos) , con 6.086 especies reconocidas; Caudata (salamandras) con 614 especies, y Gymnophiona (cecilias) con 188 especies (AmphibiaWeb). En nuestro país existen 171 especies de anfibios, distribuidas en 32 géneros de Anuros y sólo 3 de Gymnophiona (Lavilla *et al.* 2000).

Los anuros constituyen la mayor variedad de especies vivas de anfibios (88%) y la mayor parte de su diversidad genética, fisiológica, ecológica y morfológica (Frost *et al.* 2006). El orden está compuesto por las suprafamilias Discoglossidos, Pipidos, Pelobatoideos, Microhylidos, Ranoideos y Bufonidos. Esta última, incluye la familia Bufonidae conocida como “sapos verdaderos”. Los sapos no poseen dientes, tienen un aspecto deprimido y piel verrugosa, con grandes y notorias glándulas parótidas, y crestas cefálicas de desarrollo variable. Son formas básicamente caminadoras que se reproducen en cuerpos de agua esporádicos (charcas), depositando numerosos huevos pigmentados en ristras gelatinosas. Una de sus características particulares es que los machos poseen órgano de Bider, formado de los restos corticales de la cresta germinal, una estructura redonda sobre los extremos anteriores de los testículos formada por una masa compacta de pequeños oocitos inmaduros rodeados por una cavidad ovárica vestigial (Duellman y Trueb 1986).

Rhinela arenarum (Hensel, 1867) (**Figura 1.3 y 1.4**), comúnmente conocido como sapo común sudamericano, fue originalmente llamado *Bufo arenarum*. En 2006 fue

reclasificado dentro del género *Chaunus* (Frost *et al.* 2006) y al año siguiente se le dio el nombre actual (Chaparro *et al.* 2007). Esta especie se distribuye por el sur de Brasil, Argentina hasta el sur de la provincia de Chubut, Uruguay y Bolivia, desde el nivel del mar hasta los 2.600 m de altitud. Es un sapo de tamaño grande (99-140 mm), con dimorfismo sexual siendo los machos de menor tamaño, con longitud entre 88-108 mm y peso promedio en la edad adulta de 150g; mientras que las hembras alcanzan un largo entre 93 y 140 mm y 250g de peso. El patrón de coloración es muy variable, principalmente antes y después de las lluvias (respondiendo a estados fisiológicos del animal). Puede presentar una coloración uniforme marrón o verde oliváceo oscuro a gris. Estas coloraciones pueden tomar tonalidades más claras y presentar manchas verde claro-amarillo. Su vientre es granular, de color uniforme y siempre en tonalidades claras: blancuzco, gris o amarillo verdoso. Los miembros son cortos y robustos, con dedos cortos de poca movilidad, presencia de numerosos tubérculos y desarrollo de membrana digital solo en los pies. Los machos presentan un saco vocal simple (**Figura 1.4.b**) externo y medio, y callosidades en los tres primeros dedos de la mano. Durante la mayor parte del año permanecen ocultos. Hibernan desde junio hasta agosto, pausa necesaria para la reproducción, que se desarrolla en un periodo de septiembre a abril. Se los puede encontrar a considerables distancias de los cuerpos de agua en donde se reproducen. Los machos de mayor edad comienzan a cantar (**Figura 1.4.b**) atrayendo a otros machos y guían hacia la charca a los adultos inexpertos y a las hembras. Se forman así grandes agregados reproductivos con numerosos machos que compiten por las hembras (**Figura 1.4.c**) (Natale 2006). El abrazo o amplexo durante la reproducción (**Figura 1.4.c**) es de tipo axilar. El abrazo del macho produce el reflejo de puesta en la hembra (Herkovits y Pérez-Coll 1999). Los oocitos presentan una envoltura terciaria, tipo gelatinosa, que es producida por el oviducto. Esta gelatina contiene azúcares neutros, aminoazúcares, aminoácidos, ácidos siálicos y restos de fosfatos (Pisanó 1977), y está asociada al proceso de fecundación (Kambara 1953; Katagiri 1973). La puesta puede alcanzar los 40.000 oocitos que son fecundados por el macho a medida que son expulsados. Las ristras de huevos quedan dispersas en el cuerpo de agua, enredándose entre el pasto y otros objetos sumergidos (**Figura 1.4.d**). Es común que las charcas disminuyan abruptamente el nivel de agua luego de unos días y que gran parte de los huevos queden expuestos al aire, secándose y muriendo (Herkovits y Pérez-Coll 1999; Natale 2006).

Rhinella arenarum

Phyllum: Chordata

Clase: Amphibia

Subclase: Lissamphibia

Orden: Anura

Superfamilia: Bufonoidea

Familia: Bufonoidea

Género: Rhinella

Especie: *Rhinella arenarum*

Figura 1.3: Clasificación taxonómica de *Rhinella arenarum*.

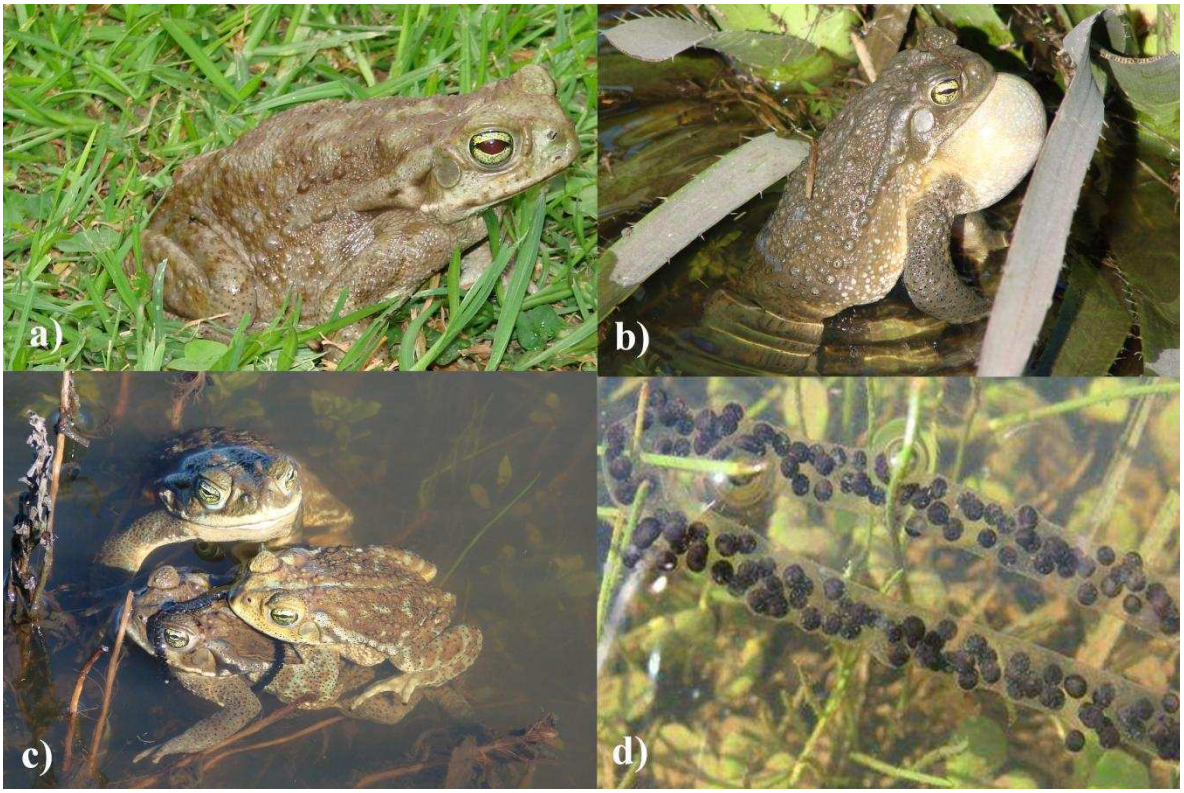


Figura 1.4. *Rhinella arenarum* (Sapo común sudamericano) **(a)**. Llamado de macho, con saco vocal simple **(b)**. Agregado reproductivo con machos que compiten por la hembra, y amplexo entre macho y hembra en el momento de la reproducción **(c)**. Ristras de huevos con su gelatina **(d)**.

1.8. Desarrollo embrionario y larval de *Rhinella arenarum*

Al poseer un desarrollo embrionario externo, los oocitos de un tamaño de entre 1,2 y 2 mm de diámetro, sumado a su membrana vitelina translúcida que permiten la observación del embrión en todo su desarrollo embrionario, hicieron posible su utilización como modelo de estudio de embriología desde los inicios de la disciplina.

Como la mayoría de los metazoos presenta una simetría bilateral y tres capas germinales, y como todos los cordados, los anfibios son deuterostomados. En el caso de esta clase, el blastoporo no forma el ano, sino que el mismo se forma secundariamente. Los huevos de los anfibios son clasificados como heterolecíticos, debido a que el vitelo se acumula en mayor proporción en el polo inferior o vegetativo, si bien queda mezclado con

el citoplasma. Condición inversa se encuentra en el polo animal en que se ubica la mayor cantidad de citoplasma con el núcleo celular. Una de las principales características de los huevos de los anfibios es la rotación cortical del citoplasma unos 30° hacia el punto de entrada del espermatozoide en el momento de la fecundación, determinando en muchas especies la "media luna gris", que tiene una intervención fundamental durante la gastrulación y el posterior desarrollo embrionario, gracias a la formación del centro de Nieuwkoop (Nieuwkoop 1973), compuesto por los blastómeros de posición más dorsal del polo vegetativo de la blástula, que posteriormente inducirá la formación del sitio organizador de Spemann.

Se considera que el desarrollo ontogénico se subdivide en dos grandes periodos, el embrionario y el larvario (Rossi 1959). Se definió el periodo embrionario como el comprendido entre la fecundación del oocito al momento en que el renacuajo comienza a alimentarse; y el periodo larval como el que va de ese momento hasta antes de la metamorfosis (Contronei 1932). Si bien existe mucha controversia en la delimitación del estadio en que las larvas comienzan a alimentarse, muchos autores, entre ellos Gosner (1960), consideran que los estadios embrionarios son aquellos que contienen las etapas previas de la alimentación libre (estadios 1-25), aunque reconocen que es totalmente arbitrario e indican al estadio 25 como el comienzo de la alimentación libre.

Una descripción detallada del desarrollo embrionario de *R. arenarum* fue realizada en Argentina por Del Conte y Sirlin (1951). Estos autores dividen el periodo embrionario en 25 estadios, basándose en características visibles externas. Estos 25 estadios abarcan las etapas de segmentación (estadios 1-9), gastrulación (10-12), neurulación (13-16), formación del brote caudal (17), aparición de la actividad neuromuscular (18), comienzo de la circulación (19-22) y transformación de las branquias externas en internas (23-25). A partir del estadio 18, los embriones eclosionan de las envolturas (membrana vitelina y gelatina). Al alcanzar el estadio 25, fin del desarrollo embrionario o comienzo del desarrollo larval, las larvas miden unos 10 mm de longitud y presentan un cuerpo claviforme. La duración del desarrollo varía con las condiciones de temperatura y fotoperiodo, siendo más corto al aumentar cualquiera de las dos variables. El desarrollo embrionario hasta el desarrollo de una larva libre con las branquias internas, a 17-20°C

puede tardar unos 7 a 10 días. El desarrollo larval posterior hasta alcanzar la metamorfosis para *R.arenarum* fue descripto por D Echeverría y L.Fiorito de López (1981), extendiendo la descripción de Del Conte y Sirlin. Dentro del periodo larval, la aparición de los esbozos de los miembros posteriores marca el comienzo de lo que algunos autores denominan premetamorfosis. Este término se aplica al periodo larvario durante el cual la larva continua su crecimiento y los miembros posteriores se desarrollan paulatinamente. Los miembros anteriores se desarrollan a la vez que los posteriores, pero en la mayoría de los casos lo hacen dentro de la cámara branquial. Durante este periodo algunos autores definen los diferentes estadios larvarios en función del aspecto de los miembros posteriores. Durante la premetamorfosis se produce el alargamiento del cuerpo, un decrecimiento en el movimiento y la alimentación de la larva. El momento en que se inicia la metamorfosis varía mucho según los diferentes criterios, pero la mayoría de los autores coinciden en dividir el proceso metamórfico en dos etapas, la primera o prometamorfosis comienza cuando aparecen los miembros anteriores y en la segunda, climax o crisis metamórfica, ocurren los cambios más notables y rápidos que conducen a la formación del juvenil (Echeverria 1990)(**Figura 1.5**).

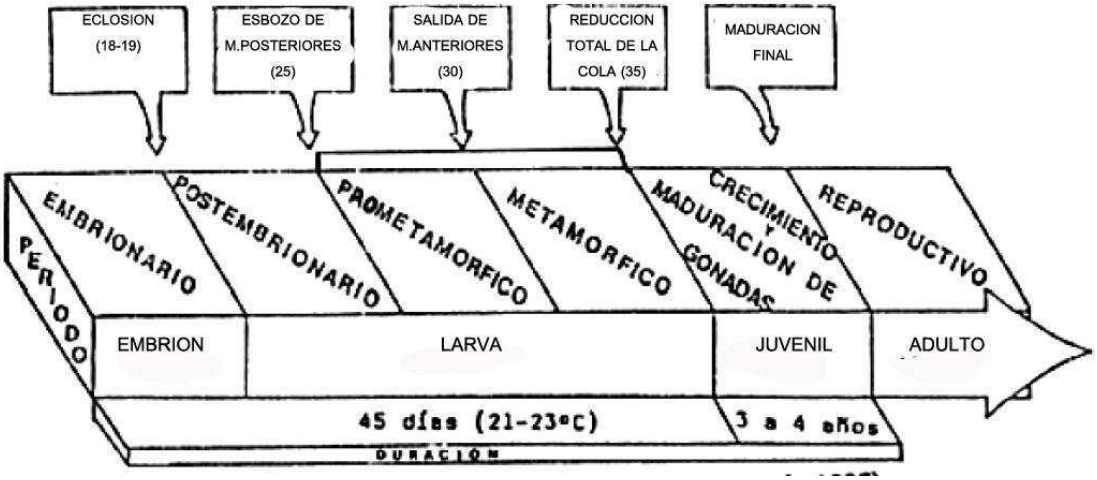


Figura 1.5. Períodos del ciclo de vida de *Rhinella arenarum* (Echeverria 1987).

1.9. Utilización de los anfibios en bioensayos de toxicidad.

Los bioensayos de toxicidad se han basado principalmente en la utilización de mamíferos, como ratas, ratones, etc.; aunque también se han utilizado aves, insectos, organismos acuáticos como peces y dafnias, y microorganismos. El interés por el estudio de los vertebrados en ecotoxicología, reside en la relación filogenética más cercana que este grupo de animales presenta con el hombre respecto a los otros grupos de organismos utilizados en estudios toxicológicos. Las extrapolaciones empleadas en cuestiones de salud humana poseen un mayor realismo a medida que las relaciones de parentesco son más cercanas. También ciertos aspectos de conservación de fauna están más asociados con las especies de vertebrados, ya que éstas poseen un mayor valor económico o de mayor impacto para la sociedad (Natale 2006). Sparling y *et al.* (2000) realizaron una investigación sobre los trabajos publicados entre 1972 y 1998, en las bases de datos de Wildlife Review and Sport Fisheries, encontrando que de un total de 12.727 publicaciones en ecotoxicología con vertebrados, 28,6% fueron hechas con peces, 29,9% con aves, 13% con mamíferos y solo el 3,5% con anfibios y reptiles. Los mismos autores destacan la necesidad de realizar estudios con la Herpetofauna ya que de las investigaciones realizadas acerca de los distintos efectos de tóxicos sobre diferentes clases de vertebrados, sólo un 2,7 % están relacionadas con anfibios.

En los últimos 40 años ha tomado considerable atención la declinación de las poblaciones de anfibios, así como el aumento en la incidencia de las malformaciones a nivel mundial, su declinación poblacional podría dificultar el manejo de los ecosistemas sobre bases sustentables (Corn 1994; Houlahan y Findlay 2000). Las anormalidades morfológicas ocurren normalmente durante el desarrollo de los anfibios en baja frecuencia no superando el 2% de los casos. Sin embargo, en las últimas décadas la frecuencia de alteraciones morfológicas, en condiciones naturales, se ha visto fuertemente incrementada alcanzando en algunos casos puntuales el 85% de la población (Blaustein y Johnson 2003; Burkhart *et al.* 1998). La mayoría de las malformaciones en los anfibios han sido reportadas en ejemplares adultos o en estadios larvales o metamórficos e incluyen principalmente polidactilia, polimelia, ectromelia, braquimelia, microftalmia, anoftalmia y deformidades

cefálicas. Más aún, estudios morfológicos en anfibios de la parte media de Argentina, región dominada principalmente por la agricultura, informaron un alto grado de incidencia de malformaciones, especialmente ausencia de segmentos de las extremidades, falta de extremidades y anormalidades en la mandíbula inferior. *Rhinella arenarum* resultó una de las especies con mayor incidencia de malformaciones (Peltzer *et al.* 2010). Sin embargo, los mecanismos del desarrollo involucrados en dichas malformaciones no han sido aún identificados siendo uno de los grandes desafíos en los estudios de teratogénesis. Muchos factores han sido considerados en la problemática, incluyendo la destrucción del hábitat, enfermedades infecciosas, introducción de especies, aumento de la radiación ultra violeta y cambio climático. Los químicos derivados tanto de la agricultura, como la industria y otras actividades antrópicas han tomado una relevancia mayor como causa potencial de la declinación, actuando tanto en forma asilada como conjunta entre ellos y otros posibles factores estresantes. Los tóxicos en el ambiente podrían interferir tanto en el crecimiento como en el desarrollo de los anfibios de diversas maneras. Así, concentraciones letales de los tóxicos en el ambiente pueden causar la muerte de huevos, larvas y también de individuos que se encuentran metamorfoseando. Incluso concentraciones subtóxicas, pueden causar la muerte indirectamente aumentando la susceptibilidad de huevos y larvas a patógenos y enfermedades, así como también pueden disminuir la supervivencia al enlentecer el desarrollo y la metamorfosis, lo que retrasaría el abandono de las charcas de reproducción a tiempo; también podría interferir la respuesta de escape de las larvas a los predadores. Los tóxicos con acción de disrupción endocrina podrían inhibir parcial o totalmente la reproducción (Carey y Bryant 1995).

El típico ciclo de vida bifásico de los anfibios que implica transcurrir por un periodo de desarrollo en el agua para embriones y larvas, para luego como adulto, desarrollar una vida terrestre, los expone a una gran variedad de condiciones ambientales. Por otro lado, gran parte de este ciclo de vida se desarrolla en estanques, arroyos y lagunas temporales, que generalmente están asociados con aéreas agrícolas, adonde escurren y concentran las sustancias tóxicas del ambiente. Además, muchas especies se reproducen y sus larvas se desarrollan en primavera y verano, coincidiendo con la aplicación de los pesticidas y fertilizantes. Por otro lado, las larvas de los anfibios, son típicamente herbívoras, mientras que los adultos son carnívoros, esto los hace un componente clave en las tramas tróficas,

cumpliendo un importante rol en la transferencia de energía y nutrientes a través de las redes tróficas acuáticas y terrestres, pero también los expone a una gran diversidad de predadores y parásitos. Los anfibios presentan una alta permeabilidad en las branquias en algunos de los estadios del desarrollo embrionario y larval, así como la piel húmeda y la respiración cutánea que son más importantes que la respiración pulmonar en los adultos. Estos factores los pone en íntimo contacto con el ambiente aumentando su susceptibilidad frente a los cambios, entre ellos, la presencia de contaminantes (Mann *et al.* 2009; Wake y Vredenburg 2008).

Estas características que destacan su importancia trófica, ambiental, ecológica y su inminente riesgo de extinción, sumado a las mismas características que hicieron a los anfibios un modelo muy utilizado en embriología, por su sensibilidad, fácil mantenimiento y reproducción en el laboratorio, más el elevado número y alta homogeneidad de individuos obtenidos, han impulsado el desarrollo de bioensayos de toxicidad con anfibios. Los bioensayos de toxicidad con anfibios tuvieron su enorme desarrollo durante los años 90' (Mann 2005). Así, la Sociedad Americana para los Métodos de Evaluaciones y Materiales (ASTM 1993a) desarrolló y avaló la guía FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay–Xenopus) (Dumont *et al.* 1983), el bioensayo con anfibios más conocido. FETAX utiliza embriones de *Xenopus laevis*, la rana con uñas de Sudáfrica, desde estadios tempranos del desarrollo para exposiciones de 96 h, período en el cual, a una temperatura fija de incubación, concluyen su desarrollo embrionario. Este test ha sido utilizado ampliamente para la evaluación de la toxicidad tanto de compuestos simples, como mezclas, muestras ambientales, suelos, sedimentos demostrando su eficiencia como aplicación de herramienta ecotoxicológica en plantas de tratamiento de efluentes (Bernardini *et al.* 2005). FETAX evalúa como puntos finales, la mortalidad y las alteraciones en la talla. Para evaluar teratogénesis se desarrolló una guía completa de análisis que buscó facilitar y unificar la clasificación de las malformaciones (Bantle *et al.* 1992). Con el fin de obtener informes ecotoxicológicos que fueran representativos de las implicancias sobre los ecosistemas y las especies en Argentina, que a su vez mantuvieran la confianza y la posibilidad de comparar resultados tanto intra e inter laboratorio, como entre diferentes sustancias, mezclas y muestras, se desarrolló el test estandarizado ANFITOX (Herkovits y Pérez-Coll 1999), que emplea embriones de *Rhinella arenarum*. El protocolo

ANFITOX presenta numerosas ventajas y diferencias respecto del test FETAX (**Tabla 1.1**), además de posibilitar la evaluación de la susceptibilidad de especies autóctonas y en diferentes momentos del ciclo de vida, amplía los tiempos de evaluación de agudo a crónico corto (168h) y crónico (14 días).

Tabla 1.1. Comparación de algunas condiciones experimentales entre ANFITOX y FETAX; modificado de Herkovits y Pérez-Coll (2003).

	ANFITOX	FETAX
Iones disueltos	(mg/L)	(mg/L)
Na^+	14,75	272
K^+	0,26	15,7
Ca^{2+}	0,36	19,4
Mg^{2+}	0	15,2
Cl^-	22,71	403
SO_4^{2-}	0	93,3
HCO_3	1,45	69,7
Individuos/volumen	10/50 mL	25/10 mL
Temperatura (°C)	20± 2	24 ±2

Estos test, también permiten obtener información sobre mortalidad, malformaciones, retrasos en el desarrollo y crecimiento y anomalías en el comportamiento.

1.10. Objetivos generales.

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar la toxicidad letal y subletal del Cobre, Diazinón y Nonilfenol utilizando bioensayos de toxicidad con embriones y larvas de *Rhinella arenarum* (ANFITOX), realizando las curvas de isotoxicidad o curvas TOP, en ensayos agudos (de hasta 96 h) y crónico-cortos (168 h). Así como también, evaluar la toxicidad letal de las mezclas binarias del Cobre, Diazinón y Nonilfenol utilizando bioensayos de toxicidad con embriones y larvas de *Rhinella arenarum* (ANFITOX) en ensayos agudos (de hasta 96 h) y crónico-cortos (168 h).

Capítulo 2: Cobre

2.1. Objetivos e hipótesis.

2.1.1. Objetivos.

Evaluar la toxicidad letal y subletal del Cobre, utilizando bioensayos de toxicidad con embriones y larvas de *Rhinella arenarum* (ANFITOX), realizando las curvas de isotoxicidad o curvas TOP, en ensayos agudos (de hasta 96 h) y crónico-cortos (168 h)

En forma adicional, se evaluó la toxicidad estadio-dependiente al cobre en diferentes estadios del desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum* por pulsos de 24 h. Así como también, realizar bioensayos de toxicidad crónica a cobre utilizando embriones en estadio de blástula temprana (E.4) de *Rhinella arenarum* hasta completar la metamorfosis.

Por otro lado, se buscó evaluar en forma preliminar los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en diferentes estadios del desarrollo de *Rhinella arenarum* expuestos a cobre. Así mismo, en forma preliminar evaluar tanto la toxicidad como los parámetros relacionados con el estrés oxidativo de larvas de *Rhinella arenarum* y *Rhinella fernandezae* obtenidas en ecosistemas urbanos contaminados.

2.1.2. Hipótesis.

El cobre causa importantes efectos letales y subletales en embriones y larvas de *Rinella arenarum* a tiempos de exposición agudos y crónicos cortos.

La toxicidad del cobre en los estadios embrio-larvales de *Rhinella arenarum* puede analizarse a partir de curvas de isotoxicidad.

Los estadios embrionarios presentan una susceptibilidad diferente frente al cobre.El cobre es pro-oxidante y la exposición al mismo altera el metabolismo antioxidante en embriones y larvas de *Rhinella arenarum*.

Las larvas de *Rhinella arenarum* y *Rhinella fernandezae* provenientes de sitios con diferentes grados de contaminación tienen una sensibilidad diferente al cobre.

La susceptibilidad diferencial al cobre de las larvas de *Rhinella arenarum* provenientes de sitios con diferentes grados de contaminación se relaciona con las diferencias en las respuestas antioxidantes.

2.2. Introducción.

El cobre es uno de los metales más utilizado y antiguo conocido por el hombre que fue descubierto en la antigüedad en su forma original. El primer objeto realizado en cobre que se tiene registro es un pendiente que data de aproximadamente 9000 años AC, hallado en Asia Menor. El bronce, una aleación de cobre y estaño le dio nombre a toda una era (3500 AC). Desde el punto de vista biológico, es uno de los metales esenciales más importantes después del hierro y el zinc. Su color brillante lo hizo fácilmente visible, y debido a que estaba disponible en grandes cantidades fue fácilmente extraído casi en la superficie misma de la tierra.

El cobre es un metal de color marrón rojizo. Es el elemento número 29 y el primero del grupo IB de la tabla periódica de elementos. Tiene una abundancia aproximada de 60mg/Kg en la corteza terrestre y 2,5 10^{-4} mg/L en el mar. Existen dos isótopos estables ^{63}Cu y ^{65}Cu, con una abundancia natural de 69,2 y 30,8%, respectivamente. Los isótopos radioactivos incluyen ^{64}Cu ($t_{½}$ = 12,7 h) y ^{67}Cu ($t_{½}$ = 61,9 h). Generalmente se lo encuentra como ión cúprico (Cu^{+2}) en los compuestos encontrados en el ambiente, es estable y forma $Cu(HO)_2$ en agua a un pH alcalino, pero también puede existir en su forma metálica (Cu^0).Como ión cuproso (Cu^{+1}) es poco estable a pH neutro y se oxida a cúprico con el aire. También existe como ion trivalente (Cu^{3+}), aunque es menos frecuente (Stern *et al.* 2007). El comportamiento químico del elemento, especialmente en sistemas biológicos, depende fundamentalmente de su estado de oxidación. El cobre, que también forma componentes organometálicos, es escasamente soluble en agua, sal o soluciones ácidas. Se lo encuentra naturalmente en una gran variedad de sales minerales y compuestos orgánicos, y en forma metálica, se caracteriza por ser uno de los mejores conductores de electricidad. Esta característica junto con su ductilidad, maleabilidad y resistencia a la corrosión lo ha convertido en el material más utilizado para fabricar cables eléctricos y otros componentes eléctricos y electrónicos. También puede formar aleaciones con otros elementos, adquiriendo así características mecánicas muy superiores, aunque perdiendo conductividad. Existe una amplia variedad de aleaciones de cobre, cuyas composiciones ofrecen distintas

características técnicas, por lo que se utilizan en multitud de objetos con aplicaciones técnicas muy diversas. El cobre forma aleaciones con el zinc dando origen al latón, con el estaño formando bronce y, junto con el níquel y el zinc origina la alpaca. Otras aleaciones, menos conocidas, pueden darse tanto con el cadmio, como con cromo, o hierro y fósforo, así como con aluminio, berilio y hasta con la plata.

El cobre se encuentra naturalmente en el ambiente, las fuentes naturales incluyen el polvo arrastrado por el viento, los volcanes, la vegetación en descomposición, los incendios forestales y la espuma del mar. Las emisiones antropogénicas incluyen fundiciones, talleres de fundición de hierro, centrales eléctricas y fuentes de combustión como los grandes incineradores. Es muy importante su uso en la agricultura, como fungicida, pesticida, alguicida, utilizándoselo también para tratar follaje, semillas, maderas y cueros; para inhibir el crecimiento de algas en reservorios municipales, piletas, cañerías y sistemas de enfriamiento industrial. Se utiliza como aditivo en la alimentación de animales y promotores de crecimiento, como así también para el control de enfermedades en el ganado y aves de corral. Otras fuentes de contaminación incluyen las industrias textiles, refinerías de petróleo, fabricación de compuestos de cobre, construcción de revestimientos y techos (Davis *et al.* 2001), freno de automóviles, neumáticos, fugas de aceite, y materiales para pavimentación (Campbell 1994). La mayor emisión de cobre al ambiente proviene de las minas y lodos de aguas residuales (IPCS 1998c). El potencial de yacimientos de cobre de Argentina es bien conocido desde los años 60´. En 1997 el país ingreso al club de los productores de cobre con Bajo de la Alumbrera y se confirmaron otros yacimientos proyectados, entre ellos: San Jorge, Taca Taca, El Altar, Campana Mahuida, Los Azules, El Pachón, Famatina, José María y Agua Rica, entre otros. La región con mayores recursos conocidos de cobre es la de Los Andes Centrales (Chile, Perú, Argentina, Bolivia), que contribuyen con cerca de un 40% del cobre consumido por el mundo, mayoritariamente explotado por Chile y Perú (Argentina Mining 2010).

El cobre es liberado a la atmósfera en asociación con diferentes partículas, se separa por sedimentación gravitacional, deposición seca, y luego es lavado por la lluvia. A su vez, el metal llega al agua por el desgaste natural del suelo, el lavado de las diferentes aplicaciones en el campo, descargas de las industrias y por las aguas residuales.

Mientras que la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S EPA) ha establecido un valor límite de cobre para calidad de agua dulce en exposición crónica de 9 µg/L y la legislación Argentina ha establecido un valor máximo permitido para agua de bebida de 1mg/L (Ministerio de Salud y Acción Social 2007) y un valor menor a 0,95 µg/L para la protección de la vida acuática, se han encontrado concentraciones de cobre superiores a éstas en diferentes ambientes. Por ejemplo, se encontraron valores de 40 µg/L en los estanques de retención de agua de tormenta en Guelph, Ontario, Canadá, concentraciones superiores a 261 µg/L en aguas superficiales de New Jersey, incluso se han informado concentraciones de 3.700 µg/L en una mina en Idaho, también en Estados Unidos. En Argentina se han informado valores en el orden de 27 a 64 µg/L en el Río Reconquista (Ferrari *et al.* 2005). La concentración y la disponibilidad de cobre en los ambientes acuáticos dependen de factores como la dureza, alcalinidad, fuerza iónica, pH, potencial redox, ligandos, partículas en suspensión, materia orgánica, y las interacciones entre los sedimentos y el agua (IPCS 1998c). En los ambientes acuáticos, la retención de productos tóxicos, promueve el aumento de las concentraciones a través de las tramas tróficas, fenómeno conocido como biomagnificación. Los metales pesados son fácilmente bioacumulables tanto en tejidos adiposos, como fibrosos (Ferreira *et al.* 2004).

La homeostasis del cobre es típicamente bifásica, incluyendo la esencialidad y la toxicidad del metal. La capacidad del metal de pasar de Cu^{+1} a Cu^{+2} explica su importancia en los sistemas biológicos ya que funciona como un aceptor/donor de electrones clave en las reacciones de óxido-reducción, resultando en un elemento esencial para todos los organismos vivos, crucial para muchos procesos celulares, metabólicos. El cobre es co-factor de al menos 30 enzimas conocidas (Tabla 2.1.), incluyendo la ferroxidasa, citocromo oxidasa, superóxido dismutasa, participa de la respiración mitocondrial, la síntesis de melanina, la reticulación del colágeno, interviene en la integridad del sistema nervioso central, como así también cumple un rol importante en la activación y represión en la transcripción de genes (IPCS 1998c; O´Dell 1990; Papadimitriou y Loumbourdis 2002 ; Stern *et al.* 2007). Aunque su esencialidad no fue reconocida hasta 1928, su deficiencia puede causar graves problemas fisiológicos, como anemia, neutropenia y anormalidades óseas (IPCS 1998c). Existen dos desórdenes congénitos bien estudiados relacionados al metabolismo del cobre. Menkes *et al.* (1962) describieron por primera vez la X-recesiva

genodermatosis o “Sindrome del cabello acerado o ensortijado” que dificulta la absorción y distribución del cobre en el cuerpo. Por otro lado, la “enfermedad de Wilson” se caracteriza por una elevada concentración de cobre el hígado, causada por la disminución de la excreción del metal, causando daño hepático. Ambas patologías son poco comunes, y ocurren con una frecuencia de uno en 100.000 nacimientos.

Tabla 2.1.: Enzimas que contienen cobre, modificado de “Copper and human health: Biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships” (Stern *et al.* 2007).

Enzima	Función	Comentarios
Amino oxidasa	Desaminación de aminas primarias	Presentes en eucariotas, cataliza la oxidación de aminas biogénicas (por ejemplo, tiramina, histidina, y poliaminas) dando productos orgánicos oxidados por lo general aldehídos, y generando NH_3 y H_2O_2 como subproductos.
Bencilamina oxidasa		
Diamina oxidasa		
Indol 2,3-dioxigenasa		
Espermina oxidasa		
Ascorbato oxidasa	Oxidasa terminal	
Ceramida galactosyltransferasa	Síntesis de mielina	Responsable de la síntesis y mantenimiento de las membranas de fosfolípidos. Componentes de gangliósidos de lípidos (ceramidas), se sintetizan en el retículo endoplasmático y glicosilada por glicosiltransferasa en los compartimentos de la red de Golgi. La membrana lipídica funciona como capacitador eléctrico, permitiendo la separación de carga y almacenando energía electroquímica en forma de gradiente de iones.
Ceruloplasmina o ferroxidasa	Transporte de cobre Oxidación	Con seis uniones fuertes a los iones de cobre en dos sitios moleculares distintos, uno parece activar el oxígeno, el otro pareciera estar involucrado en el trasporte de electrones. Es el mayor transportador de cobre en los mamíferos superiores, mediante la unión a receptores de membrana celular y la liberación de Cu. Individuos aceruloplásmicos (humanos y ratones knockout) muestran severas dificultades en el sistema nervioso central. La deficiencia se puede manifestar como daño neurológico, pero mínimo (si hubiera) dificultades con el metabolismo de cobre. Los individuos con la enfermedad de Wilson presentan bajos niveles de la enzima pero metabolismo normal del hierro.
Citocromo c oxidasa	Transporte de electrones Terminal oxidasa	Enzima terminal en la cadena respiratoria, ubicada en el interior de la membrana mitocondrial y bacteriana. Cataliza la reducción de O_2 a agua. Bombean protones a través de una membrana y por cada protón consumido en la reacción, se genera un gradiente electroquímico que puede ser utilizado para otros procesos celulares. Su deficiencia puede producir anormalidades en el cerebro, hipotermia y debilidad muscular.
Dopamina β	Síntesis de	Cataliza la conversión de dopamina en norepinefrina. Su deficiencia

hidroxilasa	norepinefrina	puede traer problemas neurológicos, posiblemente hipotermia.
Gacaltosa oxidasa	Metabolismo de carbohidratos	Cataliza la conversión de los alcoholes primarios a su aldehído correspondiente, produciendo generalmente peróxido de hidrógeno .En los hongos podría estar involucrada en la descomposición de la pared celular vegetal.
Hemocianina	Transporte de oxígeno	Proteína del sistema respiratorio de crustáceos decápodos
Lacasa	Oxidasa terminal	Se la encuentra en plantas y hongos. Cataliza la reducción de cuatro electrones de O_2 a H_2O. Despolimeriza lignina.
Lisil oxidasa	Reticulación del colágeno y elastina	Enzima secretada que cataliza la desaminación de residuos de peptidil lisina formando los enlaces cruzados covalentes inter e intracadena de elastina y colágeno. Es crítica en la integridad de la matriz extracelular, ya que su ruptura puede dar lugar a la proliferación del cáncer. También se localizan en el núcleo, donde puede funcionar en la organización de la cromatina. También puede bloquear la vía del oncogen ras.
Monoamino oxidasa	Síntesis de neurotrasmisores	Se encuentra principalmente en la membrana mitocondrial externa y en el SNC. Dos isoenzimas, ambas oxidan los neurotransmisores dopamina, adrenalina, tiramina, triptamina. La monoamino oxidasa (MAO)-A oxida selectivamente serotonina; la MAO-B oxida feniletilamina y bencilamina. Las deficiencias de la MAO-A producen alteraciones en el metabolismo sistémico de aminas, retraso y posibles alteraciones cardiovasculares y de comportamiento. Los inhibidores de la monoamino oxidasa previenen la ruptura de la dopamina. Como la dopamina pareciera mejorar el estado de ánimo, estos fármacos funcionan como estimulantes y antidepresivos.
Peptidil glicina, una monooxigenasa amidante	Procesamiento de neuropéptidos	Proteína multifuncional implicada en la maduración de las hormonas bioactivas (por ejemplo, neurotransmisores y hormonas de crecimiento), contiene dos enzimas que actúan secuencialmente para catalizar la alfa-amidación de péptidos neuroendocrinos. La glucosa aumenta tanto los niveles de expresión génica de gastrina y la maduración de péptidos carboxiamidados, lo que indica que la glucosa influye en la actividad del complejo enzimático de amidación, peptidil glicina alfa-amidante monooxigenasa (PAM), en células de insulina.
Plastocianina	Transferencia de electrones en plantas	Pequeña proteína que funciona como transportadora de electrones entre citocromos del fotosistema 1.
Polifenol oxidasa /tirosinasa	Biosíntesis de quinonas, síntesis de pigmentos (melanina), metabolismo de amino ácidos	Oxida la tirosina a dihidroxifenilalanina, que a su vez se oxida a o-quinona. Ampliamente distribuida en plantas, animales y seres humanos. Oxida la tirosina al pigmento melanina en mamíferos y produce el oscurecimiento de las zonas cortadas de muchas frutas y verduras. Su deficiencia causa hipopigmentación.
Prostaglandina reductasa	Biosíntesis de prostaglandina	Responsable de la reducción de 15-oxoprostaglandina a su derivado 13,14-dihidro derivados. La forma placentaria es NAD dependiente.
Rusticianina	Transporte de electrones	Se encuentra en hongos y bacterias Gram negativas. Puede tolerar valores de pH extremos.
Estelacianina	Transporte de electrones, radical superóxido	Se encuentra en hongos y algunas plantas.
Superóxido dismutasa (SOD)	Destrucción de radicales superóxidos	Durante la catalización de la dismutación de superóxido en oxígeno, el Cu en el sitio activo de la enzima se reduce para producir peróxido de hidrógeno. Su deficiencia causa sensibilidad al estrés oxidativo.
Uricasa	Metabolismo de los ácidos nucleicos	Terminación del catabolismo de las purinas en la mayoría de los mamíferos. Convierte el ácido úrico a alantoína. También se encuentran en los tejidos de mamíferos inferiores y en algunas plantas y

		microorganismos.

La mayoría de los tejidos presentan una cantidad mensurable de cobre, y en general, las células, los tejidos y los organismos presentan mecanismos para mantener su disponibilidad mientras limitan su toxicidad. Sin embargo, concentraciones de cobre tan bajas como 1 a 20 µg/L, apenas superiores a las concentraciones en medios prístinos, pueden causar efectos adversos a organismos acuáticos, tanto en vertebrados como invertebrados (IPCS 1998a). Los estudios de toxicidad del cobre han abarcado un amplio rango de organismos de vida acuática. Así, para algas, las CE50-96h para la inhibición del crecimiento han sido informadas en el rango de 47 a 481 µg/L, para invertebrados de agua dulce, la toxicidad va desde una CL50-48h de 5µg/L para *Daphnia hyalina* hasta una CL50-96h de 9.300 µg/L para caracoles (*Amnicola sp.*). En el caso de los peces de agua dulce la toxicidad aguda va desde una CL50 de 2,58 µg/L para *Thymallus ascticus* y de 13.700 µg/L para *Lepomis macrochirus* (IPCS 1998c). También se ha informado que la exposición a cobre en peces puede afectar las estrategias reproductivas, la velocidad de nado, la inmunidad, el metabolismo, las actividades enzimáticas, la regulación iónica y las células epiteliales de branquias e intestino (Handy 2003).

La información sobre la toxicidad del cobre en anfibios es más limitada (Tabla 2.2). Se han realizado algunos estudios de toxicidad aguda durante las etapas tempranas del desarrollo. Por ejemplo, se informaron CL50-96h de 230 µg/L, 120 µg/L y 2400 µg/L *para Rana sphenocephala*, *Bufo boreas* y *Rana catesbeiana*, respectivamente (Bridges *et al.* 2002; Ferreira *et al.* 2004). También fueron informados efectos teratogénicos causados por exposición al metal, como malformaciones, reducción en la tasa de crecimiento, retraso en la metamorfosis (Chen *et al.* 2007), y alteraciones en el comportamiento (Redick y La Point 2004).

Tabla 2.2.: Datos publicados de toxicidad al cobre durante el desarrollo embrio-larval de anfibios.

Especie	Estadio	Concentración/ Tiempo	Valor	Referencia
Rana sphenocephala	Larva	CL50-96h	230µg/L	(Bridges *et al.* 2002)
Bufo boreas	Larva	CL50-96h	120 µg/L	(Bridges *et al.* 2002)
Rana catesbeiana		CL50-96h	2800 µg/L	(Lombardi *et al.* 2002)
Rana catesbeiana	Larva	CL50-96h	2400 µg/L	(Ferreira *et al.* 2004)
Bufo melanostictus	Larva	CL50-96h	320 µg/L	(Hoffman *et al.* 2003)
Rana hexadactyla	Larva	CL50-96h	39 µg/L	(Hoffman *et al.* 2003)
Rana pipiens	Embrión	CL50-8dias	50 µg/L	(Hoffman *et al.* 2003)
Rana pipiens	Adulto	CL50-72h	6370 µg/L	(Hoffman *et al.* 2003)

2.2.2. Conceptos generales del estrés oxidativo.

El surgimiento de los primeros organismos fotosintéticos generó un enriquecimiento atmosférico de oxígeno molecular (O_2) permitiendo el desarrollo del metabolismo aeróbico. La vida aeróbica presenta una enorme ventaja energética, con la utilización del oxígeno, respecto de los metabolismos fermentativos de los organismos anaeróbicos. Aunque, por otra parte, este aumento de oxígeno en la atmósfera presenta un aspecto negativo, la toxicidad, que condujo a través de la evolución a que los organismos desarrollen mecanismos de defensa contra los productos de las sucesivas reducciones monovalentes.

El oxígeno molecular (O_2) en su estado basal se encuentra como triplete, con sus dos electrones ligantes con “spins” paralelos, de esta manera por el fenómeno conocido como “Restricción de spin” solo puede reaccionar a velocidad apreciable con compuestos provistos también de electrones paralelos en sus orbitales de valencia, lo cual es infrecuente. Este fenómeno favorece el intercambio de un electrón, y como existen muchos procesos biológicos capaces de provocar reducciones monoelectrónicas, se genera sucesivamente anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$). Por otro lado, fenómenos de transferencia de energía pueden lograr la inversión de spin con producción de oxígeno singulete ($^1O_2$). Los radicales libres pueden definirse como moléculas o fragmentos de moléculas que presentan uno o más electrones desapareados. Este electrón desapareado, representado por un punto, generalmente les

confiere un considerable grado de reactividad. Los radicales derivados del oxígeno son los más importantes, aunque no los únicos, generados en los sistemas vivos. El término para referirse a los productos intermedios de reducción de oxígeno es: "Especies Reactivas del Oxígeno" o la sigla ROS provenientes del inglés "Reactive Oxygen Species". Este término incluye tanto a las especies radicalarias como a las no radicalarias (Lesser 2006). Desde el punto de vista de la química, cualquier compuesto, incluyendo el oxígeno, capaz de aceptar electrones es un oxidante o un agente oxidante. En contraposición, un compuesto capaz de donar electrones es un reductor o agente reductor. En general, una reacción química en la que una sustancia gana electrones se define como una reducción, mientras que la oxidación es un proceso en el que se produce una pérdida de electrones. Entonces, cuando un reductor dona sus electrones provoca que una sustancia se reduzca y cuando un oxidante acepta electrones hace que otra sustancia se oxide. Así, un proceso de oxidación, en el que se gana oxígeno, está siempre acompañado por un proceso de reducción donde hay generalmente pérdida de oxígeno. Estas reacciones son denominadas redox, y constituyen la base de numerosas vías bioquímicas, señalizaciones celulares, procesos de síntesis y vías de regulación. A los fines de la biología ambiental, los agentes reductores y oxidantes que interactúan con los organismos son definidos como antioxidantes y pro-oxidantes respectivamente (Kohen y Nyska 2002).

En 1985, Helmut Sies definió el estrés oxidativo como "Un desbalance entre la concentración de pro-oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros, con posibilidad de inducir potencial daño" (Jones 2006)

Existen numerosos procesos biológicos generadores de ROS que incluyen autooxidación, reacciones enzimáticas y fotoquímicas, muchos de ellos relacionados con componentes endógenos y varios exógenos como contaminantes ambientales, drogas, radiaciones UV y humo de cigarrillo. Potenciales fuentes endógenas incluyen a varias oxidasas, lipoxigenasas y deshidrogenadas. Una de las fuentes más importante de ROS es la cadena respiratoria en la mitocondria, las enzimas de la cadena de transporte de electrones son capaces de transferir los mismos al O_2 de manera accidental produciendo $O_2^{\cdot -}$. Además, existen numerosas fuentes celulares de ROS, como puede ser la xantino oxidasa, la activación del sistema inmune e inflamatorio, con los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos

que actúan mediante la producción de anión superóxido para causar la muerte bacteriana. Los macrófagos activados generan una gran variedad de ROS, incluyendo anión superóxido, oxido nítrico y peróxido de hidrógeno. Por otro lado, el citocromo P450, familia de proteínas hemo, que cataliza la oxidación de una amplia variedad de sustancias químicas, tiene una gran importancia porque está implicado en la activación o desactivación de muchos fármacos. El sistema oxida sustancias a productos más solubles que puedan ser fácilmente eliminados, y la interrupción o disociación del ciclo puede generar anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Los microsomas y peroxisomas son también fuente de ROS (Valko *et al.* 2006). A su vez, la exposición a factores ambientales como pesticidas y otro tipo de sustancias puede aumentar la producción de ROS y afectar el estado redox normal de las células (Ferrari *et al.* 2009). Si bien existen muchos blancos de acción, los más estudiados y los más representativos del daño son el ADN, los lípidos y las proteínas. Algunos ROS pueden reaccionar con componentes del ADN (Dizdaroglu *et al.* 2002) causando rupturas de simple y doble cadena, cambios de bases, modificaciones de la desoxiribosa y entrecruzamientos, incluso modificaciones posteriores pueden generar una gran variedad de bases y azúcares modificados, como bases con sitios libres, uniones ADN-proteínas. Las modificaciones del material genético que no logran ser corregidas por los mecanismos de reparación se convierten en permanentes y pueden detener la inducción de la transcripción y los patrones de transducción, causar errores en la replicación e inestabilidad genómica, produciendo finalmente mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento. Existen otros componentes celulares sensibles a la oxidación, como lipoproteínas, membranas celulares, y distintas estructuras que contienen lípidos, fosfolípidos insaturados, glicolípidos, colesterol. El grado de oxidación depende principalmente del contenido lipídico, que es el blanco directo, y del grado de instauración que presenten los ácidos grasos. A su vez, el OH• puede reaccionar con los hidrógenos de los carbonos de la estructura central de las proteínas produciendo la ruptura del enlace peptídico. A pesar de que las proteínas no funcionales por la oxidación son rápidamente removidas, algunas pueden acumularse con el tiempo y contribuir al daño.

El sistema antioxidante comprende un grupo de enzimas y moléculas antioxidantes de bajo peso molecular como la vitamina E, ácido ascórbico, glutatión reducido (GSH) y otros tioles no proteicos. Entre las enzimas, encontramos la superóxido

dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) en la primera línea de defensa. La SOD, descubierta originalmente por McCord y Fridovich, existe como distintas metaloproteínas con distribuciones celulares diferentes. Se trata de una de las enzimas intracelulares más efectivas, y es considerada como la primera barrera de defensa, cataliza la dismutación del anión superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, luego la CAT convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. A su vez, las enzimas dependientes del glutatión reducido (GSH) juegan un rol fundamental tanto en la detoxificación como en los procesos antioxidantes (Ferrari *et al.* 2009). La GSH-peroxidasa cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos convirtiendo la GSH en su forma disulfuro oxidada (GSSG). A su vez, GSSG es reciclada a GSH por la enzima glutatión reductasa usando NADPH como cofactor reductor. Por otro lado, la glutatión-S-Transferasa (GST) es una enzima de detoxificación de fase II, ya que cataliza la conjugación de GSH con una gran variedad de componentes electrofílicos. Adicionalmente, algunas GST juegan un rol importante en la detoxificación conjugando productos del desdoblamiento de lipoperóxidos (Ferrari *et al.* 2009). Además de su rol como co-factor, el GSH actúa directamente como neutralizante de ROS, contribuyendo al control del estado redox.

2.2.2.2. El estrés oxidativo en el desarrollo de los anfibios.

Las ROS parecieran estar involucradas en la regulación de la expresión génica diferencial, en la replicación celular, en la diferenciación y muerte celular programada, en parte, actuando como segundo mensajero en las vías de transducción de señales. De hecho, algunas citocinas, factores de crecimiento, hormonas y neurotrasmisores usan las ROS como segundo mensajero. Más aún, se cree que son los productos de peroxidación, como los metabolitos de los lípidos, los que podrían estar involucrados en la activación genética. Así, el rol del estrés oxidativo durante el desarrollo embrionario presenta varias aristas, y el control del balance de las ROS resulta fundamental, ya que por un lado las ROS pueden regular la circulación, el metabolismo energético, y la división y remodelación celular, llevando al correcto desarrollo embrionario a través de la señalización específica y la inducción genética; aunque por otro lado, un aumento en las ROS, mayor al “rango fisiológico” puede inducir daños severos que pueden retrasar o alterar el normal desarrollo, causando tanto muerte, como malformaciones o patologías futuras (Rizzo *et al.* 2007). Para

Rhinella arenarum se ha informado que el estrés oxidativo puede causar el detenimiento del desarrollo y malformaciones severas como anormalidades en la cola, edemas abdominales, reducción del desarrollo de la cabeza y estructuras dorsales curvadas (Mussi y Calcaterra 2010). También ha sido informada la importancia fisiológica del estrés oxidativo en la remodelación del intestino y la reabsorción de la cola durante la metamorfosis (Menon y Rozman 2007). De esta forma, las defensas antioxidantes son esenciales durante el desarrollo embrionario ya que el aumento de las ROS pueden alterar el normal desarrollo y causar malformaciones (Ferrari *et al.* 2009). Las enzimas SOD y CAT se han propuesto como la principal defensa antioxidante durante los primeros estadios del desarrollo tanto para *Xenopus laevis* como para *Rhinella arenarum*, mientras que el contenido de GSH y la actividad de varias enzimas relacionadas con su metabolismo aumentarían durante el desarrollo, cuando las branquias están totalmente desarrolladas en el caso de *R. arenarum* y después de la eclosión para *X. laevis,* mostrando una regulación ambiental (Ferrari *et al.* 2008; Rizzo *et al.* 2007). Así para *Rhinella arenarum,* los altos valores de SOD y CAT encontrados tanto en los oocitos como en los estadios tempranos serían atribuidos al stock maternal de proteínas y al ARN mensajero previos a la fecundación. Sin embargo, cuando los embriones presentan el sistema circulatorio activo e intercambian oxígeno por las branquias, lo que aumenta la exposición y el desafío al oxígeno, se observa un aumento en la actividad de SOD, lo que marcaría un control ambiental de la enzima (Ferrari *et al.* 2008).

2.2.2.3. El cobre como generador de estrés oxidativo.

En 1894, Fenton propuso que la mezcla de un metal de transición, particularmente la sal de hierro, con peróxido de hidrogeno (H_2O_2) puede formar radicales hidroxilos $OH^{\bullet}$ (Reacción de Fenton, ecuación 2.1.). En 1934, Haber y Weis plantearon la posibilidad de que más radicales hidroxilos fueran generados de la interacción del peróxido de hidrógeno y el superóxido (Ecuación 2.2.). El cobre, como otros metales de transición, puede alternar su estado de oxidación de Cu a Cu^{2+}, transfiriendo electrones desapareados, y por lo tanto, generando reacciones de óxido-reducción. Así, es capaz de generar ROS, participando en el lugar del hierro en la reacción de Fenton y a través de la reacción de Haber y Weis en presencia de superóxido y peróxido de hidrógeno (Ecuaciones 2.3. y 2.4.). A su vez, el

exceso de cobre reduce los grupos tiol de las proteínas, alterando de esta forma su estructura y actividad. De esta manera, es capaz de producir un desequilibrio entre la concentración de pro-oxidantes y antioxidantes, llevando a una situación de estrés oxidativo (Stohs y Bagchi 1995). El cobre, juega un rol importante en la peroxidación lipídica mayormente por medio de la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos (LOOH)(Hermes-Lima 2004), pudiendo subsecuentemente promover la carcinogénesis. De esta manera, la peroxidación lipídica ha sido utilizada como mecanismo de inducción de estrés oxidativo por exposición a xenobióticos, especialmente a metales de transición, como el cobre. En los últimos años muchos estudios ecotoxicológicos investigaron el daño producido por radicales libres y parámetros de estrés oxidativo en varias especies de peces expuestos a metales, entre ellos el cobre. Las exposiciones aumentaron el malondialdehído (MDA), subproducto del ataque de las especies reactivas de oxígeno a las membranas lipídicas, afectando también el crecimiento. A su vez, se ha visto que la exposición a altas concentraciones de cobre redujo la actividad de las enzimas antioxidantes (Valavanidisa *et al.* 2006). El cobre también puede reducir las defensas celulares antioxidantes, inhibiendo los procesos normales por los que las ROS son removidas. Así en la exposición a cobre de *Rana ridibunda*, el daño lipídico evaluado por MDA estuvo positivamente correlacionado con el tiempo de exposición, mientras que los valores de GSH estuvieron negativamente correlacionados (Papadimitriou y Loumbourdis 2002).

$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$ (Ecuación 2.1.)

$O_2\cdot^- + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^- + OH^{\cdot}$ (Ecuación 2.2.)

$O_2\cdot^- + Cu^{2+} \longrightarrow O_2 + Cu^+$ (Ecuación 2.3.)

$Cu^+ + H_2O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + OH^- + OH^{\cdot}$ (Ecuación 2.4.)

2.2.3. Evaluación de la sensibilidad de larvas de anfibios obtenidos de un ecosistema urbano contaminado.

El Reconquista es un río del conurbano de la Provincia de Buenos Aires que tiene sus nacientes en el Partido de Moreno donde sus principales afluentes, los arroyos Durazno, La Choza y La Horqueta, sumados a otros numerosos cursos menores le dan origen. Cercano a la cabecera se ha construido la presa Ing. Roggero con un embalse que controla las crecidas del río. Aguas abajo recibe la descarga de los arroyos: del Sauce, Torres, Las Catonas, Los Berros, Morón (éste a su vez recibe la descarga de una parte de la cuenca superior del arroyo Maldonado y Basualdo). El Río Reconquista desemboca en el Río Luján en un 90 % de su caudal a través del Canal Aliviador, constituyendo la principal vía de desembocadura del Río Reconquista al Río Luján, aportándole a este último, aguas con una alta carga contaminante, tanto orgánica como inorgánica; mientras que el 10 % restante lo hace siguiendo el Reconquista Chico y el Río Tigre (Figura 2.1.). El Canal Aliviador tiene una extensión de 5 km y fue construido originalmente con objetivos de hidráulica como consecuencia de las reiteradas inundaciones en la zona más baja de la cuenca del Reconquista, y actualmente está destinado a la práctica deportiva utilizándose como Pista Nacional de Canotaje, Remo y Esquí acuático.

El Río Reconquista atraviesa 84 kilómetros de zona urbano-industrial, con rumbo dominante SO-NE y su cuenca ocupa un área aproximada de 167.000 hectáreas abarcando 18 partidos del Gran Buenos Aires (Defensoría del Pueblo de la Nación 2007). La cuenca inferior del mismo recibe los efluentes no tratados de alrededor de 12.000 industrias y los desechos cloacales correspondientes a más de 3 millones de personas, con tratamiento inadecuado o nulo. Se ha informado concentraciones de metales pesados en aguas del Reconquista, muy por encima de los valores permitidos para preservar la vida acuática, como así también altos niveles de plaguicidas organoclorados, y concentraciones de oxígeno disuelto cercanas a cero, que junto con el reducido flujo de su caudal, exceden por mucho la capacidad de autodepuración del Río (Suárez y Lombardo 2004).

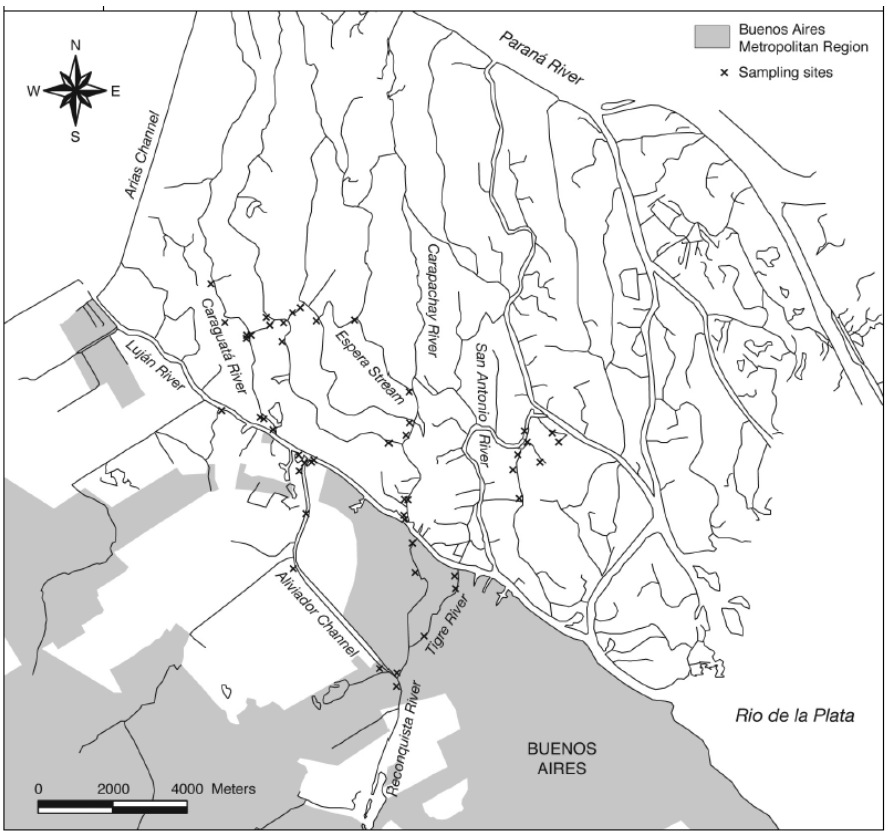


Figura 2.1.: Mapa del Río Reconquista en su desembocadura en el Río Lujan a través del Canal Aliviador, del Reconquista Chico y del Río Tigre, con las influencias del Río de la Plata y del Río Paraná.

Al tratarse de un río de llanura con su desembocadura muy próxima al Río de la Plata, tiene una velocidad de escurrimiento baja, y la dinámica de las aguas contaminadas provenientes del Río Reconquista, en su tramo final, responde a una variedad de factores, entre ellos, las lluvias en los tramos medio y alto de la cuenca; las fluctuaciones de las mareas con influencia en el Río de la Plata, el cual fluctúa aproximadamente cada 6 horas y las "Sudestadas" (vientos fuertes del sudeste) que impiden el flujo normal de las aguas del Río de la Plata hacia el mar, provocando una acumulación hacia la costa del delta y fuertes inundaciones de la zona (Suárez y Lombardo 2004). El avance de las urbanizaciones y las actividades productivas han producido una fuerte transformación del ambiente del río, que sumada a la contaminación condicionan tanto en cantidad como en diversidad la biota acuática, siendo los anfibios los más perjudicados (Defensoría del Pueblo de la Nación 2007). Frente a la transformación del ambiente, las especies que sobreviven lo hacen en

base a una determinada capacidad de adaptación o aclimatación a la contaminación (Newman 1998). La existencia de diversos factores de exposición en cada ambiente, posibilita que las poblaciones difieran en sus adaptaciones y aclimataciones.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1 Obtención de material biológico

Los embriones de *Rhinella arenarum* (sapo común americano) se obtuvieron por fecundación artificial a partir de parejas de animales adultos.

2.3.1.1 Obtención y selección de adultos.

Los individuos adultos fueron capturados en los alrededores de la localidad de Lobos (35º 11´ S; 59º 05´ O), provincia de Buenos Aires, Argentina.

Se realizó una selección de animales saludables, sexualmente maduros, con pesos mayores a 220g para las hembras y 150g para los machos.

2.3.1.2. Mantenimiento de adultos.

Los adultos fueron mantenidos, por cortos períodos de tiempo, en un bioterio dentro de jaulas acondicionadas, a 20 ± 1 º C y con un fotoperíodo de 14/10(Luz / Oscuridad).

2.3.1.3. Ovulación y fecundación.

Se indujo la ovulación de hembras adultas por la administración de una inyección subcutánea de una suspensión conteniendo el macerado de una hipófisis homóloga por hembra (Pisanó 1956) en 1ml de solución ANFITOX (SA; NaCl 36mg/L; KCl 0,5mg/L;

CaCl 1mg/L; $NaHCO_3$ 2mg/L) (Herkovits y Pérez-Coll 1999)o por la inyección de hormona heteróloga, 2500 unidades internacionales de gonadotrofina coriónica humana (Marca comercial Gonacor). Durante las horas subsiguientes (en general, de 16 a 20 horas después) las hembras comenzaron a ovular. En ese momento las hembras fueron desmeduladas. Se masajearon para completar la expulsión de los oocitos que eran liberados dentro de las ristras de gelatina, mientras que para obtener los oocitos remanentes en los ovisacos, se abrieron los individuos ventralmente haciendo un corte longitudinal (parasagital) desde caudal hacia cefálico tratando de no cercenar los vasos sanguíneos grandes y fueron extraídos.

Las ristras de oocitos fueron dispuestas en bandejas plásticas humedecidas con SA, asegurando la disponibilidad de oxígeno y medio fresco.

Una vez iniciada la ovulación se practicó la desmedulación de los machos, se abrieron ventralmente haciendo un corte longitudinal (parasagital) desde caudal hacia cefálico tratando de no cercenar los vasos sanguíneos grandes, se extrajeron los testículos (retroperitoneales), que fueron macerados en SA con el fin de obtener una suspensión de espermatozoides al 10%. La viabilidad de los espermatozoides fue comprobada por observación de la motilidad y morfología al microscopio óptico. Así, los oocitos fueron fecundados *in vitro* mediante el pincelado suave de la suspensión de espermatozoides.

Los embriones se mantuvieron en SA a 20 ± 2°C en bandejas plásticas, de 50 x 25 x 5 cm de profundidad conteniendo 5 litros de SA, hasta alcanzar el estadio requerido para cada protocolo experimental. Los estadios embrionarios y larvales fueron definidos de acuerdo a Del Conte and Sirlin (1951) y Echeverría y Fiorito de López (1981) (ANEXO), respectivamente. La SA fue renovada y los embriones detenidos o muertos fueron registrados y retirados diariamente.

Los embriones utilizados antes de la eclosión (E.18, Respuesta Muscular) fueron degelatinizados, 2h después de la fecundación, con una solución de ácido tioglicólico al 2% en SA, neutralizada a pH 7,2-7,4 con 1,35 % v/v de NaOH saturada, luego de lo cual, los oocitos fueron exhaustivamente lavados con SA (2 lavados con 500ml) para evitar los efectos nocivos del ácido. Para los embriones en estadio posteclosionales, no fue necesario

este tratamiento, ya que los mismos eclosionan de la membrana vitelina y de la gelatina, siendo mantenidos en SA hasta el estadio en que se utilizaron para los bioensayos.

2.3.2. Criterio de aceptación del material biológico.

La calidad y fecundidad de los huevos fue evaluada diariamente, considerándose aceptable una tasa de fertilidad mayor al 75 % y más de un 70% de sobrevida de embriones normales al alcanzarse el estadio de néurula (E.13)(Herkovits y Pérez-Coll 1999).

2.3.3. Protocolos experimentales

Entre los años 2007 y 2011 se realizaron los bioensayos con embriones y larvas provenientes de parejas independientes, habiendo repetido, como mínimo tres veces, cada uno de los protocolos experimentales que se describen a continuación. Algunos de los bioensayos de exposición al cobre, fueron repetidos hasta siete veces, usando embriones y larvas de diferentes camadas.

2.3.3.1. Exposición continua.

Se aplicó el conjunto de bioensayos estandarizados ANFITOX (Herkovits y Pérez-Coll 1999).

ANFIEMB: Test para estadios tempranos del desarrollo. Utiliza embriones en estadio de Blástula temprana (E.4), expuestos a 20 ± 2°C durante 168 h (7 días), lo que permite completar el desarrollo embrionario para *Rhinella arenarum*. La exposición durante el periodo organogénico permite evaluar como puntos finales, tanto la mortalidad como las malformaciones, el retraso en el desarrollo y la reducción en la talla. Este test es homologable al “early-life-stage” FETAX (ASTM 1993a), que utiliza embriones de

Xenopus laevis por un período de exposición de 96 h a 27°C, condiciones en las cuales dichos individuos alcanzan los estadios finales del desarrollo embrionario.

ANFIAGU: Test agudo. Utiliza individuos de *Rhinella arenarum* en los estadios finales de su desarrollo (E.25), evalúa la letalidad aguda para evaluar toxicidad hasta las 96 h de exposición, considerando que los estándares internacionales reconocen como agudos los test hasta las 96 h de tratamiento.

ANFICOR: Test crónico corto. Utiliza individuos de *Rhinella arenarum* en los estadios finales del desarrollo (E.25) para evaluar la toxicidad hasta las 168h (7 días) de exposición. Si bien el periodo organogénico en esta etapa del desarrollo está culminado y no es recomendable para evaluar efectos teratogénicos, permite la evaluación en las anomalías en el comportamiento.

Adicionalmente, se realizaron bioensayos de toxicidad aguda, crónica corta y crónica utilizando larvas en estadio de esbozo de miembros posteriores (S.28) de *Rhinella arenarum* para evaluar la toxicidad hasta las 96 h, 168 h y 240 h. Si bien el periodo organogénico en esta etapa del desarrollo está culminado y no es recomendable para evaluar efectos teratogénicos, se utilizó este estadio como referencia de la toxicidad durante el periodo larval más avanzado, más allá del final del desarrollo embrionario y previo a la metamorfosis.

Por otro lado, se realizaron bioensayos de toxicidad crónica utilizando embriones en estadio de blástula temprana (E.4) de *Rhinella arenarum* hasta completar la metamorfosis. Se consideró que un individuo había culminado la metamorfosis cuando habiendo desarrollado los miembros posteriores y habiendo salido los anteriores, sufrió la reducción completa de la cola.

En este caso el bioensayo se prolongó por 1848 h (77 días), cuando el 80 % de los individuos controles de los expuestos desde el inicio del tratamiento habían concluido la metamorfosis. Este test es comparable al ANFIEMB pero más prolongado en el tiempo de exposición. La diferencia radica en que en estos bioensayos no solo se registró la letalidad, si no el tiempo requerido y el peso de los individuos al alcanzar la metamorfosis, así como el porcentaje acumulado de individuos que lograron metamorfosear. Estos datos también

fueron expresados como Peso Medio a la Metamorfosis (PMM) que es un promedio del peso alcanzado por el 50% de los individuos que metamorfosearon y el Tiempo Medio de Metamorfosis (TMM), que es un promedio del tiempo necesario para que el 50% de los individuos concluyan la metamorfosis.

2.3.3.2. Exposición por 24 horas al cobre a partir de distintos estadios del desarrollo embrionario y larval.

A fin de evaluar la susceptibilidad diferencial en las distintas etapas del ciclo de vida de *Rhinella arenarum* se realizaron bioensayos de exposición por pulso de 24 h durante el periodo embrionario, organogénico y larval. A su vez, estos bioensayos simulan la exposición "por pulsos" que ocurre con cierta frecuencia en los cuerpos receptores, particularmente en situaciones de accidentes ecotoxicológicos.

Para estos bioensayos se utilizaron embriones y larvas en estadio de Blástula (E.4), Gástrula (E.11), Placa Neural (E.13), Surco Neural (E.14), Brote Caudal (E.17), Respuesta Muscular (E.18), Circulación Branquial (E.20), Boca Abierta (E.21), Pliegue Opercular (E.23), Opérculo Cerrado en la Derecha (E.24), Opérculo Completo (E.25) y esbozo de los miembros posteriores (E.28), los cuales fueron expuestos a diferentes concentraciones de cobre por 24 h, luego de lo cual fueron exhaustivamente lavados con 200ml de SA y mantenidos en SA hasta las 168h.

2.3.4. Condiciones generales de los tratamientos.

Para cada condición experimental, según el método estandarizado ANFITOX (Herkovits y Pérez-Coll 1999), se colocaron 10 embriones por triplicado, en cámaras formadas por aposición de dos cápsulas de Petri de igual tamaño (diámetro: 10 cm) con 40 ml de solución, asegurando la disponibilidad de oxígeno y medio fresco. Simultáneamente, se mantuvieron individuos control en SA.

En el caso de las larvas desde el estadio de esbozo de los miembros posteriores (E.28), se colocan 10 larvas por triplicado en cámaras formadas por aposición de dos cápsulas de Petri de igual tamaño (20 cm) 200 ml de solución, asegurando la disponibilidad de oxígeno y medio fresco. Simultáneamente, se mantuvieron individuos control en SA.

Las soluciones fueron renovadas cada 48 h y la temperatura mantenida a 20 ± 2ºC con un fotoperíodo de 14/10 (Luz / Oscuridad). Los efectos letales y subletales fueron evaluados cada 24 h, y se retiraron los individuos muertos. Las larvas desde el final del desarrollo embrionario o comienzo del desarrollo larval, el estadio de opérculo completo (E.25) en adelante fueron alimentadas con tres gránulos de alimento balanceado para peces (Tetramin-Tetra®) cada 10 larvas, cada dos días.

2.3.5. Evaluación de los efectos teratogénicos.

Se evaluaron los efectos teratogénicos mediante un microscopio estereoscópico (ME) Zeiss Stemi DV4, registrándose frecuencia y tipo de malformaciones diariamente. Con los datos obtenidos se obtuvieron los índices teratogénicos, los cuales fueron calculados como el cociente entre la CL50/CE50 a un tiempo de exposición determinado (Dawson y Bantle 1987). Cuando no se pudo obtener el índice teratogénico se estimó el potencial teratogénico, como la relación entre el valor NOEC para la letalidad y para las malformaciones a un tiempo de exposición determinado (Aronzon *et al.* 2011a).

Los embriones y larvas fueron fotografiados mediante una cámara Sony DSC-S90 montada en el microscopio estereoscópico. Para la observación de las ultraestructuras, los embriones fueron fijados en formol al 4%, luego deshidratados en un gradiente creciente de acetona y preparados para microscopia electrónica de barrido (MEB) mediante la técnica del punto crítico, y se observaron en un equipo JEOL 5800LV de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la Universidad Nacional del Nordeste.

2.3.6. Evaluación de la sensibilidad al cobre de larvas de anfibio obtenidas en ecosistemas urbanos contaminados.

Durante los meses de Octubre/Noviembre de los años 2008 y 2009 se identificaron 3 charcas temporarias de apareamiento de *Rhinella arenarum*, una ubicada en la zona aledaña al Canal Aliviador (sitio CA), otra en el último tramo del Río Reconquista (sitio RR) y otra en el parque industrial de Tigre (PI), (Figura 2.2.). La Tabla 2.3. informa sobre la ubicación exacta y las mediciones realizadas en cada charca. Las poblaciones de anfibios de las tres charcas se encuentran físicamente separadas por una importante zona de urbanización. Tanto en el caso del sitio CA, como el PI se observó, en la misma época, el apareamiento de *Rhinella fernadezae*. Se visitó los lugares repetidamente, verificando los masivos cantos de apareamiento de los machos inmediatamente después de los períodos de fuertes lluvias y la respuesta de las hembras, generalmente un día después. Se seleccionaron al azar tres parejas en amplexo de cada sitio y se retiró parte de cada una las puestas que estaban realizando en el momento. Las ristras fueron colocadas cuidadosamente, con el agua circundante, en bolsas de polietileno y llevadas al laboratorio donde se pasaron a SA para la observación de su desarrollo embrionario, bajo las condiciones descritas por el protocolo ANFITOX.

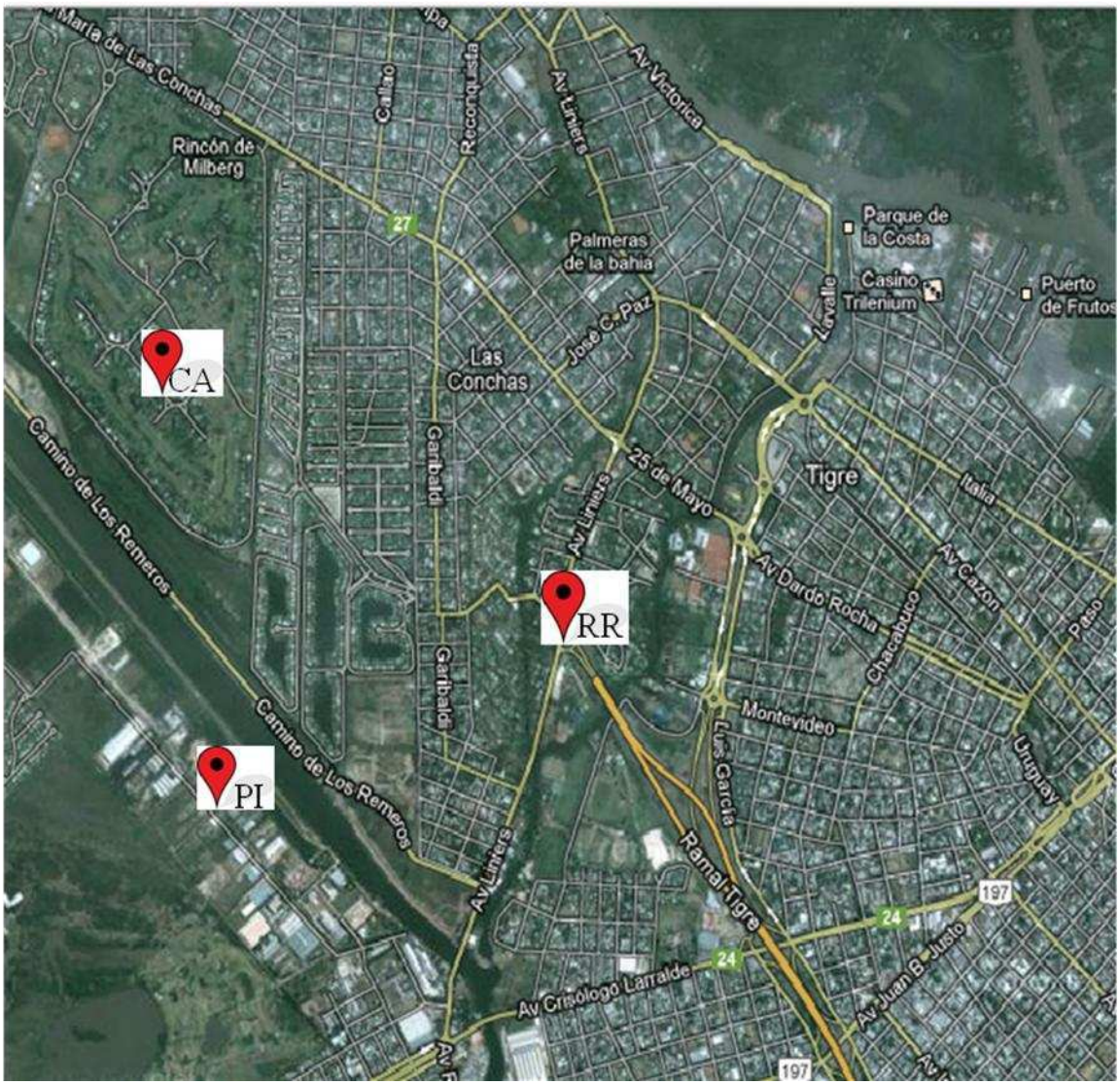


Figura 2.2.: Vista aérea de los sitios de muestreo (marcas rojas). Canal Aliviador (sitio CA), último tramo del Río Reconquista (sitio RR) y Parque Industrial de Tigre (PI). Distancias entre sitios de muestreo: CA-RR: 2,04 km; RR-PI: 1,51 km; PI-CA: 1,71 km.

Tabla 2.3.: Información de las tres charcas de muestreo (CA, RR y PI). Puestas *Rhinella arenarum* (*R.a*) y *Rhinella frenandezae* (*R.f*).

Sitios	CA	RR	PI
Latitud	34°25'13.55"S	34°25'52.88"S	34°26'08.91"S
Longitud	58°36'36.15"O	58°35'31.60"O	58°26'38.08"O
Puestas de *Rhinella arenarum*	3	3	3
Puestas de *Rhinella fernandezae.*	3	0	3
T (°C)	19,3	21,7	19,6
pH	5,8	6	5,8
Conductividad (µS)	264	283	87

El porcentaje de fecundación de todas las ovulaciones fue en todos los casos mayor al 90 %. Una vez alcanzado el estadio de opérculo completo (E.25), se seleccionaron al azar individuos de cada puesta para la realización de los bioensayos estandarizados siguiendo el protocolo ANFICRO, bioensayo de toxicidad crónica de hasta 14 días de exposición, en el que se evalúa la letalidad. El mismo se inició al finalizar el desarrollo embrionario (E.25). En este caso para evaluar la toxicidad del cobre se utilizaron 5 concentraciones en un rango de 30 a 105 µg Cu^{2+}/L. Los bioensayos se realizaron por triplicado para cada una de las tres puestas, provenientes de los tres sitios muestreados. Para todas las condiciones, las soluciones se renovaron cada dos días, como así también se alimentó a las larvas con tres gránulos de alimento balanceado para peces (Tetramin-Tetra®) cada 10 larvas, siguiendo las condiciones generales de los bioensayos (Sección 2.3.4.). La sobrevida se evaluó diariamente, de acuerdo a lo descrito en el protocolo ANFITOX.

2.3.7. Evaluación de parámetros relacionados con el estrés oxidativo.

2.3.7.1. Evaluación de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en diferentes estadios del desarrollo de *Rhinella arenarum*.

Con el fin de evaluar distintos parámetros relacionados con el estrés oxidativo se expusieron grupos de 20 a 60 embriones por triplicado en los estadios de Blástula (E.4), Gástrula (E.11), Brote Caudal (E.17), Circulación en la Aleta (E.22) y Opérculo Completo (E.25) a concentraciones de 7,50 µg Cu^{2+}/L y 15 µg Cu^{2+}/L en placas de Petri de 15 cm de diámetro manteniendo siempre la carga de 4 ml/embrión. Los diseños experimentales se repitieron con al menos tres puestas independientes. Para todas las condiciones, las soluciones se renovaron cada dos días, así como también se alimentó a las larvas con tres gránulos de alimento balanceado para peces (Tetramin-Tetra®) cada 10 larvas, siguiendo las condiciones generales de los bioensayos (Sección 2.3.4.).

2.3.7.2. Evaluación de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en larvas de *Rhinella arenarum* en estadio de opérculo completo (E.25) expuestas a cobre en forma crónica.

A tal fin se expusieron larvas al finalizar el desarrollo embrionario, estadio de opérculo completo, a concentraciones de 30 Cu^{2+}/L y 45 Cu^{2+}/L en grupos de 20 a 60 larvas por triplicado en placas de Petri de 15 cm de diámetro manteniendo siempre la carga de 4 ml/embrión, durante 14 días (336h). Los diseños experimentales se repitieron con al menos tres puestas independientes. Para todas las condiciones, las soluciones se renovaron cada dos días, así como también se alimentó a las larvas con tres gránulos de alimento balanceado para peces (Tetramin-Tetra®) cada 10 larvas, siguiendo las condiciones generales de los bioensayos (Sección 2.3.4).

2.3.7.3. Evaluación de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en larvas de anfibio obtenidas en ecosistemas urbanos contaminados.

Con el fin de evaluar distintos parámetros relacionados con el estrés oxidativo se expusieron larvas al finalizar el desarrollo embrionario, estadio de opérculo completo (E.25), a concentraciones de cobre de 30 Cu^{2+}/L y 45 Cu^{2+}/L en grupos de 20 a 60 larvas por triplicado en placas de Petri de 15 cm de diámetro manteniendo siempre la carga de 4 ml/larvas, durante 14 días (336h). Las larvas fueron obtenidas durante los meses de Octubre/Noviembre de los años 2008 y 2009 en la zona aledaña al Canal Aliviador (sitio CA), otra en el último tramo del Río Reconquista (sitio RR). Para todas las condiciones, las soluciones se renovaron cada dos días, como así también se alimentó a las larvas con tres gránulos de alimento balanceado para peces (Tetramin-Tetra®) cada 10 larvas, siguiendo las condiciones generales de los bioensayos (Sección 2.3.4.)

2.3.8. Protocolos para las determinaciones de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo

Una vez finalizados los bioensayos, tanto los embriones como las larvas expuestos y controles fueron lavados y congelados a -20ºC. Dado que la masa corporal se ve incrementada por el contenido de agua, a medida que avanzaba el desarrollo embrionario (ANEXO), las muestras se resuspendieron por igual, a razón de 25 embriones o larvas por ml (volumen final) en una solución isotónica de KCl (0,154 M) conteniendo fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) 0,5 mM y Benzamidina 0,2 mM como inhibidores de proteasas. Se procedió a homogeneizarlos, sobre baño de hielo, por cavitación en un potter mediante un homogeneizador eléctrico. En los casos en los que los tratamientos abarcaron estadios embrionarios, dado que hubo un efecto sobre la masa corporal, las larvas se resuspendieron en la misma solución isotónica de KCl, pero en una proporción 1:5 (p/v). Se fraccionaron alícuotas de los homogenatos totales para la determinación de proteínas totales y de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para las otras mediciones las

muestras fueron centrifugadas durante 20 minutos a 11.000 x g a fin de recuperar la fracción citosólica (sobrenadante). Las determinaciones de realizaron en un espectrofotómetro de doble haz UV-Vis Shimadzu.

2.3.8.1. Proteínas Totales

Con el fin de medir las proteínas totales se empleó el método de Bradford (1976). El fundamento de dicho método consiste en la absorbancia de una muestra ácida de Coomassie Brilliant Blue, la cual cambia su pico de absorción de 465 a 595 nm al unirse a proteínas. De esta forma se realiza una curva de calibración a partir de una muestra conocida a partir de una solución 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA). Todas las determinaciones se hicieron por duplicado en un volumen final de 1,1 ml conteniendo:

- 40 mg/L Coomassie Brilliant Blue G-250 en etanol absoluto (0,08 % p/v).
- Acido fosfórico 8,5 %.
- 2,5 a 5,0 µL de muestra.

Así, la concentración final de proteínas en la muestra se calculó mediante la aplicación de la siguiente ecuación (2.5):

$$[\text{proteínas}]\ (\text{mg/mL}) = (Am - Ab) \times f \times 1/a$$

Donde, Am y Ab son las absorbancias a 595nm de la muestra y del blanco, respectivamente. “f” es la inversa de la tangente, y “a” representa el volumen de la alícuota ensayada,

El valor de la Abs_{595} en la ecuación de la curva de calibración es en el rango de 0 a 8 µg/mL.

2.3.8.2. Sustancias Reactivas con el Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

Con el fin de evaluar y cuantificar la peroxidación lipídica, se determinó las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico, entre las cuales es preponderante el malondialdehído (MDA), como subproducto del ataque de las especies reactivas de oxígeno con las membranas lipídicas (Buege *et al.* 1978). Este método es ampliamente utilizado, desde hace décadas, y aunque presenta ciertas limitaciones, es considerado por ser sencillo y un muy buen marcador positivo del daño a lípidos por las especies reactivas de oxígeno.

En eppendorf con tapas perforadas, se colocó una alícuota del homogenato total previamente obtenido, luego de lo cual se agrego 1 ml de reactivo conteniendo:

- Ácido Tiobarbitúrico 0,375 % v/v
- Ácido Tricloroacético 15 % v/v
- Ácido Clorhídrico 0,25 N
- Butilhidroxitolueno 680 µM en etanol absoluto (0,15 % p/v)

Luego, se calentó a "baño maría" a 100°C durante 15 minutos. Se enfrió en hielo y se centrifugó durante 10 min a 10.000 x g. Posteriormente, se determinó la absorbancia del sobrenadante a 535 nm. Se calculó la concentración de TBARS según la fórmula

$$nmol\ TBARS = \frac{Abs_{535} - Abs\ blanco_{535}}{\Sigma \ * \ V_m}$$ (Ecuación 2.6)

Donde, "Σ" es el Coeficiente de extinción molar, igual a 15,6. Y "Vm" es el Volumen de la muestra, en este caso el homogenato total, que es igual a 0,125 ml.

2.3.8.3. Actividad Catalasa.

La enzima catalasa interviene en la dismutación del peróxido de hidrógeno, convirtiéndolo en agua y oxígeno. (Ecuación 2.7)

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\textit{Catalasa}} 2H_2O + O_2 \quad \text{(Ecuación 2.7.)}$$

La actividad de la enzima catalasa se determinó por el método de Aebi (1984), basado en el método de Luck (1963), el cual consiste en la detección de la desaparición del peróxido de hidrógeno, sustrato de esta enzima. La reacción enzimática se realizó en un volumen final de 800 µl a temperatura ambiente y a un pH de 7,4 en un buffer fosfato de potasio 0,05 M. Se agregó de 20 a 40 µl de muestra y se inició la reacción mediante la adición de 10 µl de H_2O_2 3 M (concentración final en la cubeta 37,5 mM). Se registró inmediatamente el decaimiento inicial del peróxido cada 4 segundos durante 20 segundos, mediante la medición de la absorbancia a 240 nm.

La actividad CAT se obtiene en nanomoles a partir de la ecuación (2.8) de velocidad de una reacción de primer orden.

$$V = k \times [H_2O_2] = K \times [CAT] \times [H_2O_2] \rightarrow [CAT] = v/K \times [H_2O_2] \qquad \text{Ecuación (2.8)}$$

Donde v es la pendiente de la curva de caída de la concentración de H_2O_2 (Velocidad inicial a t0) y K la constante específica de la reacción (4,6 x 107 M^{-1} x s^{-1}).

A baja concentración de sustrato (no saturante), la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno por la CAT (medida a tiempos muy cortos, ≤ 30 seg.) se comporta como una reacción de primer orden. En este caso, se aplica este criterio, empleando el método de Aebi (1984), pero asumiendo que la actividad es proporcional a la concentración de sustrato consumido.

2.3.8.4. Actividad Superóxido Dismutasa:

La enzima superóxido dismutasa cataliza la dismutación de radical superóxido para dar como producto peróxido de hidrógeno (Ecuación 2.9)

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{\text{Superóxido Dismutasa}} H_2O_2 + O_2 \quad \text{(Ecuación 2.9.)}$$

La técnica para la medición de la actividad SOD se basa en la capacidad de la enzima para inhibir la reducción fotoquímica del Nitro blue tetrazolium (NBT). Así, se define como Unidad enzimática (UE) la cantidad de enzima que es capaz de producir un 50 % de inhibición en la velocidad de reducción fotoquímica del NBT (Beauchamp y Fridovich 1971).

La metodología del ensayo consiste en utilizar eventos fotoquímicos para generar aniones superóxido ($O_2^{\cdot -}$) a partir de la oxidación de riboflavina. Este anión se puede detectar haciéndolo reaccionar con NBT, que al oxidarse da como producto azul de formazán (AF). Cuando está presente en la muestra la enzima SOD se inhibe la formación de AF, por disminución de la concentración del $O_2^{\cdot -}$ del medio, por lo que la disminución de la velocidad de reacción es función de la actividad enzimática.

Para llevar a cabo la medición, se agregaron 2,5 ml de reactivo conteniendo:

- Metionina 13 mM.
- EDTA 0,1 mM.
- NBT 75 µM.
- Buffer fosfato de potasio 0,05 M a pH 7,4

Luego, se colocaron alícuotas de 10, 20, 50 y 100 µl de sobrenadante y se llevó a 2,95 ml con Buffer, y se agregó 50 µl de riboflavina 130 µM (la concentración final en la cubeta fue 2,15 µM). Se agitaron e inmediatamente se incubaron durante 10 minutos bajo un iluminador de 2 tubos fluorescentes de 15W, a una altura de 20 cm sobre los tubos. Se taparon con un paño negro, hasta el momento de determinar la absorbancia a 560 nm.

Para el cálculo de la actividad SOD se obtuvo gráficamente la pendiente de la recta formada a partir de los valores expresados como porcentaje de inhibición (respecto del control sin muestra enzimática (0% de inhibición de la reducción del NBT)) en función del volumen de muestra enzimática. De esta manera, se calculó la cantidad de enzima contenida en el volumen de muestra que produce un 50 % de inhibición de la reducción fotoquímica y se consideró que contiene 1 Unidad SOD.

2.3.8.5. Actividad Glutation-S-Transferasa.

La enzima glutatión-S-transferasa cataliza las reacciones de conjugación con el glutatión reducido (GSH) neutralizando de este modo los agentes oxidantes (Ecuación 2.10).

$$RX + GSH \xrightarrow{\textit{Glutation-S-Transferasa}} HX + R\text{-}S\text{-}GSH \quad \text{(Ecuación 2.10)}$$

La actividad de esta enzima fue determinada en base al método descrito por Habig *et al* (1974), midiendo la conjugación del GSH con 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) espectrofotométricamente. La reacción se realizó a temperatura ambiente y a diferencia de la técnica original, en la cual el pH es de 6,5, se utilizó un buffer fosfato de potasio 0,05M ligeramente básico (pH 7,4). Esta modificación se introdujo en base a observaciones experimentales, las cuales mostraron a pH 7,4 una actividad cercana al orden de magnitud mayor que la actividad registrada a pH 6,5. El volumen final de reacción fue de 1 ml, conteniendo 50 µL de la muestra con:

- CDNB 0,1 nM en etanol absoluto (2,05 % p/v).
- Buffer fosfato de potasio 0,05 M - pH 7,4.

La reacción fue iniciada al agregar CDNB e inmediatamente se registró la formación del complejo CDNB-S-GSH, a una longitud de onda de 340 nm, durante 1 minuto por intervalos de 5 segundos. La actividad enzimática, expresada como UE, se calculó mediante la fórmula (2.11)

$$UE = \frac{Pte_{340nm} * V_c}{\varepsilon * V_m} \qquad \text{(Ecuación 2.11)}$$

Donde "Ɛ" es el coeficiente de extinción molar = 9,6 M^{-1}. "*Vc*" es el volumen final en la cubeta, de 1ml en este caso y "*Vm*" es el volumen de muestra (sobrenadante), que en este caso fue de 0,05 mL.

2.3.8.6. Glutation reducido (GSH).

El tripéptido glutation (γ-Glu-CysH-Gly) representa la principal fuente de grupos tioles intracelulares y es el péptido de bajo peso molecular más abundante (Meister y Anderson 1983). Su estructura le confiere una alta capacidad reductora, pudiendo donar electrones para romper puentes disulfuros y reducir especies reactivas de oxígeno. La forma oxidada es el glutatión disulfuro (GSSG) el cual es reducido constitutivamente por la enzima glutatión reductasa, haciendo que prácticamente la totalidad del glutatión en la célula se encuentre en su forma reducida, GSH(Meister 1988).

Para la determinación de glutation se utilizó el método descrito por Anderson (1985), el cual se basa en la oxidación del GSH en presencia del ácido 5,5' di-thiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) a pH 7,5 (Ecuación 2.12). El TNB presenta un color amarillo, cuya intensidad puede ser cuantificada por su absorbancia a 412 nm.

$$2GSH + DTNB \longrightarrow GSSG + \text{Ácido 5 tio-2-nitrobenzoico (TNB)}$$

(Ecuación 2.12)

Para poder realizar la medición se desproteinizaron las muestras a determinar (sobrenadante) mediante la adición de ácido sulfosalicílico 10 % en la proporción 2:1 (muestra:ácido). Luego se centrifugó por 10 min a 10.000 x g y se recuperó el sobrenadante

(muestra ácida desproteinizada, sobre la cual se realizó la determinación). Así, a los 140 µL de muestra ácida se le agregó para llevar el volumen final a 1ml,

- DTNB 2 mM.
- Buffer fosfato de sodio 0,143 M pH 7,5 + EDTA 6,3 mM.

Paralelamente se realizó una curva de calibración de GSH correspondiente a 2, 4, 6, 8 y 10 nmoles de GSH / ml, utilizando para ello una solución estándar de GSH 1 mM en ácido sulfosalicílico al 10 %.

2.3.9. Preparación de las soluciones.

Las soluciones de cobre fueron preparadas inmediatamente antes de su uso en los bioensayos a partir de una solución madre. La solución madre de 1,5 g/L se preparó pesando y disolviendo la masa correspondiente de CuCl2·2H2O (pureza 99%, Lot 11570, Riedel-de Haën) en agua bidestilada. Con el propósito de conservar la solución se agrego HCl hasta alcanzar un pH 1,9. Las soluciones de uso, en un rango de 3 a 375 µg Cu^{2+}/L, fueron preparadas diluyendo una segunda solución de 30 mg Cu2+/L en SA. Las soluciones de uso fueron medidas cuatro veces con un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin – Elmer. El error entre las concentraciones nominales y las concentraciones medidas no superaron el 5%. La dureza de la SA estuvo siempre por debajo de los 2 mg/L de $CaCO_3$ y la conductividad alrededor de los 59,4 mS.

2.3.10. Análisis de datos

Las estimaciones de las Concentraciones Letales (CL) fueron realizadas mediante la transformación PROBIT, para lo cual se utilizó el programa de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA 1988). En caso de no poder utilizarse dicho programa, tanto la CL50 como la CE50 fueron calculadas mediante Trimmed Spearman Karber. Para los tratamientos continuos se construyeron las curvas de isotoxicidad (TOPs)

en base a las CL 10, 50 y 90, desde las 24 h hasta las 168 h (Herkovits y Helguero 1998). Estas curvas son de importante utilidad fin de reconocer los umbrales de concentración y tiempo para poder comparar con los datos disponibles de las concentraciones presentes en efluentes o en cuerpos de agua receptores, a fin de estimar el riesgo de las poblaciones de anfibios, al menos para *Rhinella arenarum*, uno de nuestros anfibios autóctonos.

A fin de comparar estadísticamente las CL50 de interés, se utilizó un programa presentado por Rodríguez (Rodríguez y Amín 1991), el cual considera significativa la diferencia cuando el cociente entre la CL50 mayor y la CL50 menor supera el valor crítico, con un 95 % de confianza, estipulado por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA 1980).

El análisis de los datos de sobrevida y NOEC fueron analizados mediante Test de Chi cuadrado.

El análisis de los datos tanto del tratamiento hasta metamorfosis como los de estrés oxidativo fueron realizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA). En todos los casos se utilizó el programa Statistica 5.5 (StatSoft). Las comparaciones múltiples se realizaron mediante el test de Tukey. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas fueron verificados mediante las pruebas de Lillieford y Bartlet respectivamente.

2.4. Resultados

2.4.1. Determinación de la toxicidad del Cobre sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4) por 168h.

2.4.1.1 Efectos letales.

La letalidad de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua por 168 h a cobre fue evaluada mediante el protocolo ANFITOX y está representada en perfiles de toxicidad (TOP) con las CL 10, 50 y 90 en función del tiempo de exposición.

La toxicidad del cobre mostró ser tiempo dependiente. Se observó un aumento significativo a lo largo del tiempo de exposición (168 h) de siete veces la toxicidad inicial. Así la CL50-24 h fue 137 (116,6-158,6) µg Cu^{2+}/L y la CL50 al final de la exposición (168 h), cuando los embriones controles alcanzaron el estadio de Opérculo Completo (E.25), fue 19,5 (16,2-24,4) µg Cu^{2+}/L. Se observó un aumento diario significativo en la toxicidad, desde las 48 h con una CL50 de 108,1 (90,2-127) µg Cu^{2+}/L, a las 72 h y CL50 de 42,7 (34-52,9) µg Cu^{2+}/L, cuando los embriones controles estaban en Tubo Neural (E.16) y Respuesta Muscular (E.18), respectivamente (Figura 2.3).

No se encontraron diferencias en la susceptibilidad entre las diferentes camadas, así el coeficiente de variación en la susceptibilidad de las mismas no superó el 12,3% (Tabla 2.4).

Tabla 2.4.: Concentraciones letales 50 (µg Cu^{2+}/L) a diferentes tiempos, con sus intervalos de confianza para embriones de *Rhinella arenarum* provenientes de diferentes camadas de tratados en forma continua con cobre desde el inicio del desarrollo embrionario, blástula (E.4).

CL50-96h	IC(-)CL50	IC(+) CL50	CL50-168	IC(-)CL50	IC(+) CL50
36	27	41	----------	----------	----------
30	25	43	22	20	27
----------	----------	----------	22,6	22	23
39	30	47	24	22	26
35	26	54	20	10	43
----------	----------	----------	19	16	21
42	31	54	20,5	17,8	23,7

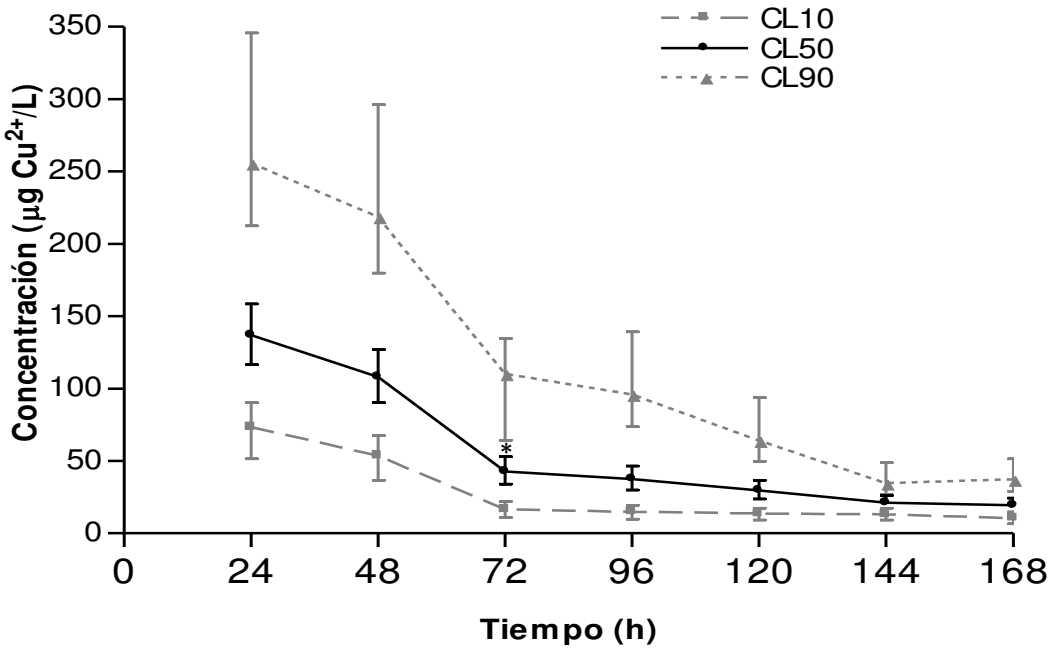


Figura 2.3.: Perfil de isotoxicidad. Representación de las CL 10, 50 y 90, y sus intervalos de confianza, de Cobre sobre *R. arenarum* desde el inicio de su desarrollo (E.4) a lo largo de 168h de exposición. * Diferencia significativa de la CL50 respecto de la correspondiente para el día anterior ($p \leq 0,05$).

2.4.1.2 Efectos subletales

Los embriones expuestos desde el estadio de Blástula (E.4) en adelante mostraron anormalidades directamente relacionadas con la concentración y tiempo de exposición. Los embriones expuestos a concentraciones mayores de 180 µg Cu^{2+}/L, detuvieron su desarrollo embrionario entre la Blástula (E.4) y la Gástrula inicial (S.11), presentando disociación celular, desprendimiento de plaquetas vitelinas hacia el espacio perivitelino. Los embriones tratados hasta con 105 µg Cu^{2+}/L solo lograron alcanzar el estadio de Brote Caudal (E.17) aunque el 30% presentó anomalías morfológicas principalmente en la región abdominal (Figura 2.4.). Los embriones tratados entre 45 y 105 µg Cu^{2+}/L no desarrollaron más allá del estadio de Boca Abierta (E.21), mientras que los expuestos a 15 µg Cu^{2+}/L desarrollaron solo hasta el estadio de Pliegue Opercular (E.23). Las principales malformaciones observadas fueron retraso en el desarrollo, talla reducida, incurvaciones en el eje, microcefalia, acefalia, microftalmia, subdesarrollo de branquias y de aleta caudal (Figura 2.4. y 2.5.). El potencial teratogénico del cobre, estimado como la relación entre el valor NOEC para la letalidad (15 µg Cu^{2+}/L) y para las malformaciones (7,5 µg Cu^{2+}/L), a las 168 h resultó igual a 2.

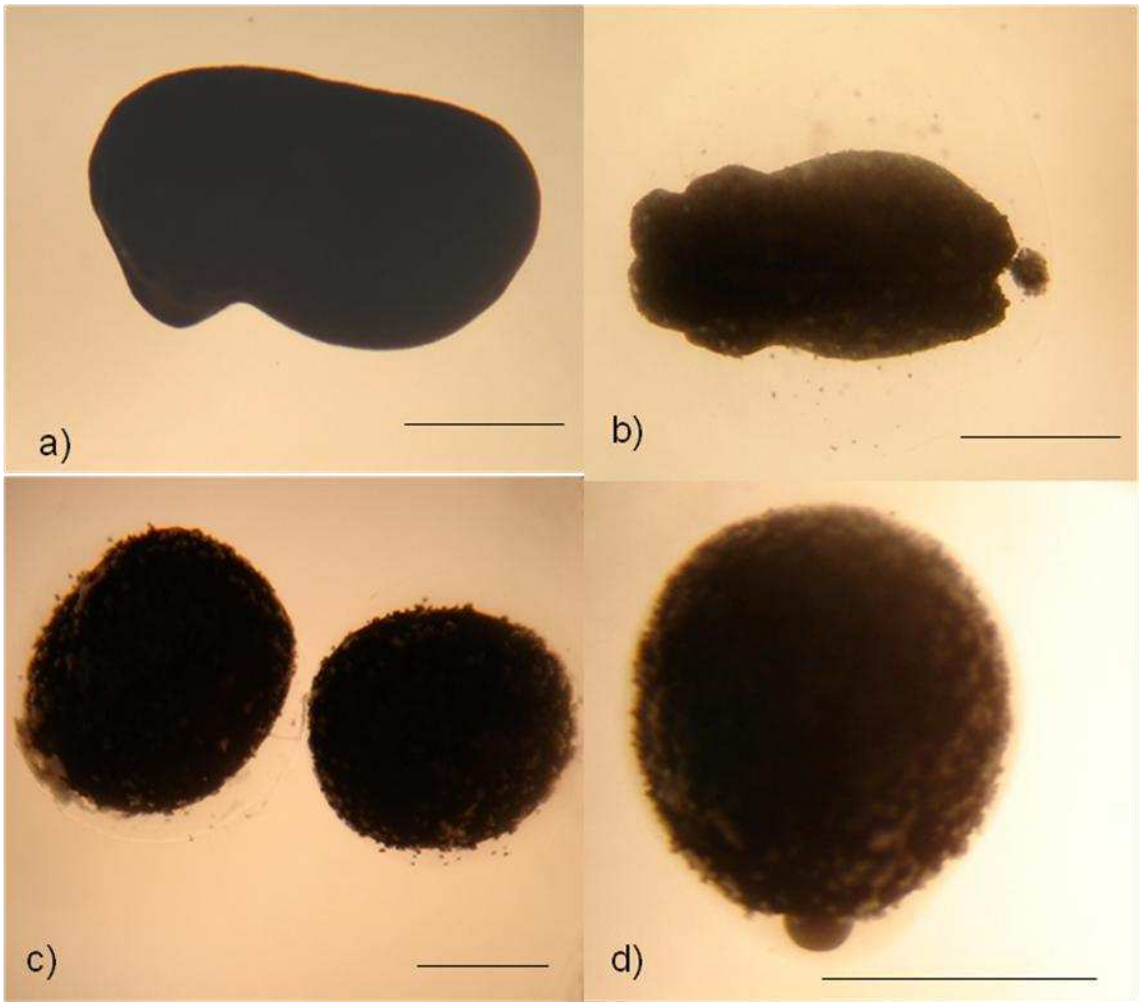


Figura 2.4.: Imágenes obtenidas por microscopía óptica de embriones de *Rhinella arenarum* tratados con cobre desde el inicio del desarrollo embrionario (E.4) a las 48 h. (a) Control en estadio de Tubo Neural (E.16). (b) Exposición a 105 µg Cu^{2+}/L, se observa disociación celular y desprendimiento hacia el espacio perivitelino. (c) y (d) Exposición a 180 µg Cu^{2+}/L, se observa un retraso en el desarrollo y/o detenimiento del mismo en Gástrula, presentaron disociación celular, desprendimiento de plaquetas vitelinas hacia el espacio perivitelino. Escala: 1mm.

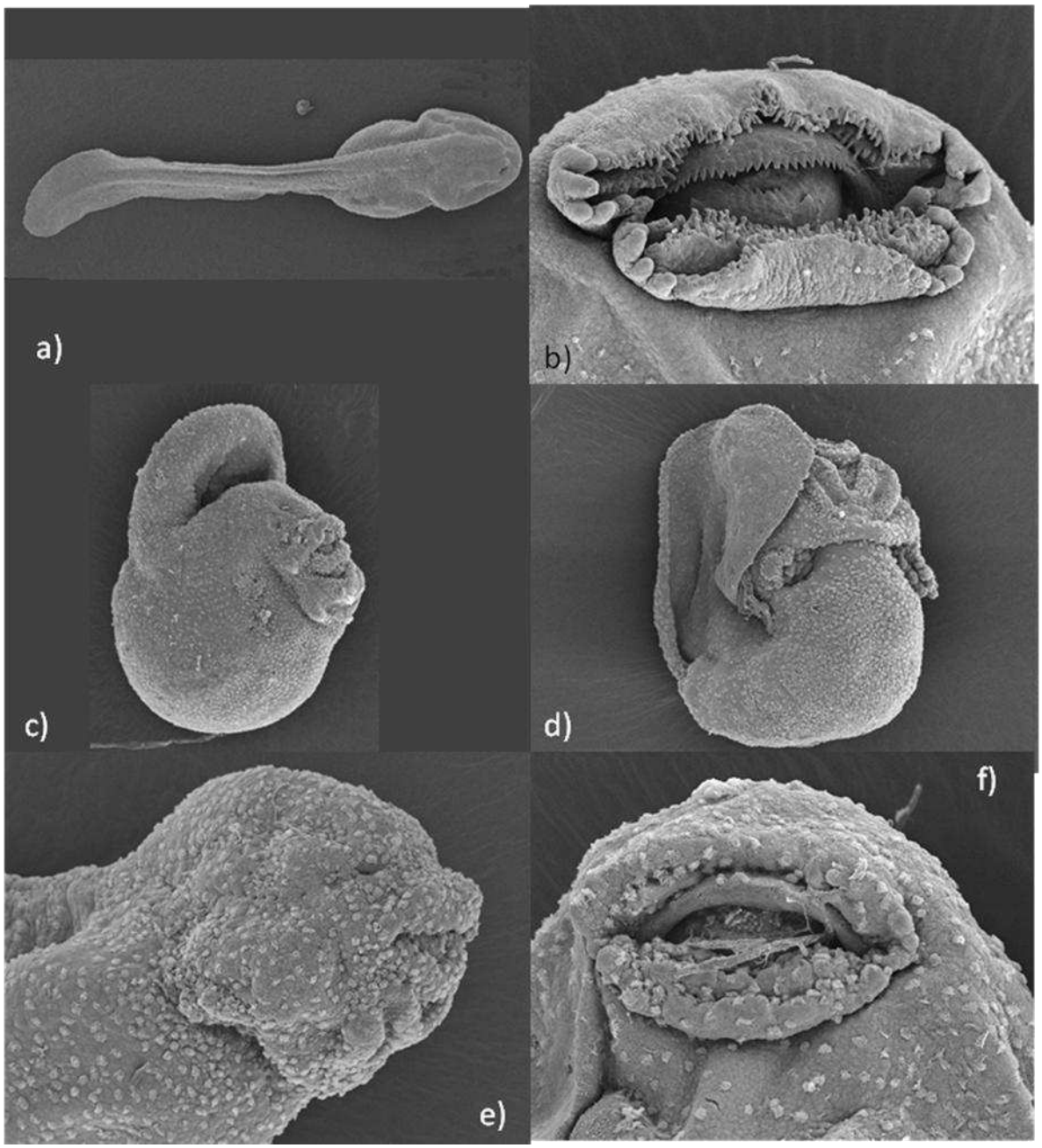


Figura 2.5: Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de embriones de *Rhinella arenarum* tratados con cobre desde el inicio del desarrollo embrionario (E.4) por 168 h. (a) Control en estadio de opérculo completo (E.25) magnificación (M) 23X. (b) Control, detalle de las estructuras bucales, M: 180X. (c) Exposición a 15 µg Cu^{2+}/L: Puede observarse retraso en el desarrollo, reducción en la talla, microcefalia, agenesia de branquias y incurvación en el eje, M: 65X. (d) Exposición a 15 µg Cu^{2+}/L: Obsérvese el retraso en el desarrollo, reducción en la talla, incurvación en el eje, M: 60X. (e) Exposición a 15 µg Cu^{2+}/L: se observan malformaciones en la región oral y branquias, M: 110X. (f) Exposición a 15 µg Cu^{2+}/L: Detalle de malformaciones en las estructuras bucales, M: 180X.

2.4.2. Determinación de la toxicidad del Cobre sobre larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) por 168h.

2.4.2.1. Efectos letales

La respuesta letal de las larva s al inicio de su desarrollo, Opérculo Completo (E.25), frente al cobre también fue evaluada mediante el protocolo ANFITOX, e informada mediante la representación de los datos obtenidos en forma de perfiles de toxicidad (TOP) construidos a partir de las CL 10, 50 y 90 a distintos tiempos de exposición.

A diferencia de la exposición desde el inicio del desarrollo embrionario, Blástula (E.4), para el caso de las larvas no se encontraron diferencias significativas en la toxicidad a lo largo del tiempo de exposición, así las CLs50 a las 24 h y a las 168 h fueron 54 (43 – 63) µg Cu^{2+}/L y 51 (45–57) µg Cu^{2+}/L, respectivamente (Figura 2.6).

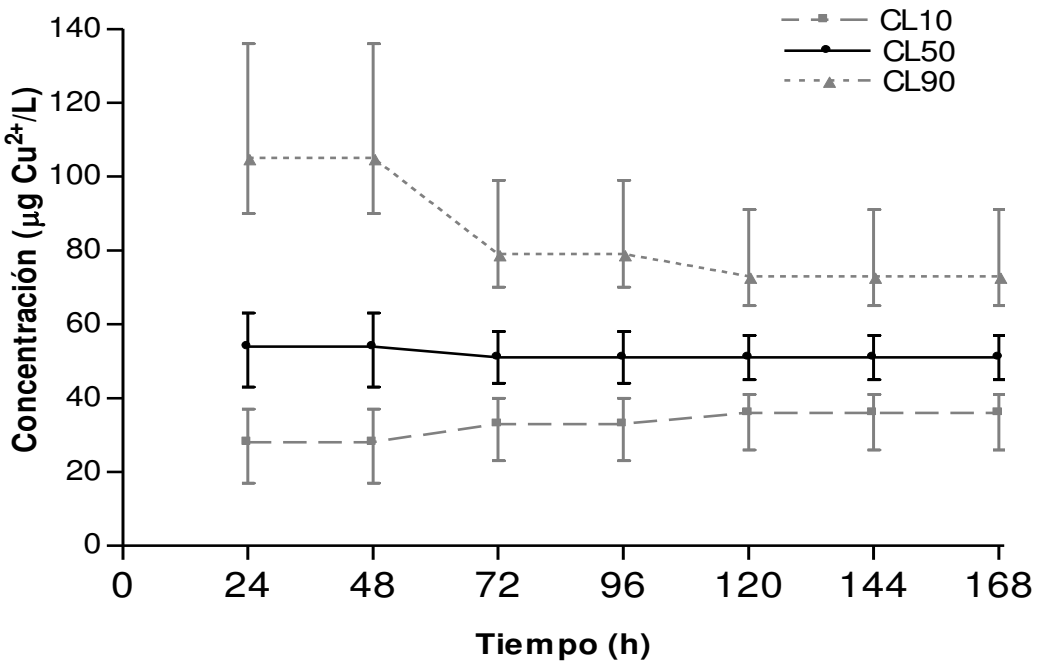


Figura 2.6. : Curvas TOP de isotoxicidad. Representación de las CL 10, 50 y 90, y sus intervalos de confianza, del cobre sobre *R. arenarum* desde el inicio del desarrollo larval (E.25) a lo largo de 168h de exposición. * Diferencia significativa de la CL50 respecto de la correspondiente para el día anterior ($p \leq 0,05$).

2.4.3. Determinación de la toxicidad del Cobre sobre larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a partir del estadio de Esbozo de los Miembros Posteriores (E. 28) por 168h.

2.4.3.1 Efectos letales.

A fin de obtener mayor información de la toxicidad del cobre sobre el desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum* se realizó un tratamiento continuo desde el estadio de esbozo de los miembros posteriores (E.28) por 168h. Dicho estadio mostró una mayor resistencia al cobre, que resultó 2.5 veces superior con respecto al estadio larval más temprano, E.25. En este estadio larval más avanzado, la toxicidad del cobre volvió a ser dependiente del tiempo de exposición, así la CL50 a las 24 h y a las 168 h fueron de 138,6 (137 – 150) µg Cu^{2+}/L y 104 (100 – 110) µg Cu^{2+}/L (Figura 2.7). Cuando se prolongó el tratamiento hasta las 240 h, se continuó registrando un aumento en la toxicidad hasta una CL50 de 73 (82 – 63) µg Cu^{2+}/L.

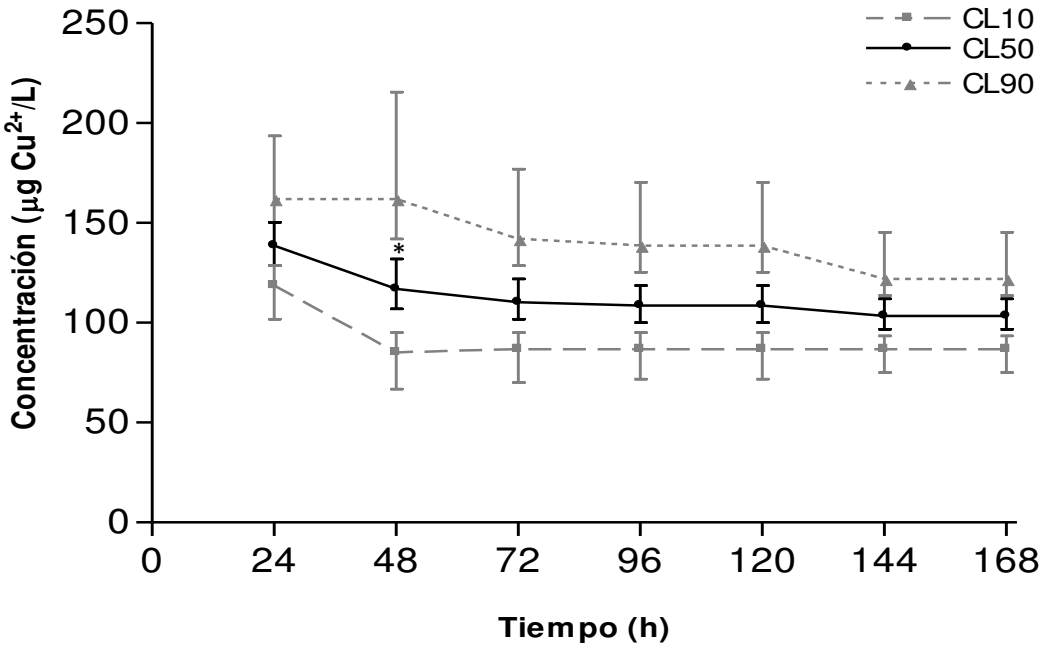


Figura 2.7.: Curvas TOP de isotoxicidad. Representación de las CL 10, 50 y 90, y sus intervalos de confianza, del cobre sobre larvas de *R. arenarum* (E.28) a lo largo de 168h de exposición. * Diferencia significativa de la CL50 respecto de la correspondiente para el día anterior ($p \leq 0,05$).

2.4.4. Determinación de la toxicidad del Cobre sobre *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4), hasta completar la metamorfosis (1128 h).

Al observarse efectos sobre la sobrevida, tanto dependientes del tiempo como del estadio de exposición, y con el fin de aumentar la cronicidad de la exposición y abarcar mayores tiempos del ciclo embrio-larval, así como evaluar los posibles efectos del cobre sobre la metamorfosis de *Rhinella arenarum*, se realizó un tratamiento continuo desde el inicio del desarrollo embrionario, Blástula (E.4), hasta completar la metamorfosis.

Al igual que el tratamiento continuo desde Blástula (E.4) por 168 h, se registró un rápido aumento en la susceptibilidad de los embriones de casi 10 veces desde el inicio del desarrollo embrionario (E.4) con una CL50 -24 h de 182 (196 – 168) µg Cu^{2+}/L hasta el comienzo del desarrollo larval (E.25), a las 168 h, con una CL50 de 20 (21 – 19) µg Cu^{2+}/L. Al extenderse la exposición, el incremento en la toxicidad se estabilizó, registrándose aumentos en la susceptibilidad diarios pero no significativos hasta el día 47 con una CL50 de 14 (17 – 11) µg Cu^{2+}/L (Figura 2.8.).

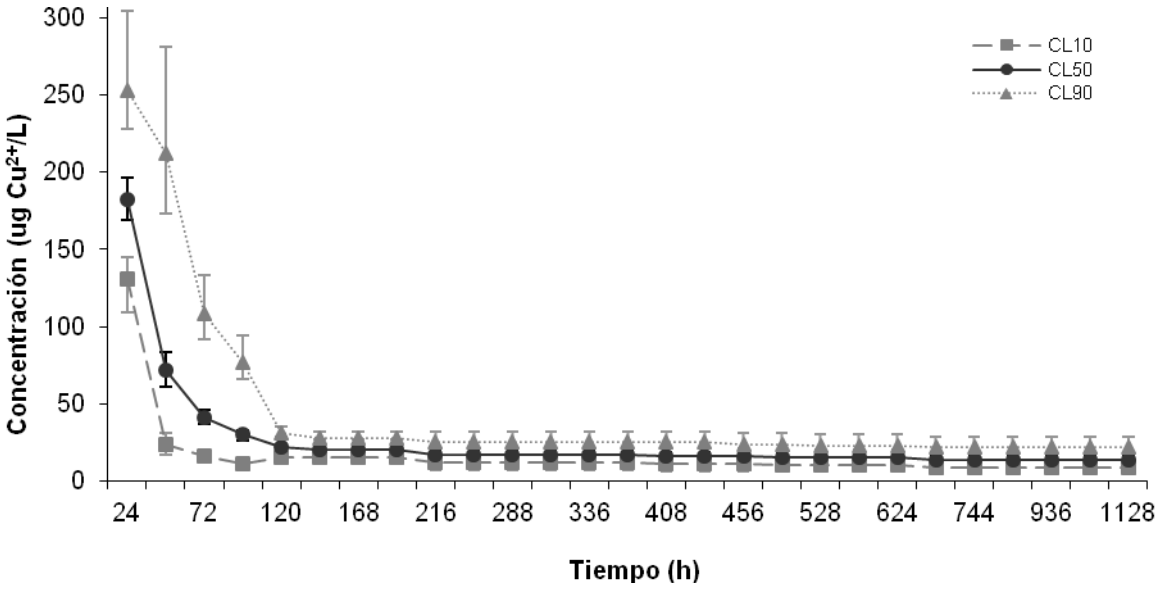


Figura 2.8.: Curvas TOP de isotoxicidad. Representación de las CL 10, 50 y 90, y sus intervalos de confianza, de cobre sobre *R. arenarum* desde el inicio del desarrollo embrionario (E.4) hasta alcanzar la metamorfosis (1128h). * Diferencia significativa de la CL50 respecto de la correspondiente para el día anterior ($p \leq 0,05$).

Con el fin de analizar los posibles efectos del cobre sobre la metamorfosis de *Rhinella arenarum* se evaluó tanto el peso corporal de los individuos al momento que algunos de los individuos comenzaron a metamorfosear, como el Peso Medio a la Metamorfosis (PMM, promedio del peso del 50% de los individuos metamorfoseados) y el Tiempo Medio de Metamorfosis (TMM, promedio del tiempo necesario para que el 50% de los individuos concluya la metamorfosis).

A las 1128 h (47 días) de exposición, cuando algunos de los individuos metamorfosearon, los porcentajes de sobrevida de los controles y los tratamientos de 7,5 µg Cu^{2+}/L, 12 µg Cu^{2+}/L y 21 µg Cu^{2+}/L fueron de 83%, 80%, 57% y 13%, respectivamente.

Al evaluarse el peso corporal a los 47 días de exposición se observó una disminución significativa para los individuos expuestos a 7,5 µg Cu^{2+}/L. (Figura 2.9.).

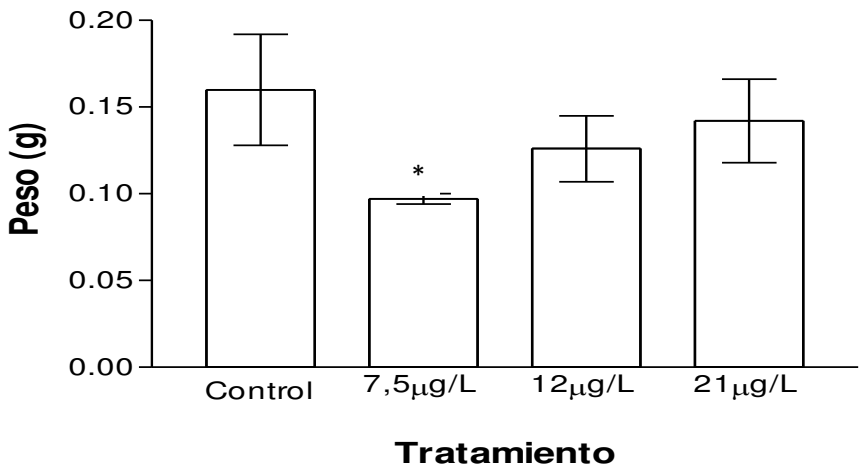


Figura 2.9.: Peso de las larvas de *R. arenarum* tratadas con cobre a partir del inicio del desarrollo embrionario (E.4) a los 47 días de exposición.

El Tiempo Medio de Metamorfosis resultó significativamente mayor para los organismos expuestos al tratamiento de 7,5 µg Cu^{2+}/L que para los controles, no así para el tratamiento de 12 µg Cu^{2+}/L, a pesar de estar en el rango de la CL50 que para los 47 días fue 14 (17 – 11) µg Cu^{2+}/L (Figura 2.10.).

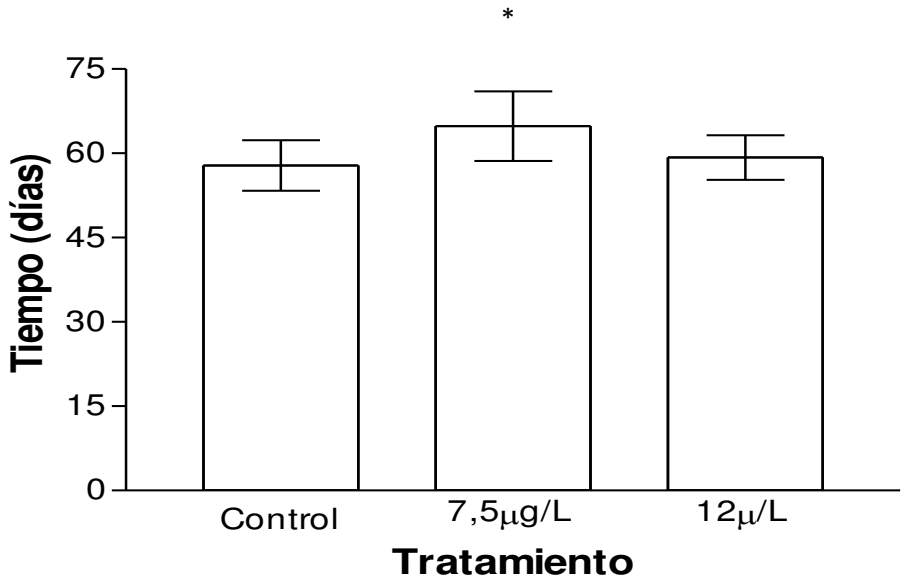


Figura 2.10.: Tiempo Medio de Metamorfosis (TMM, promedio del tiempo necesario para que el 50% de los individuos concluyan la metamorfosis) de *R. arenarum* tratados con cobre a partir del inicio del desarrollo embrionario (E.4).

Al evaluarse el Peso Medio a la Metamorfosis no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que todos los individuos alcanzaron un peso similar al de los controles en el momento de culminar la metamorfosis (Figura 2.11.)

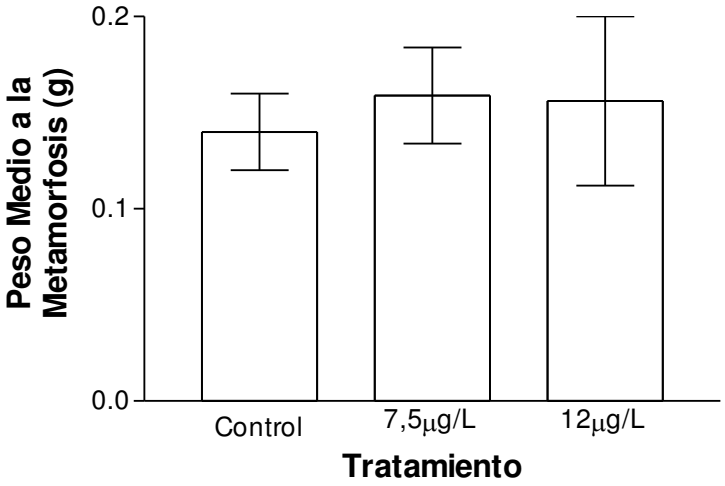


Figura 2.11.: Peso Medio a la Metamorfosis (PMM, promedio del peso del 50% de los individuos metamorfoseados) de *R. arenarum* tratados con cobre a partir del inicio del desarrollo embrionario (E.4).

Al finalizar el ensayo, a las 1848 h (77 días), el 80 % de los individuos controles de los expuestos desde el inicio del bioensayo habían concluido la metamorfosis, sin embargo un porcentaje elevado de individuos tratados con 7,5 µg Cu^{2+}/L no habían logrado metamorfosear. Evaluando el porcentaje acumulado de individuos que alcanzó la metamorfosis en relación a los expuestos desde el comienzo del desarrollo, se encontró una diferencia significativa ($p<0,001$) de los tratados con respecto a los controles, así el número de individuos metamorfoseados fue mayor en los controles. Sin embargo, ambos tratamientos con cobre resultaron con el mismo porcentaje de individuos metamorfoseados aún correspondiendo una de las concentraciones al valor NOEC letal (7,5 µg Cu^{2+}/L) y otro a la CL50 (12 µg Cu^{2+}/L) (Figura 2.12.).

Por otro lado, cuando se analiza el porcentaje acumulado de individuos que alcanzó la metamorfosis en relación a los sobrevivientes al día 47, los individuos expuestos a 7,5

µg Cu^{2+}/L metamorfosearon en menor porcentaje que los expuestos a 12 µg Cu^{2+}/L, que si bien éstos últimos resultaron en una mayor mortalidad hacia los 47 días de exposición, los individuos que lograron sobrevivir dicho periodo metamorfosearon en proporciones similares a los controles (Figura 2.13.).

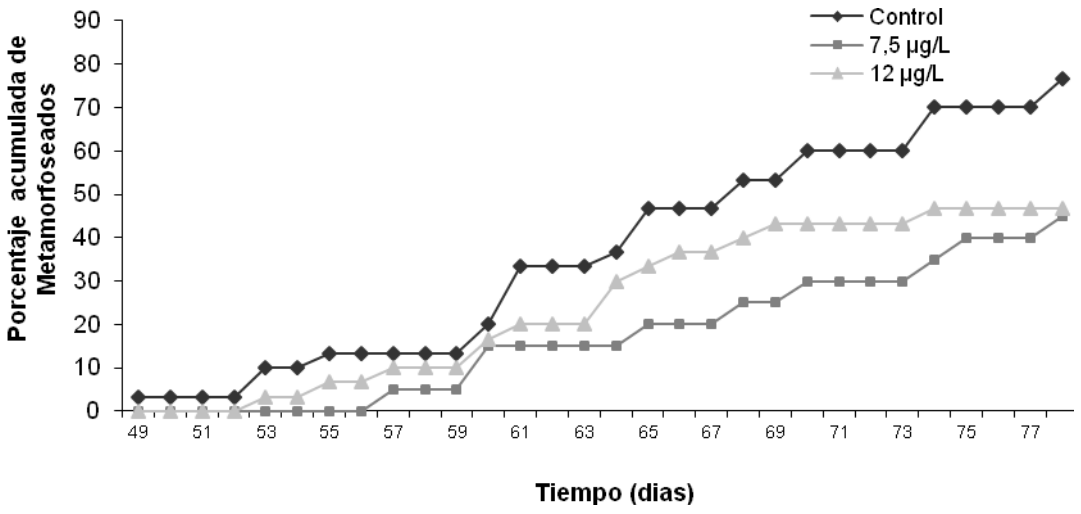


Figura 2.12.: Porcentaje acumulado de individuos que alcanza la metamorfosis en relación a los expuestos a cobre desde el comienzo del desarrollo embrionario (E.4). El tiempo inicial (49 días) corresponde al momento que comienzan a metamorfosear los primeros individuos.

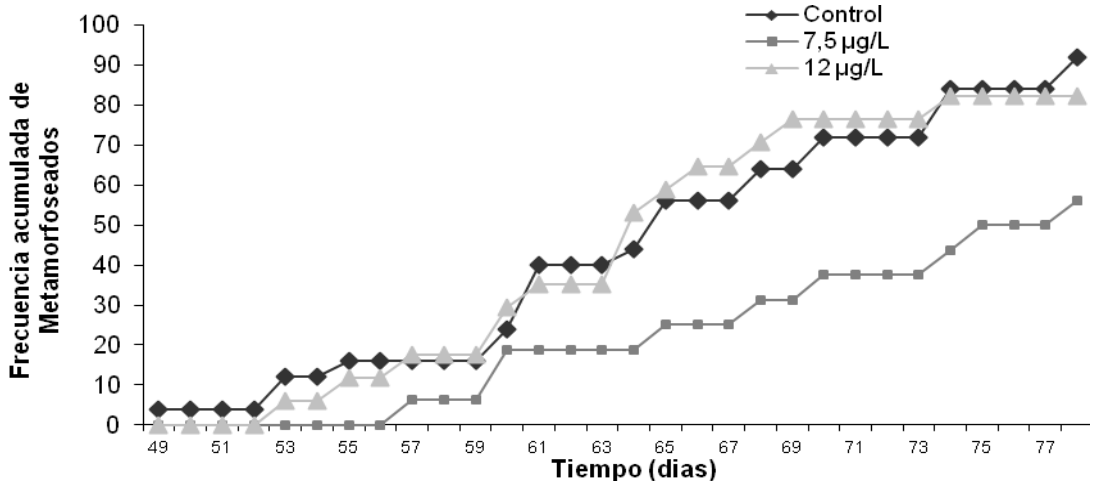


Figura 2.13.: Porcentaje acumulado de individuos que alcanza la metamorfosis en relación a los sobrevivientes al día 47 de los expuestos a cobre desde el comienzo del desarrollo embrionario (E.4). El tiempo inicial (49 días) corresponde al momento que comienzan a metamorfosear los primeros individuos.

2.4.5. Determinación de la toxicidad del Cobre sobre *Rhinella arenarum* expuestos por 24 horas a partir de distintos estadios del desarrollo embrionario y larval.

2.4.5.1. Efectos letales

La evaluación de la susceptibilidad estadio-dependiente de *Rhinella arenarum* mediante exposiciones al cobre por pulsos de 24 h en 12 estadios diferentes del desarrollo embrionario y larval, y la representación de la toxicidad mediante la CL10, 50 y 90 a las 24 h, nos permite encontrar el estadio o periodo del desarrollo más susceptible. Así, en el caso del cobre los embriones durante los primeros estadios de su desarrollo (Blástula (E.4) y Gástrula (E.11)) presentaron una mayor resistencia al metal con una CL50 de 137 (116,6-158,6) µg Cu^{2+}/L y 154 (124 – 176) µg Cu^{2+}/L, respectivamente. Luego se registró un aumento en la toxicidad desde Placa Neural (E.13) hasta Respuesta Muscular (E.18), resultando desde este estadio hasta Boca Abierta (E.21) los estadios más susceptibles, así la CL50 más baja resultó en 17 (15,8 - 18,4) µg Cu^{2+}/L para el estadio de Circulación Branquial (E.20). Desde el estadio de Pliegue Opercular (E.23) en adelante la resistencia al cobre aumentó gradualmente hasta alcanzar en el estadio de Esbozo de Miembros Posteriores (E.28) una CL50 de 138,61 (128,59 – 150,3) µg Cu^{2+}/L (Figura 2.14).

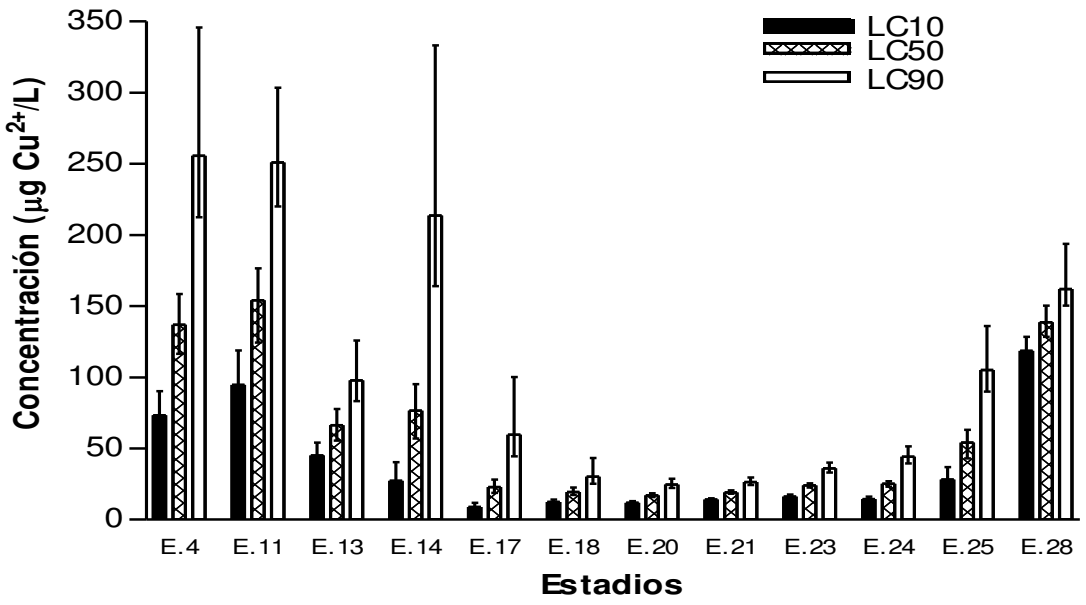


Figura 2.14.: Concentraciones letales 10, 50 y 90 a las 24 h para 12 estadios del desarrollo de *R. arenarum* expuestos a cobre.

2.4.5.2. Efectos subletales.

La susceptibilidad estadio-dependiente, evaluada mediante exposiciones por 24 h en 12 estadios del desarrollo embrionario y larval, también permitió identificar el rango de concentraciones que produjeron malformaciones y efectos adversos en cada estadio evaluado. La tabla 2.5 resume las principales malformaciones y anormalidades observadas en los embriones y larvas. Desde el estadio de Blástula (E.4) hasta Brote Caudal (E.17), los tratamientos con cobre causaron efectos teratogénicos, afectando incluso los estadios más tardíos (Figura 2.15). Los efectos adversos más severos en los embriones, fueron: forma irregular, disociación celular severa y liberación de plaquetas vitelinas. Los embriones en estadios de desarrollo más tardíos mostraron microcefalia, subdesarrollo de branquias, microftalmia, agenesia de ojos, malformación de las estructuras bucales y adhesivas, fallas en el cierre del opérculo, subdesarrollo de cola y aleta caudal, incurvaciones en el eje, edemas abdominales y subdesarrollo y agenesia del intestino, en relación con las concentraciones de exposición. Las exposiciones al metal desde los estadios de Respuesta

Muscular (E.18) hasta Opérculo Completo (E.25) produjeron también malformaciones severas; los embriones y larvas sufrieron reducción en el tamaño del cuerpo, retraso en el desarrollo, hidropesía severa en las branquias y en el abdomen, desarrollo anormal del intestino y subdesarrollo de la cola (Tabla 2.5).

Por otro lado se registraron efectos neurotóxicos, evaluados a través del comportamiento anómalo como nado errático y movimientos espasmódicos. Si bien estas alteraciones solo pudieron ser registradas a partir del estadio de Respuesta Muscular (E.18) cuando comienzan a moverse, fueron observadas en todos los tratamientos con cobre desde 3,75 y 7,5 µg Cu^{2+}/L, incluso en los tratamientos por pulso de 24 h en estadios embrionarios tempranos.

Tabla 2.5: Principales malformaciones producidas por la exposición a Cobre por pulsos de24 h en diferentes estadios embrionarios y larvales de R.*arenarum*

Blástula (E.4)	Gástrula (E.11)	Estadios Neurales (E.13; E.14)	Organogénesis (E.17)	(E.18; E.20; E.21)	(E.23)	(E.24; E.25)
	Tapón vitelino persistente					
Anormalidades cefálicas (microcefalia/ acefalia)	Anormalidades cefálicas (microcefalia/ acefalia)	Anormalidades ceálicas (microcefalia/ acefalia)	Anormalidades cefálicas (microcefalia/ acefalia)			
Malformaciones bucales	Malformaciones bucales	Malformaciones bucales	Malformaciones bucales	Malformaciones bucales		
Agenesia/ subdesarrollo de branquias	Agenesia/ subdesarrollo de branquias	Agenesia/ subdesarrollo de branquias	Agenesia/ subdesarrollo de branquias	Agenesia/ subdesarrollo de branquias		
			Fallas al cerrar el operculo	Fallas al cerrar el opérculo	Fallas al cerrar el opérculo	
Agenesia/ subdesarrollo de la cola	Agenesia/ subdesarrollo de la cola	Agenesia/ subdesarrollo de la cola	Agenesia/ subdesarrollo de la cola	Agenesia/ subdesarrollo de la cola	Agenesia/ subdesarrollo de la cola	
Incurvaciones en el eje	Incurvaciones en el eje	Incurvaciones en el eje	Incurvaciones en el eje	Incurvaciones en el eje	Incurvaciones en el eje	Incurvaciones en el eje
Edemas	Edemas	Edemas	Edemas	Edemas	Edemas	Edemas
			Agenesia de intestino	Agenesia de intestino	Agenesia de intestino	Agenesia de intestino
Reducción de talla	Reducción de talla	Reducción de talla	Reducción de talla	Reducción de talla	Reducción de talla	Reducción de talla

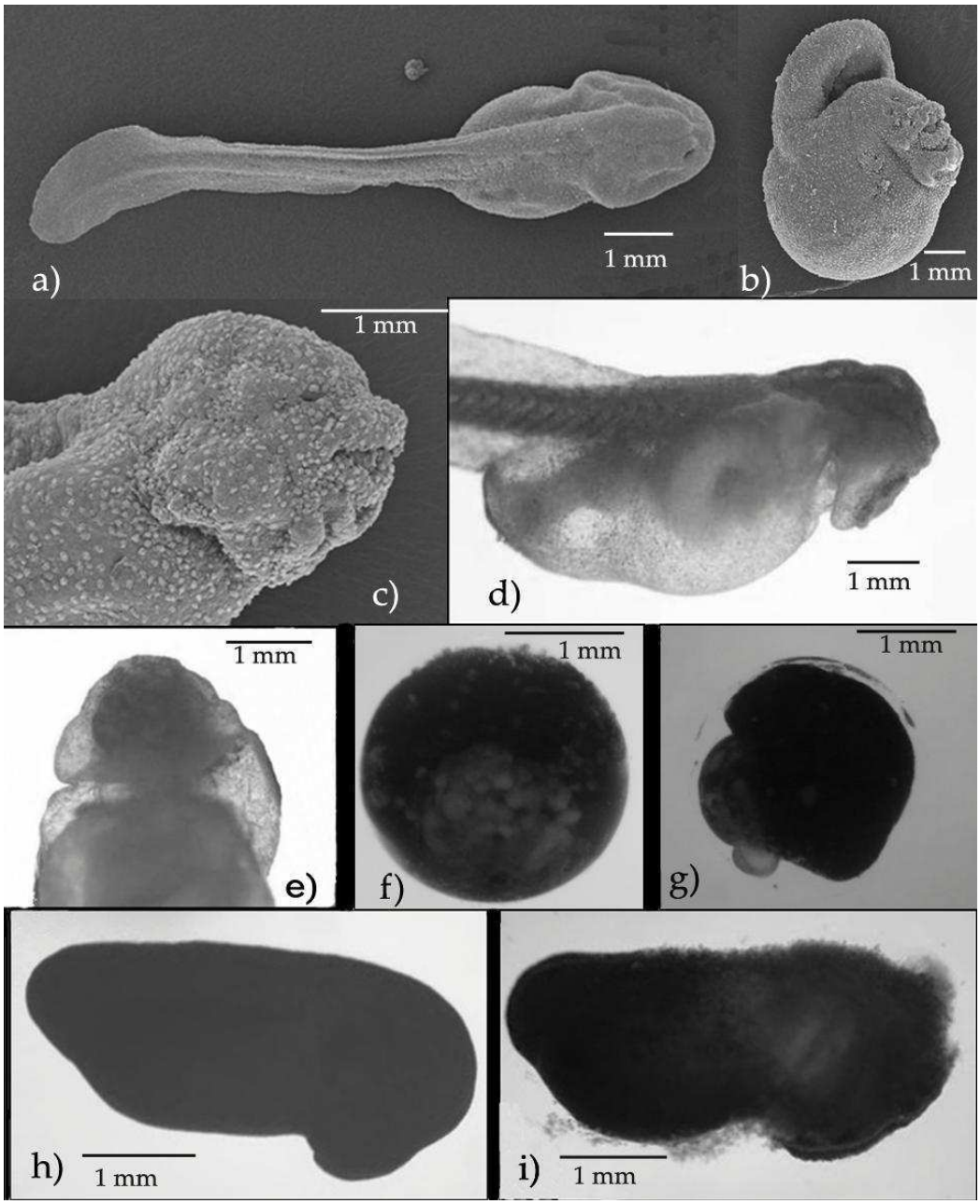


Figura 2.15: Ejemplos de imágenes de microscopía electrónica de barrido y microscopia óptica de las principales malformaciones producidas por exposición de *R. arenarum* a Cobre. (a-e) Tratamiento continuo desde blástula, (a) control en E.25; (b-c) la exposición a 15 $\mu gCu^{2+}/L$ muestra (b) retraso en el desarrollo, reducción en la talla, microcefalia, agenesia de branquias y incurvaciones en el eje, en (c) se observan malformaciones en la boca y branquias, y en (d) y (e) edemas abdominales y cardíacos, y desarrollo anormal del intestino.(f-i) Exposiciones a Cobre por 24 h, (f) vista ventral de un embrión expuesto a 180 μgCu^{2+} /L en estadio de blástula; nótese la disociación celular y la falla en el proceso de gastrulación, y (g) vista lateral de un embrión expuesto a 7 $\mu gCu^{2+}/L$ en estadio de gástrula, con tapón vitelino persistente, retraso en el desarrollo y disociación celular; (h) vista lateral de un embrión control en Tubo Neural (E.16) y (i) vista lateral de un embrión expuesto a 3 μgCu^{2+} /L en Surco Neural (E.14). Nótese la disociación celular en toda la superficie epitelial.

2.4.6. Sensibilidad de larvas de anfibios de un ecosistema urbano contaminado

2.4.6.1. Comparación de la susceptibilidad al cobre en larvas de *Rhinella arenarum* provenientes de distintos sitios.

La letalidad de las larvas de *Rhinella arenarum*, provenientes de la zona aledaña al Canal Aliviador (sitio CA), del último tramo del Río Reconquista (sitio RR) y del Parque Industrial de Tigre (PI), (Figura 2.2.), distintos sitios urbanos contaminados, expuestas en forma continua por 240 h a cobre, fue evaluada mediante el protocolo ANFITOX.

La susceptibilidad fue representada mediante las CL50 para la exposición aguda (96h) y crónica (240 h).

Las CL50 para las 96 y 240 h fueron, respectivamente, 38 (35 - 41) y 35 (32 – 38) µg Cu^{2+}/L para las larvas del sitio CA; 51 (47 – 55) y 46 (43 – 50) µg Cu^{2+}/L para las del sitio RR y de 56 (52 – 60) y 56 (52 – 59) µg Cu^{2+}/L para el sitio PI (Figura 2.16.). Así, el orden de susceptibilidades, de acuerdo a estos valores resultó en CA>RR>PI, verificándose diferencias significativas entre todos ellos al cabo de las 240 h.

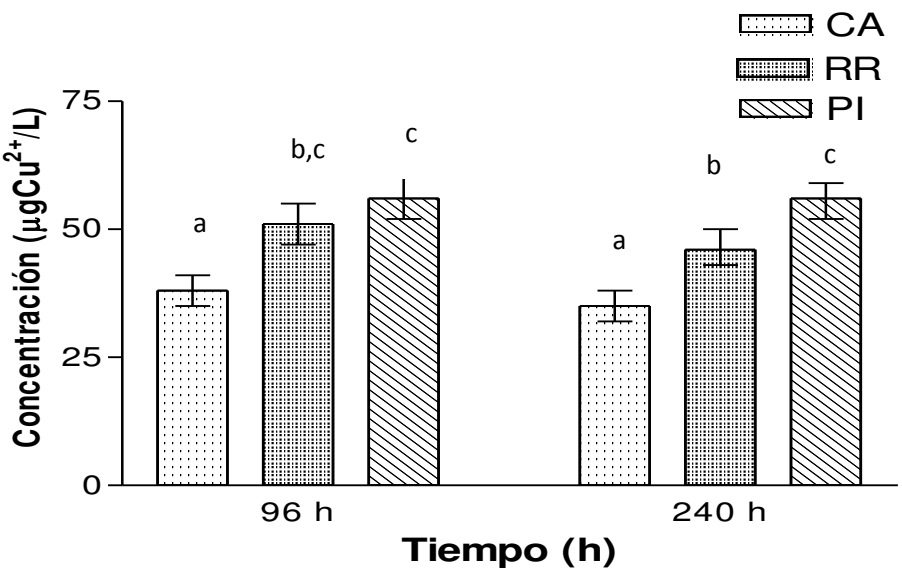


Figura 2.16.: Concentraciones Letales 50, y sus intervalos de confianza, de cobre agudas (96 h) y crónicas (240 h) para las larvas de *Rhinella arenarum* provenientes de un ecosistema urbano contaminado, de la zona aledaña al Canal Aliviador (sitio CA), del último tramo del Río Reconquista (sitio RR) y de la zona del parque industrial de Tigre (PI). Letras distintas indican diferencias significativas entre las CL50 ($p \leq 0,05$).

2.4.6.2. Comparación de la susceptibilidad al Cobre de larvas de *Rhinella arenarum* y *Rhinella fernandezae* provenientes de distintos sitios urbanos contaminados.

La letalidad de las larvas de *Rhinella fernandezae*, provenientes de distintos sitios urbanos contaminados, expuestas en forma continua por 240 h a cobre, fue evaluada mediante el protocolo ANFITOX. La susceptibilidad fue representada mediante las CL50 para la exposición aguda (96h) y crónica (240 h).

Las CL50 para las 96 y 240 h fueron, respectivamente, 58 (54 – 62) y 40 (38 – 42) µg Cu^{2+}/L para las larvas del sitio CA; y 48 (53 – 52) y 25 (12 – 31) µg Cu^{2+}/L para el sitio PI. No fue posible evaluar la susceptibilidad para el sitio RR (Figura 2.17). Así, el orden de susceptibilidades, de acuerdo a estos valores resultó en PI > CA, verificándose diferencias significativas entre ellos al cabo de las 240 h. De esta manera, la diferencia en la susceptibilidad de *R. fernandezae* y *R. arenarum* se ve sujeta al lugar de origen de las puestas, mientras que las larvas *R. fernandezae* provenientes del sitio CA resultaron

significativamente más resistentes que *R. arenarum* tanto en la exposición aguda como crónica, este resultado se vio invertido para el sitio PI donde las larvas de *R. arenarum* resultaron significativamente más resistentes.

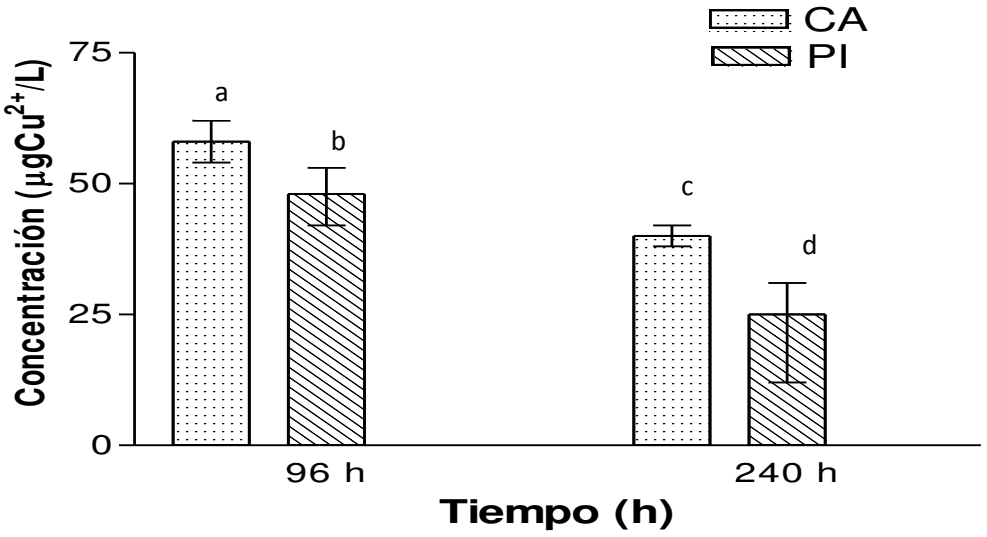


Figura 2.17.: Concentraciones Letales 50, y sus intervalos de confianza, de cobre agudas (96 h) y crónicas (240 h) para las larvas de *Rhinella fernandezae* provenientes de un ecosistema urbano contaminado, de la zona aledaña al Canal Aliviador (sitio CA) y de la zona del parque industrial de Tigre (PI). Letras distintas indican diferencias significativas entre las CL50 ($p \leq 0,05$).

2.4.7. Evaluación de parámetros relacionados con el estrés oxidativo, como consecuencia de la exposición a cobre.

2.4.7.1. Evaluación de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en diferentes estadios del desarrollo de *Rhinella arenarum*.

Con el fin de evaluar la respuesta estadio-dependiente de los embriones de *Rhinella arenarum* en relación a los parámetros de estrés oxidativo en forma preliminar, se expusieron embriones en cinco estadios del desarrollo seleccionados (E.4, E.11, E.17, E.22 y E.25) a concentraciones de 7,5 µg Cu^{2+}/L y 15 µg Cu^{2+}/L por 24 h. De esta manera, se evaluó el nivel de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) como indicador indirecto del daño a lípidos, observándose una tendencia creciente en función del

tratamiento, significativa para el estadio de Blástula (E.4), aunque no significativa para el estadio de Circulación en la Aleta (E.22). Con respecto a los niveles basales referidos por individuo, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes estadios (Figura 2.18.).

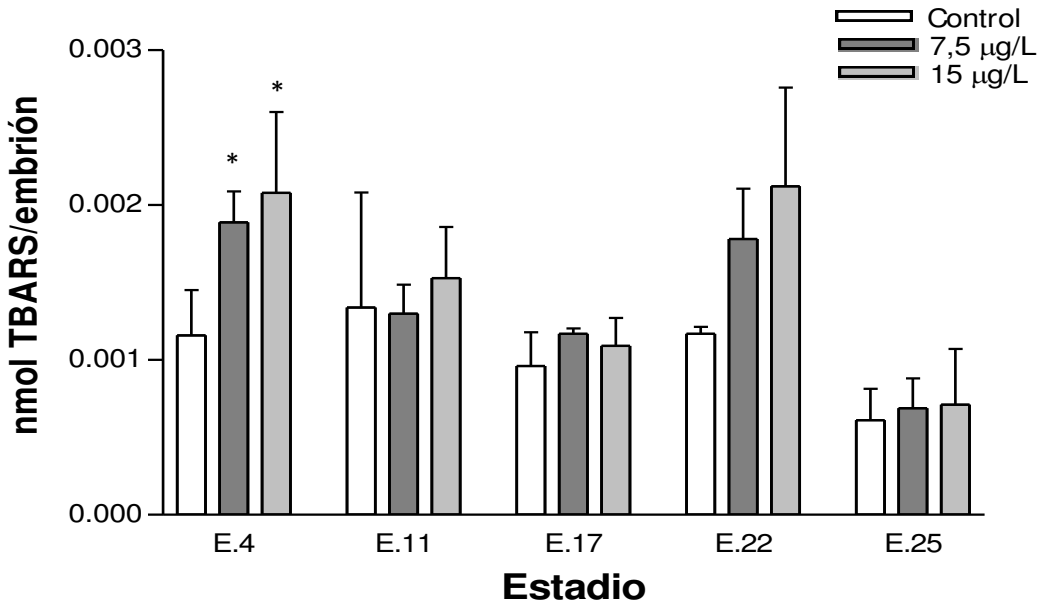


Figura 2.18: Peroxidación lipídica en embriones de *R. arenarum* expuestos a cobre en diferentes estadios embrionarios durante 24 h. * Diferencia significativa respecto del control correspondiente ($p \leq 0,05$).

La actividad catalasa basal a lo largo del desarrollo embrionario, para los estadios estudiados, mostró una leve disminución en el estadio de Brote Caudal (E.17), seguida por un notable incremento de 8 veces en el estadio de Circulación en la Aleta (E.22). Hacia el comienzo del desarrollo larval (E.25), la actividad catalasa alcanza su mínimo, descendiendo más del 90% respecto del máximo alcanzado en E.22 (Figura 2.19.).

Con respecto a la exposición al cobre, la actividad enzimática resultó significativamente alterada respecto a los controles tanto para la concentración más elevada en el caso del estadio de Blástula (E.4), como para ambos tratamientos en el estadio de Circulación en la Aleta (E.22). Sin embargo, mientras que en el primer caso la actividad resultó incrementada a más del doble, al alcanzar la etapa organogenética la actividad

disminuyó un 36 % y 44,5 % al tratarse los embriones con 7,5 y 15 µg Cu^{2+}/L, respectivamente. (Figura 2.19).

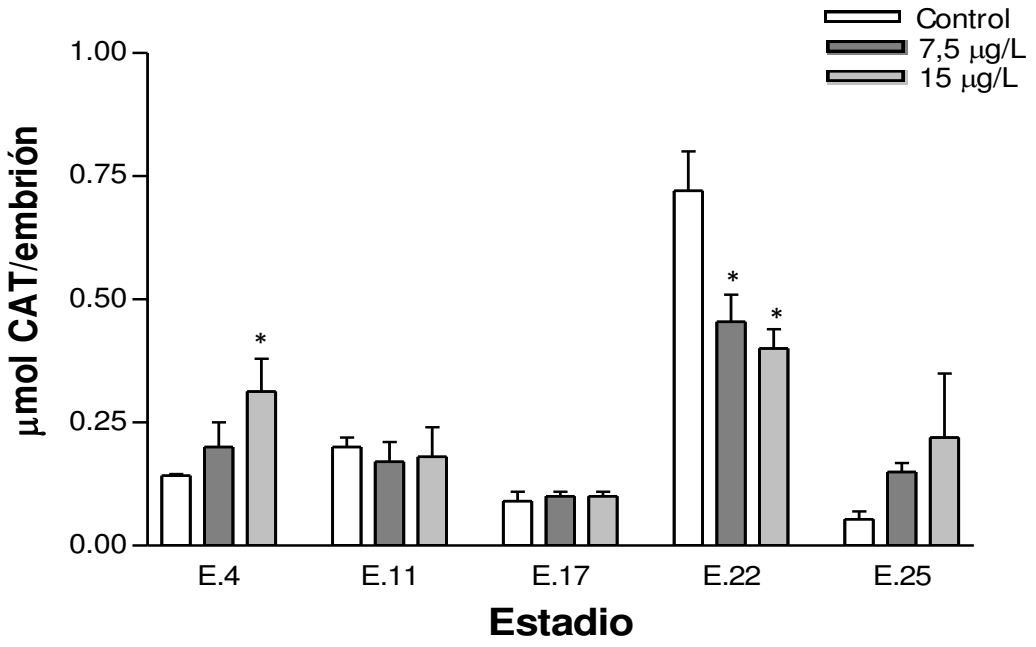


Figura 2.19.: Actividad catalasa en embriones de *R. arenarum* expuestos a cobre en diferentes estadios embrionarios durante 24 h. * Diferencia significativa respecto del control correspondiente ($p \leq 0,05$).

2.4.7.2. Evaluación de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en larvas de *Rhinella arenarum* en estadio de opérculo completo (E.25) expuestas a cobre en forma crónica.

A fin de evaluar los efectos crónicos sobre los parámetros relacionados con el estrés oxidativo se expusieron larvas de *Rhinella arenarum* a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) durante 14 días a 30 y 45 µg Cu^{2+}/L. Si bien ambos valores se encuentran comprendidos dentro de la CL 10, la concentración de 30 µg Cu^{2+}/L se encuentra dentro del límite de confianza inferior, y 45 µg Cu^{2+}/L dentro del superior.

Como se puede observar en la Figura 2.20 los tratamientos crónicos no afectaron significativamente el contenido de proteínas, hecho que hace factible la utilización, en este

estadio, del contenido de proteínas totales para referir el resto de los parámetros determinados, a diferencia de lo registrado en la comparación a lo largo del desarrollo embrionario (Anexo).

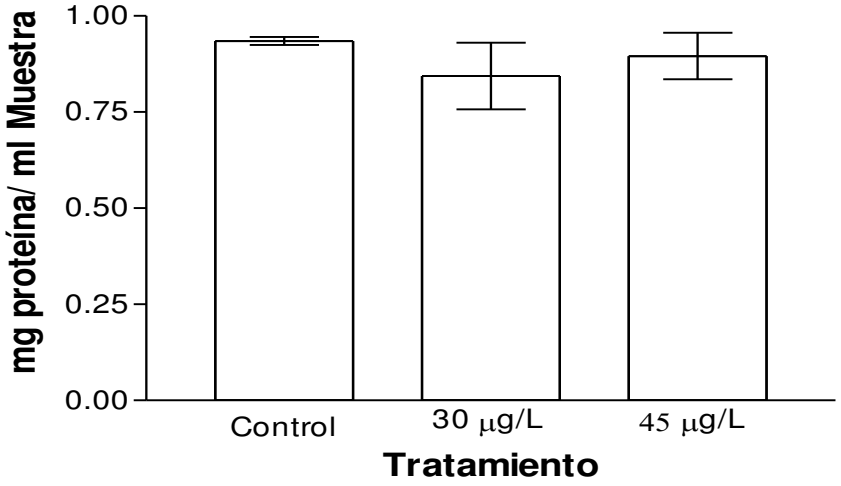


Figura 2.20: Contenido de proteínas en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a cobre durante los primeros 14 días del desarrollo larval.* Diferencia significativa respecto del control ($p \leq 0,05$).

Como indicador de peroxidación lipídica, se determinaron las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico, entre las cuales es preponderante el malondialdehído (MDA), como subproducto del ataque de las especies reactivas de oxígeno con las membranas lipídicas. La exposición al metal aumentó en factores 2,3 y 7, la peroxidación lipídica en las larvas tratadas con 30 y 45 µg Cu^{2+}/L, respectivamente (Figura 2.21.).

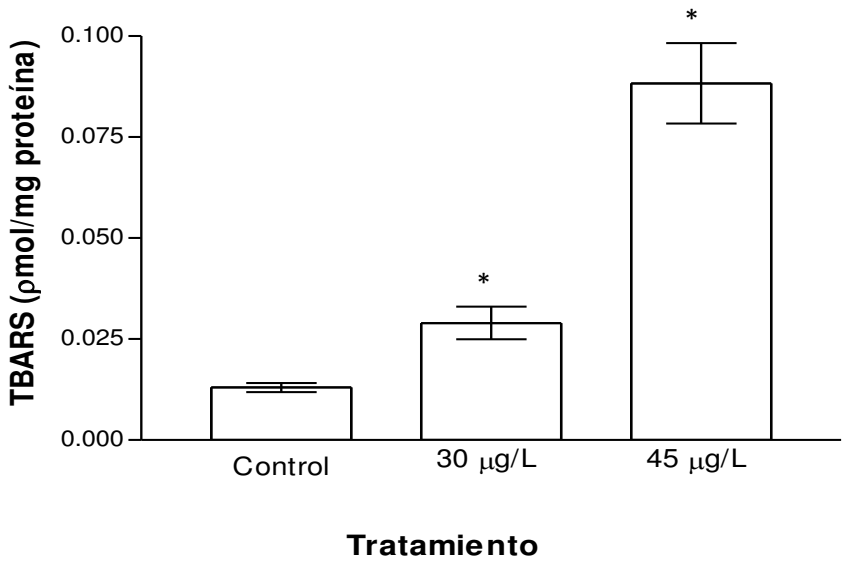


Figura 2.21: Peroxidación lipídica en larvas de *R. arenarum* tratadas con cobre durante los primeros 14 días del desarrollo larval. * Diferencia significativa respecto del control ($p \leq 0,05$).

La actividad de la enzima catalasa no sufrió modificaciones significativas bajo ninguno de los tratamientos con cobre (Figura 2.22.)

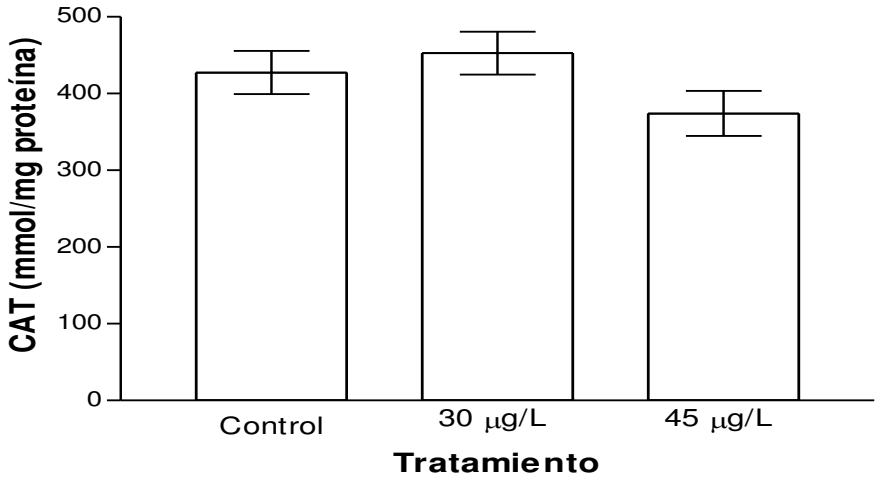


Figura 2.22: Actividad catalasa en larvas de *R. arenarum* tratadas con cobre durante los primeros 14 días del desarrollo larval. * Diferencia significativa respecto del control ($p \leq 0,05$).

La evaluación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa resultó alterada, mostrando un aumento significativo del 54% con respecto al control en las larvas expuestas a 30 µg Cu^{2+}/L de cobre. (Figura 2.23.).

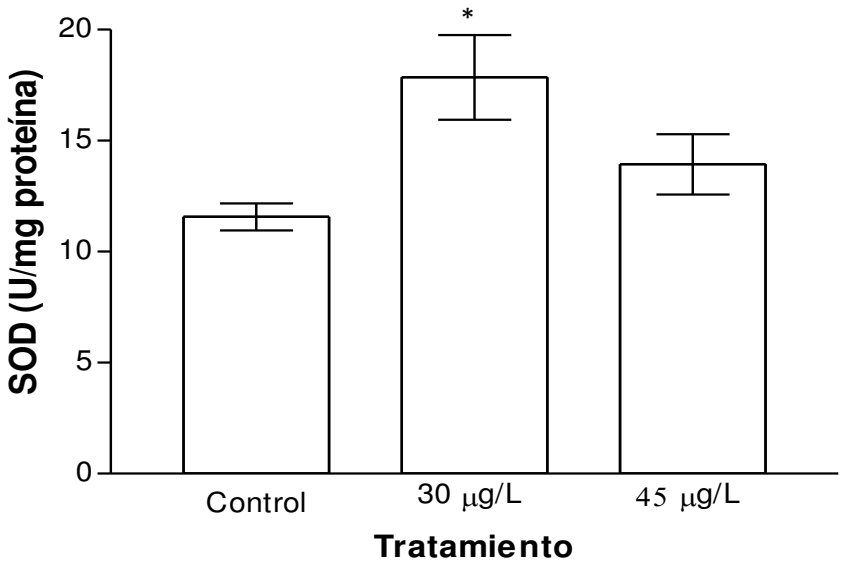


Figura 2.23.: Actividad superóxido dismutasa en larvas de *R. arenarum* tratadas con cobre durante los primeros 14 días del desarrollo larval. * Diferencia significativa respecto del control ($p \leq 0,05$).

La actividad glutatión-S-transferasa no se vio afectada significativamente por ninguno de los tratamientos aplicados (Figura 2.24.). Tampoco se observaron cambios en el contenido de glutatión reducido, en relación al control para ninguno de los tratamientos (Figura 2.25.).

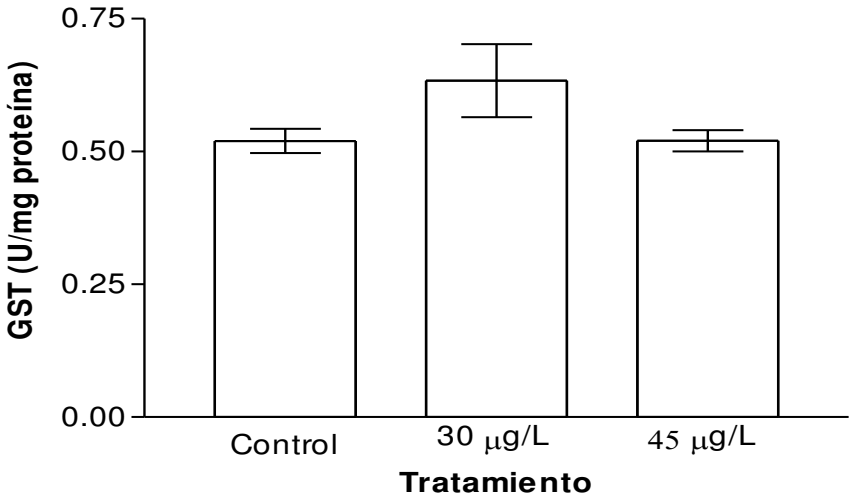


Figura 2.24.: Actividad glutatión-S-transferasa en larvas de *R. arenarum* tratadas con cobre durante los primeros 14 días del desarrollo larval. * Diferencia significativa respecto del control (p≤0,05).

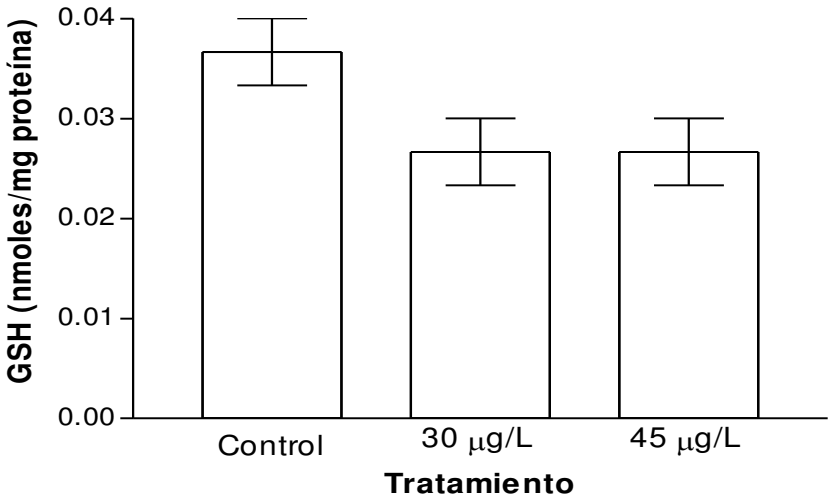


Figura 2.25: Contenido de glutatión reducido en larvas de *R. arenarum* tratadas con cobre durante los primeros 14 días del desarrollo larval. * Diferencia significativa respecto del control (p≤0,05).

2.4.7.3. Evaluación de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en larvas de anfibio obtenidas en ecosistemas urbanos contaminados.

A fin de determinar los efectos crónicos sobre los parámetros relacionados con el estrés oxidativo y de evaluar la posible diferencia en la susceptibilidad de dos de las camadas obtenidas en el ecosistema urbano contaminado, se expusieron larvas de *Rhinella arenarum* obtenidas en la zona aledaña al Canal Aliviador (sitio CA) y en el último tramo

del Río Reconquista (sitio RR), a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) durante 14 días a 30 y 45 µg Cu^{2+}/L.

Las puestas del sitio CA, resultaron más susceptibles por lo que no se obtuvieron resultados para la exposición a 45 µg Cu^{2+}/L, para ninguno de los parámetros evaluados, debido a la alta tasa de mortalidad registrada.

Las larvas expuestas a cobre mostraron peroxidación lipídica significativamente mayor respecto a sus controles (Figura 2.26.).

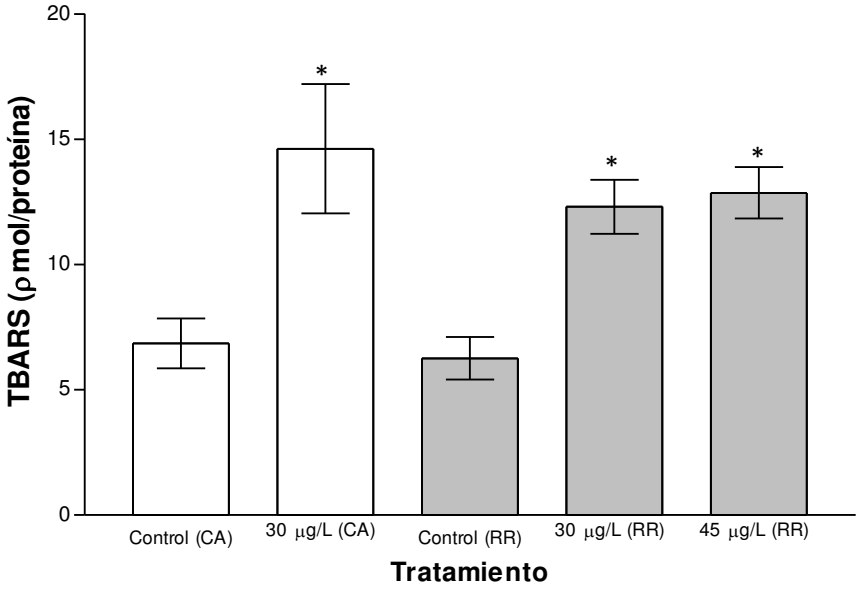


Figura 2.26.: Peroxidación lipídica en larvas de *R. arenarum* provenientes de un ecosistema urbano contaminado, de la zona aledaña al Canal Aliviador (sitio CA) y en el último tramo del Río Reconquista (sitio RR), tratadas con cobre durante los primeros 14 días del desarrollo larval. * Diferencia significativa respecto del control ($p \leq 0,05$).

Con respecto a la actividad de la enzima catalasa, no se encontraron diferencias significativas ni entre los tratamientos, ni entre los niveles basales de las diferentes camadas (Figura 2.27.). Por su parte, en el caso de la superóxido dismutasa los niveles basales de la actividad enzimática fueron significativamente mayores en las puestas provenientes del sitio CA. Sin embargo, en este caso, no hubo diferencias en la actividad enzimática de las larvas tratadas y controles, mientras que se evidenció un notable y significativo incremento

de hasta 3 veces de la actividad SOD por efecto del cobre en las puestas del sitio RR. (Figura 2.28.).

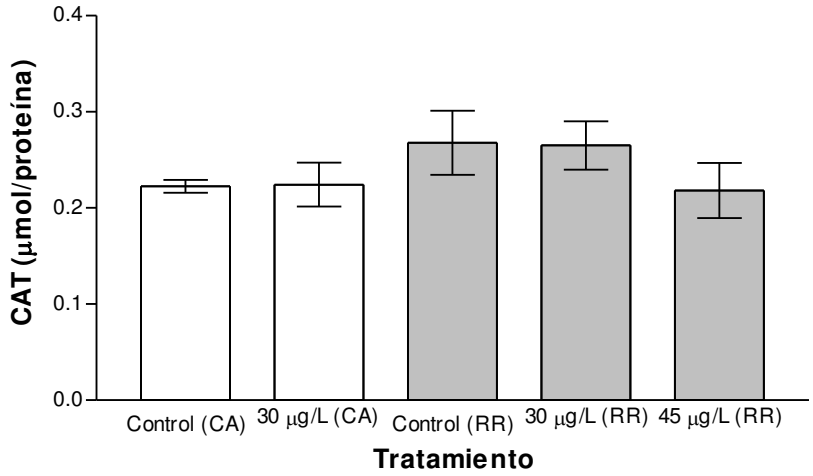


Figura 2.27.: Actividad catalasa en larvas de *R. arenarum* provenientes de un ecosistema urbano contaminado, de la zona aledaña al Canal Aliviador (sitio CA) y en el último tramo del Río Reconquista (sitio RR), tratadas con cobre durante los primeros 14 días del desarrollo larval. * Diferencia significativa respecto del control ($p \leq 0,05$).

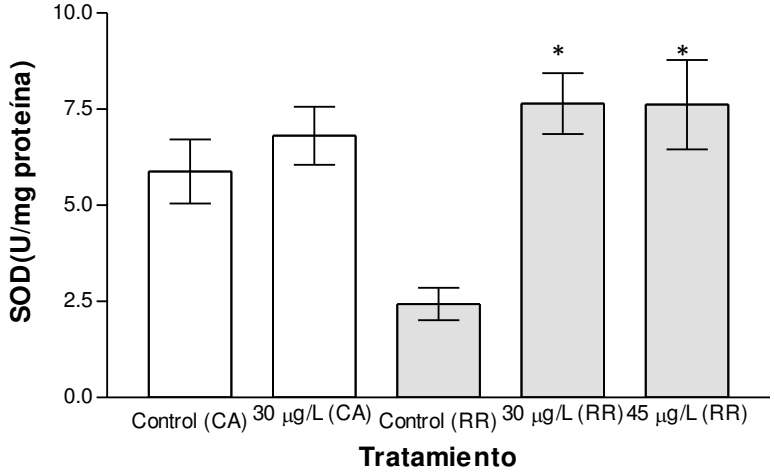


Figura 2.28.: Actividad superóxido dismutasa en larvas de *R. arenarum* provenientes de un ecosistema urbano contaminado, de la zona aledaña al Canal Aliviador (sitio CA) y en el último tramo del Río Reconquista (sitio RR), tratadas con cobre durante los primeros 14 días del desarrollo larval. * Diferencia significativa respecto del control ($p \leq 0,05$).

La actividad basal de la enzima glutatión-S-transferasa también resultó ser significativamente mayor en las larvas del sitio CA. Asimismo, se observó sólo en el caso de los individuos provenientes del sitio RR un aumento significativo en los valores de la actividad enzimática (Figura 2.29.).

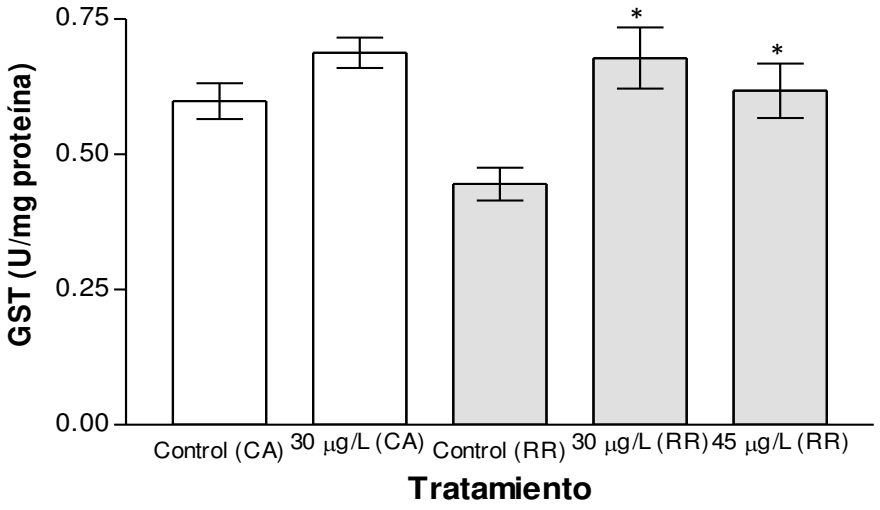


Figura 2.29.: Actividad glutatión-S-transferasa en larvas de *R. arenarum* provenientes de un ecosistema urbano contaminado, de la zona aledaña al Canal Aliviador (sitio CA) y en el último tramo del Río Reconquista (sitio RR), tratadas con cobre durante los primeros 14 días del desarrollo larval. * Diferencia significativa respecto del control ($p \leq 0,05$).

El contenido basal de glutatión reducido también resultó significativamente diferente entre los individuos provenientes de los dos sitios. También en este caso se repitió el patrón registrado en las actividades SOD y GST, donde no se observaron diferencias significativas entre los individuos expuestos a cobre para los individuos provenientes del sitio CA, mientras que sí la hubo para ambos tratamientos con el metal en los individuos provenientes del sitio RR, dicho aumento en el contenido de glutatión reducido fue de entre casi 1,5 y 2 veces mayor en los tratamientos (Figura 2.30.).

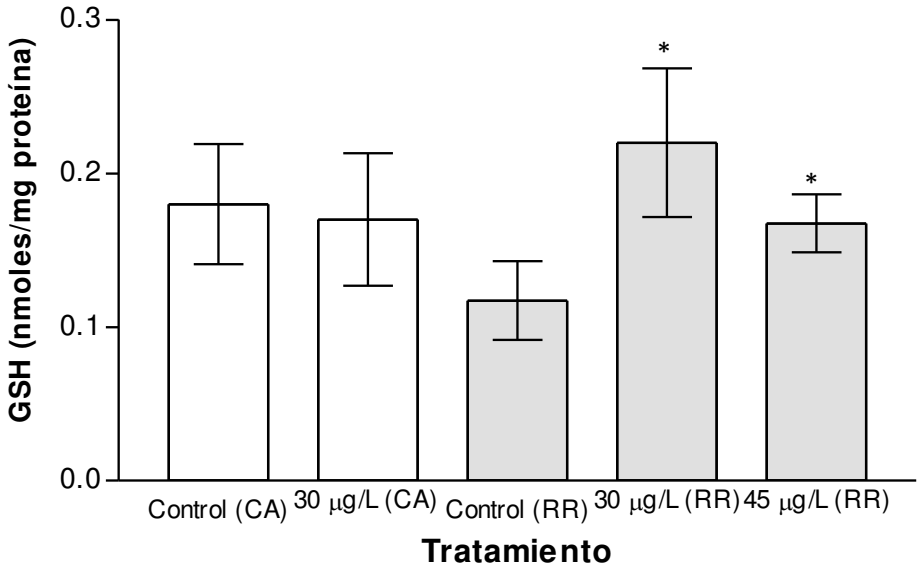


Figura 2.30.: Contenido de glutatión reducido en larvas de *R. arenarum* provenientes de un ecosistema urbano contaminado, de la zona aledaña al Canal Aliviador (sitio CA) y en el último tramo del Río Reconquista (sitio RR), tratadas con cobre durante los primeros 14 días del desarrollo larval. * Diferencia significativa respecto del control ($p \leq 0,05$).

2.5. Discusión

Los resultados mostraron una alta toxicidad del cobre sobre los embriones y larvas de *Rhinella arenarum*, tanto en exposición continua como por pulsos de 24 h en diferentes estadios de desarrollo.

Las curvas de isotoxicidad, curvas TOP´s, representan las concentraciones que ejercen el mismo grado de efecto adverso para diferentes tiempos de exposición (Herkovits y Helguero 1998), por lo que sería de gran importancia incorporarlas en todos los estudios de toxicidad. El aumento significativo en la toxicidad del cobre observada en el bioensayo continuo desde blástula (E.4), con una CL50- 24 h de 137 µg Cu^{2+}/L, que descendió a 42,7 µg Cu^{2+}/L en el estadio de tubo neural (E.17), para continuar descendiendo a 19,5 µg Cu^{2+}/L en el estadio de opérculo completo (E.25), anticipaba una marcada susceptibilidad estadio-dependiente al cobre, luego confirmada por los bioensayos de exposición por pulsos en diferentes estadios.

En general, los embriones en estadio de blástula (E.4) y gástrula (E.11) mostraron la mayor resistencia al cobre, mientras que los estadios organogénicos fueron los más susceptibles, de esta manera la susceptibilidad de los embriones aumentó desde la neurulación (E.13), hasta la aparición de los primeros movimientos, Respuesta Muscular (E.18), resultando desde este estadio hasta Boca Abierta (E.21) los estadios más susceptibles. Así, el estadio de Circulación Branquial (E.20) tuvo la CL50 más baja con un valor de 17 (15,8 - 18,4) µg Cu^{2+}/L. Desde el estadio de Pliegue Opercular (E.23) en adelante, la resistencia al cobre aumentó gradualmente hasta alcanzar valores similares a los obtenidos para blástula y gástrula, así, la CL50 del estadio de esbozo de miembros anteriores (E.28) fue de 138,61 (128,6 – 150,3) µg Cu^{2+}. Este patrón de susceptibilidad diferencial, dentro de los estadios embrionarios, también fue descripto para otros metales, como plomo (Pérez-Coll y Herkovits 1990) y níquel (Sztrum et al. 2011), y sustancias orgánicas como el 2,4-D (Aronzon *et al.* 2011a), confirmando como patrón general la mayor susceptibilidad de los estadios organogénicos a los diversos contaminantes.

La toxicidad del cobre por exposición continua desde el estadio de opérculo completo o final del desarrollo embrionario (E.25) en adelante no mostró cambios significativos a lo largo de la exposición (168 h), lo que confirma resultados anteriores (Herkovits y Helguero 1998) y demuestra que el cobre en este estadio larval alcanza su máxima toxicidad durante las primeras 24 h de exposición. Este patrón de efecto tóxico máximo encontrado para el cobre, sobre las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas desde el E.25, es similar al ya informado para el cadmio (Pérez-Coll y Herkovits 1996), mientas que en el caso de la exposición a níquel, la toxicidad aumenta significativamente cuando se extiende el tiempo de evaluación más allá de las 96 h (Sztrum et al. 2011).

En el caso de los estadios larvales avanzados (E.28), hubo un aumento significativo de hasta 2,5 veces en la resistencia al cobre con respecto a los estadios larvales más tempranos (E.25), sin embargo, la toxicidad del cobre aumentó significativamente cuando las larvas expuestas desde E.28 avanzaban hacia la metamorfosis.

Al comparar el periodo que comprende el inicio del desarrollo larval (E.25) y el correspondiente al E.28 en el tratamiento continuo hasta alcanzar la metamorfosis y los tratamientos continuos desde E.25 y E.28 por 168h, respectivamente, se observa por un lado, el mismo patrón de sensibilidad para el E.25, pero no para E.28, donde si bien las concentraciones letales alcanzadas son menores, no se encuentra un aumento significativo diario en la toxicidad.

Con respecto a la metamorfosis, es llamativo que el porcentaje de individuos que alcanzaron el estadio juvenil sea igual para los dos tratamientos, siendo una de las concentraciones el valor NOEC letal (7,5 µg Cu^{2+}/L) y la otra, la CL50 (12 µg Cu^{2+}/L) a los 47 días de exposición. Más aún, cuando se analiza el porcentaje acumulado de individuos que alcanzó la metamorfosis en relación a los sobrevivientes al día 47, los individuos expuestos a 7,5 µg Cu^{2+}/L metamorfosearon en menor porcentaje que los expuestos a 12 µg Cu^{2+}/L, que si bien éstos últimos resultaron en una mayor mortalidad hacia los 47 días de exposición, los individuos que lograron sobrevivir dicho periodo metamorfosearon en proporciones similares a los controles.

También se encontraron diferencias en el peso corporal a los 47 días de exposición, sólo para la exposición más baja si bien dicha diferencia no se mantuvo al momento de alcanzar la metamorfosis lo que podría indicar la necesidad de alcanzar un peso determinado. Igualmente, los individuos expuestos a la concentración más baja requirieron mayor tiempo para metamorfosear, que podría ser el tiempo necesario para alcanzar el peso requerido. Estas diferencias podrían estar indicando que los organismos intentan desencadenar una respuesta al metal en las condiciones de exposición más baja, sin embargo la extensión de la exposición y la necesidad de recuperar peso, los pondría en una situación desventajosa, disminuyendo finalmente la sobrevida y capacidad de metamorfosear.

Es importante resaltar que la superposición de los intervalos de confianza de algunas de las CL50, con algunas CL10 y CL90 (Figura 2.3), implican una dificultad para establecer concentraciones y umbrales de protección ambiental, ya que para ciertos estadios del desarrollo, la exposición a concentraciones de cobre cercana a los valores de CL10 o CL50 podría representar un riesgo para el 50% o 90% de la población, respectivamente (Herkovits y Helguero 1998). Esta superposición podría deberse a la heterogeneidad entre réplicas, por lo que un aumento en el número muestral podría disminuir los intervalos, sin embargo las CL están distribuidas en un rango de concentraciones chico, por lo que la superposición podría mantenerse y estaría indicando un estrecho rango de susceptibilidades individuales al metal dentro de las poblaciones evaluadas. Esto destaca la importancia de informar no solo la CL50 si no también la CL10 y CL90, principalmente para fines de manejo y valores de referencia guía para la protección de la vida acuática.

La mayoría de los estudios de toxicidad se basan en los efectos agudos sobre determinados periodos del ciclo de vida, como son los casos informados para larvas de *Rana sphenocephala*, *Bufo boreas* and *Rana catesbeiana*, con CL50-96h de cobre de 230 µg/L, 120 µg/L y 2400 µg/L, respectivamente (Bridges et al. 2002; Ferreira et al. 2004). Para los estadios larvales, *Rhinella arenarum* presentó una susceptibilidad similar a la de *B. boreas*. Sin embargo, en función de la susceptibilidad estadio-dependiente informada, la susceptibilidad de *R. arenarum* resultó hasta 6 veces mayor que la informada para *B.*

boreas. Por este motivo, la evaluación de la susceptibilidad en distintos estadios del desarrollo sería de gran importancia para la protección de las especies.

Por otro lado, las diferencias encontradas en la susceptibilidad al cobre podrían deberse tanto a la forma de la sal empleada en los bioensayos, como a las condiciones de salinidad y temperatura de los bioensayos de toxicidad. De hecho, la forma sulfatada de la sal podría ser menos tóxica que la clorada, probablemente debido a la mayor solubilidad de la última (IPCS 1998a). Además, las altas concentraciones de otros iones en el medio de mantenimiento, compiten con el cobre en el ingreso y unión del metal, reduciendo la incorporación del mismo, su bioacumulación y la toxicidad (Santore et al. 2001). Ya han sido informadas cómo condiciones de salinidad y temperatura diferentes en el medio de mantenimiento de FETAX y ANFITOX podrían explicar diferencias en los resultados de la toxicidad (Herkovits y Pérez-Coll 2003).

El cobre también causó importantes efectos subletales en todos los estadios del desarrollo evaluados. El potencial teratogénico para el tratamiento continuo desde blástula (E.4), hasta completar el desarrollo embrionario o inicio del desarrollo larval (E.25), resultó alrededor de 2, cuando valores mayores a 1,5 implican un alto riesgo para los individuos de resultar malformados en ausencia de una letalidad significativa (ASTM 1993b). Por todo esto, es importante en el caso del cobre incorporar la teratogénesis como un parámetro final de evaluación de riesgo. Así como fue informado para la letalidad, los efectos teratogénicos producidos por el cobre también mostraron un patrón estadio-dependiente, con los estadios organogénicos como los más sensibles al metal. La reducción en talla corporal producida por el cobre en todos los estadios de desarrollo evaluados (Tabla 2.5.), también fue informada para *Rana pipiens* (Chen *et al.* 2007; Redick y La Point 2004) y puede ser considerada como un efecto inespecífico del agente tóxico en los primeros estadios de vida (Pérez-Coll y Herkovits 1990; Sztrum *et al.* 2011). El hecho de que ciertas malformaciones, como incurvaciones en la cola e hidropesía, se hayan observado en todos los estadios del desarrollo pareciera reflejar que el cobre podría causar algunos efectos adversos independientemente del periodo de exposición, mientras que otras malformaciones, como el tapón vitelino persistente, están exclusivamente relacionadas con el estadio de desarrollo en el cual la diferenciación morfogénica y/o celular ocurre, en este caso durante la

gastrulación. Esto fue parcialmente confirmado, considerando que la exposición al cobre durante los primeros estadios del desarrollo mostraron malformaciones similares como anormalidades cefálicas (microcefalia/acefalia), malformaciones del aparato bucal, agenesia o subdesarrollo de branquias y cola, incurvaciones en la cola, hidropesía y reducción del tamaño corporal. En el caso de los efectos menos severos, los embriones en estadios más tardíos se recuperaron al avanzar el desarrollo. Esto podría explicarse con el concepto general de la capacidad de regulación y recuperación durante los primeros estadios de desarrollo (Herkovits 1977).

La marcada susceptibilidad estadio-dependiente a un agente químico, podría explicarse basándose en la complejidad alcanzada en la diferenciación celular y en los procesos morfogénicos que ocurren en el desarrollo (Saxen 1976). La toxicidad del cobre, una vez superada la capacidad homeostática, tiene su base en los efectos sobre la estructura y función de las macromoléculas como el ADN, proteínas y membranas principalmente a través de su mecanismo como generador de especies reactivas de oxígeno(Valko *et al.* 2006). En el caso de la hidropesía, la interferencia del cobre sobre el funcionamiento de la bomba Na/K ATPasa podría estar relacionada con este efecto adverso (Grosell y Wood 2002). Más aún, la alta susceptibilidad al cobre en el estadio de Circulación Branquial (E.20) podría también estar relacionada con la inhibición de la bomba de NA/K ATPasa como en el caso de la hidropesía informada en branquias de peces. La hipoxia moderada debida al daño en las branquias también podría contribuir a la toxicidad del cobre (Handy 2003). La disociación celular observada desde el estadio de Gástrula (E.11) hasta Brote Caudal (E.7) pareciera reflejar la interferencia del cobre con la homeostasis del calcio (Grosell y Wood 2002), lo que produce una reducción en la adhesividad celular. Los efectos neurotóxicos expresados como movimientos erráticos podrían (Chen *et al.* 2007; Redick y La Point 2004) asociarse a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Beauvais *et al.* 2000) como ya fue informado para peces (Vieira et al. 2009).

Con respecto a los ensayos preliminares de estrés oxidativo inducido por el cobre en el desarrollo embrionario de *Rhinella arenarum*, se evaluó la peroxidación lipídica como un marcador de daño, y se analizó la actividad de la enzima catalasa (CAT), ya que ha sido propuesta junto con la enzima superóxido dismutasa (SOD) como la principal defensa

antioxidante durante los primeros estadios del desarrollo tanto para *Xenopus laevis* como para *R. arenarum*, mientras que se ha postulado que el contenido de glutatión reducido (GSH) y la actividad de varias enzimas relacionadas con su metabolismo aumentarían durante el desarrollo cuando las branquias están totalmente desarrolladas en el caso de *R. arenarum* (Ferrari et al. 2008). Los tratamientos con el metal mostraron un aumento en la peroxidación lipídica para el estadio de blástula, uno de los más resistentes, hecho que podría explicarse por la gran cantidad de vitelo expuesto al daño oxidativo. Si bien las diferencias no fueron significativas, se observó un aumento en el patrón de peroxidación lipídica por exposición al cobre en el estadio de Circulación en la Aleta (E.22), el cual se encuentra entre los más susceptibles. Coincidentemente la actividad de la enzima catalasa mostró diferencias significativas en ambos estadios, si bien en el estadio de blástula se observó un aumento en la actividad enzimática, para el E.22 se observó una disminución en la misma. Este patrón opuesto podría estar relacionado con la susceptibilidad estadio-dependiente, dado que para las mismas concentraciones de exposición, en el caso del estadio temprano el aumento de la actividad enzimática podría ser un mecanismo de defensa, mientras que para el E.22 la disminución de la actividad enzimática sería un síntoma del efecto letal de estas concentraciones en dicho estadio.

Por otro lado, se esperaba un aumento en los valores basales de los parámetros de estrés oxidativo evaluados (Sztrum 2010), aunque no se observaron diferencias significativas entre los valores de peroxidación lipídica entre los estadios evaluados. Sin embargo, el E.22 presenta un pico de actividad catalasa que podría estar relacionado con el desarrollo completo del sistema circulatorio y ayudaría a contrarrestar el aumento en la generación de ROS causado por el notable incremento en la actividad motora y en el metabolismo aeróbico de los embriones. Por otro lado, la baja actividad catalasa en el E.25, podría estar indicando un cambio a otra vía de defensa antioxidante.

Al evaluar la exposición a partir del último estadio del desarrollo embrionario o inicio del desarrollo larval (E.25), como es el caso del tratamiento crónico al metal, se cuenta con la posibilidad de evaluar la respuesta de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo durante un período más estable, desde el punto de vista fisiológico del individuo, aportando este protocolo, información más enfocada al efecto producido por el

agente en particular. De esta forma, se confirmó el carácter pro-oxidante del cobre, ya que la exposición al mismo produjo un nivel entre 2,3 y 7 veces mayor de peroxidación lipídica que los controles. En base a los parámetros de defensa evaluados, la inducción en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) sería el principal mecanismo antioxidante frente al cobre, confirmando el cambio en la vía de defensa respecto a la CAT durante el desarrollo embrionario previamente observado, así como también una tendencia al aumento de la actividad de la glutation-S-transferasa (GST). Otro trabajo en embriones de *R. arenarum*, tras analizar la respuesta de varias enzimas antioxidantes al paraquat, también concluyen que la actividad SOD, específicamente la Mn-SOD, constituye la principal vía de defensa frente al estrés oxidativo generado por este herbicida (Mussi y Calcaterra 2010). Otro estudio realizado con larvas de *Xenopus laevis* expuestas en forma crónica a distintos extractos de petróleo crudo, también reveló un aumento en la peroxidación lipídica acompañado por una mayor actividad SOD, respecto del control, para concentraciones bajas de petróleo (Eriyamremu et al. 2007). Sin embargo también informaron que al aumentar las concentraciones de exposición, se invirtió la tendencia en la actividad SOD. De esta forma quedarían los individuos tratados más expuestos al ataque de las ROS, hecho que se asoció con una pérdida en la masa corporal. Estos resultados están en línea con los informados para la mayor concentración de cobre en la que tampoco se observó un aumento de la SOD, aunque en este caso, la exposición al ataque de las ROS estaría más asociada a la mortalidad, dado que la concentración de exposición más alta se encuentra cercana al valor de la CL50. Es decir, el individuo se encontraría llegando a la fase de agotamiento en la respuesta frente al cobre.

Por su parte, si bien no se trata de diferencias significativas, la tendencia al aumento de la actividad GST en los individuos tratados con 30 µg Cu^{2+}/L, presenta su correspondencia con la tendencia a la disminución en el contenido de GSH, que se trata, justamente, del sustrato a conjugar por la enzima. En este sentido podría resultar de gran interés un estudio más detallado del rol de la vía del glutatión como mecanismo de defensa antioxidante.

Como consecuencia de la evaluación de la respuesta de *Rhinella arenarum* provenientes de sitios con distinto grado de contaminación de la cuenca del Río Reconquista a la presencia

del cobre, se observó que la susceptibilidad de las larvas de provenientes de las zonas vecinas al canal aliviador (CA) fueron significativamente más sensibles que las larvas provenientes del último tramo del Río Reconquista (RR) y del Parque Industrial de Tigre (PI). Estos resultados están en línea con los informados en el área de toxicología evolutiva y enfocados al estudio genético, los cuales han postulado que las modificaciones del medio ambiente debido a la contaminación antrópica, han demostrado alterar a nivel molecular, las características de varias poblaciones de una misma especie de anuros (Matson *et al.* 2006) como así también la tolerancia a compuestos de origen antrópico (Bridges y Semlitsch 2000). Teniendo en cuenta la ubicación geográfica de los sitios de muestreo (Figura 2.2.), tanto el sitio RR, como PI se encuentran próximos a ambientes más urbanizados que el sitio CA, este hecho podría asociarse a la mayor resistencia evidenciada por las larvas provenientes de los sitios RR y PI frente al cobre.

Esta diferencia en la resistencia podría deberse a los mecanismos de defensa antioxidantes. La exposición a cobre de las camadas provenientes de dos de los sitios muestreados produjo aumento en los niveles de peroxidación lipídica, lo que confirma el carácter pro-oxidante del metal. Y aunque, coincidentemente con lo observado en este estadio del desarrollo, la actividad de la enzima catalasa (CAT) no se modificó significativamente para ninguno de los dos sitios contaminados, sí se encontró un aumento significativo, no solo de la primera línea de defensa, SOD, sino que también se vio aumentada tanto la actividad de la GST, como el contenido de GSH en las larvas del sitio RR expuestas al metal.

Si bien algunos estudios que compararon la sensibilidad de *Rhinella arenarum* con *Rhinella fernandezae* han planteado una mayor susceptibilidad de esta última tanto por exposición al cromo como al níquel (Natale 2006; Sztrum 2010), para el caso del cobre la diferencia en la susceptibilidad se vio sujeta al lugar de origen de las puestas: mientras que las larvas *R. fernandezae* provenientes del sitio CA resultaron significativamente más resistentes que *R. arenarum* tanto en la exposición aguda como crónica, este resultado se vio invertido para el sitio PI donde las larvas de *R. arenarum* resultaron significativamente más resistentes. Esto podría estar relacionado con la adaptación diferencial de cada especie a cada ambiente, así como también al tiempo que ha pasado cada población habitando el

sitio de muestreo. Es notable sin embargo que si bien la toxicidad para *R. arenarum* se mantuvo constante desde el periodo agudo al crónico corto, para el caso de *R. fernandezae* en todos los casos se registró un aumento significativo de la susceptibilidad al extender la exposición aguda, lo que podría sugerir una diferencia en el mecanismo de acción y/o la tasa de incorporación del metal entre ambas especies.

Si bien el rango de concentraciones en el que el cobre causa toxicidad tanto en peces como en invertebrados de agua dulce es amplio, si se compara la toxicidad del cobre en peces, cuyo rango va desde 340 a 10000µg/L, y para invertebrados de agua dulce, entre 54 y 1700 µg/L (IPCS 1998a), es notable la alta susceptibilidad de los embriones de anfibio a este metal, ya que la CL50-24 h informada en este estudio para el estadio más susceptible, E.20, fue de 17 (15,8-18,4) µg Cu^{2+}/L. Más aun, debido a los impactos antropogénicos, las concentraciones de cobre se ven aumentadas en los medios naturales, como es el caso del Río Reconquista, con valores de 27 a 64 µg Cu^{2+}/L (Ferrari et al. 2005). Así, los resultados sobre la susceptibilidad de *R. arenarum* al cobre destacan que la toxicidad informada en el Río Reconquista podría estar asociada a los altos valores de cobre presentes en este medio urbano (Herkovits y Pérez-Coll 2003).

Para analizar el riesgo ecológico (HQ, por su siglas en Inglés) de esta sustancia para *Rhinella arenarum*, se lo puede estimar numéricamente utilizando la aproximación planteada por USEPA (1998), adoptando el peor escenario posible basándose en el "principio precautorio", así se realiza el cociente entre un valor ambiental y una medida puntual de toxicidad. Como medida de referencia, el valor HQ se lo compara con el "valor de preocupación" (LOC, del inglés: *level of concern*) propuesto por USEPA. El LOC es una herramienta de política ambiental que se utiliza para interpretar el cociente de riesgo y analizar el riesgo potencial para los organismos *no blanco*, así como la necesidad de tomar medidas reglamentarias. El valor LOC para considerar la existencia de un potencial riesgo es 1. Si el HQ supera el valor 1, es posible que la sustancia en cuestión sea responsable de producir efectos. Para el caso del cobre, se podría utilizar como medida de toxicidad puntual la CL10 del estadio más susceptible, E.20, a las 24 h, y la del tratamiento continuo desde blástula (E.4) a los 47 días; como medida de valor ambiental podría utilizarse el valor conocido del Río Reconquista (Ferrari et al. 2005), así el valor de HQ sería de 5,5 y 7,1,

respectivamente. Esto pone de manifiesto la gravedad de la situación ambiental que representan las concentraciones reales del metal en los ambientes donde se encuentran habitualmente las poblaciones de *R. arenarum,* en este caso relacionadas particularmente con la sobrevida. Sin embargo la situación se ve agravada si se considera que los potenciales teratogénicos mostraron que el metal también presenta un alto riesgo para los individuos de resultar malformados sin letalidad significativa.

Capítulo 3: Nonilfenol

3.1. Objetivos e hipótesis.

3.1.1. Objetivos.

Evaluar la toxicidad letal y subletal del Nonilfenol, utilizando bioensayos de toxicidad con embriones y larvas de *Rhinella arenarum* (ANFITOX), realizando las curvas de isotoxicidad o curvas TOP, en ensayos agudos (de hasta 96 h) y crónico-cortos (168 h).

A su vez, se buscó comparar la toxicidad de dos alquilfenoles, utilizando bioensayos de toxicidad crónica de larvas en estadio de Opérculo Completo (E.25) de *Rhinella arenarum* por exposición al nonilfenol y octilfenol hasta completar la metamorfosis.

3.1.2. Hipótesis.

El nonilfenol causa importantes efectos letales y subletales en embriones y larvas de *Rhinella arenarum* a tiempos de exposición agudos y crónicos cortos.

La toxicidad del nonilfenol en los estadios embrio-larvales de *Rhinella arenarum* puede analizarse a partir de curvas de isotoxicidad.

La susceptibilidad al nonilfenol de los embriones y larvas de *Rhinella arenarum* es diferente en el desarrollo embrionario y larval.

Existe una toxicidad diferente del nonilfenol y octilfenol sobre los embriones y larvas de *Rhinella arenarum*.

3.2. Introducción

El nonilfenol (NP, por sus siglas en inglés nonylphenol)(Figura 3.1.), es un compuesto xenobiótico, sintetizado por primera vez en 1940. Se produce a partir de intermediarios cíclicos en el refinamiento del petróleo y alquitrán. Es fabricado por la alquilación de fenoles con una mezcla isomérica de nonenos en presencia de un catalizador ácido. El producto final es una mezcla de varios isómeros.

El nonilfenol es utilizado mayoritariamente en la producción de alquilfenoles etoxilados, surfactantes no iónicos altamente efectivos, con un rendimiento excepcional. En consecuencia es ampliamente utilizado tanto en el plano industrial, comercial y doméstico, en detergentes, emulsionantes, así como en agentes humectantes, dispersantes y antiestáticos, también como des-emulsionantes y solubilizantes en la fabricación de pinturas, cosméticos, agentes abrasivos, plásticos, pulpa y papel, textiles, alimentos y agroquímicos como plaguicidas (Ying *et al.* 2002). El Nonilfenol es también utilizado en la fabricación de lubricantes, resinas, estabilizadores químicos y antioxidantes (Federal Register 1990). Además de otros alquilfenoles como el octilfenol, el nonilfenol es el principal producto de degradación de los alquilfenoles, el cual no sufre transformaciones ulteriores (Schroder 2001) .

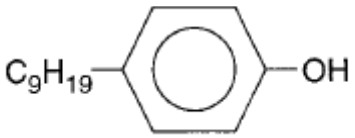


Figura 3.1.: Estructura química del 4-Nonilfenol.

La producción del nonilfenol creció exponencialmente desde sus inicios, representando el 80% del total de los alquilfenoles etoxilados. Se calculó que

aproximadamente para inicios del siglo XXI la producción anual mundial fue de unas 500.000 toneladas, de las cuales el 60% terminó en los ambientes acuáticos (Soares *et al.* 2008).

Importantes cantidades de estos alquilfenoles fueron encontradas en aguas superficiales y en sedimentos acuáticos (Fernández *et al.* 2007), en el aire (Dachs *et al.* 1999; Van Ry *et al.* 2000) e incluso en alimentos de consumo humano . Una vez que alcanzan la atmósfera estos compuestos pueden ser transportados hacia el ambiente acuático por deposiciones húmedas (Fries y Puttmann 2004); también ingresan al ambiente acuático a través de los vertidos de aguas residuales mayoritariamente provenientes de industrias textiles, fábricas de pasta de papel, por deriva y escurrimiento de los productos aplicados en el campo, y en menores cantidades por los efluentes domésticos (Naylor 1995).

Si bien la clasificación del nonilfenol causó controversias en los años `90, la Unión Europea lo clasificó como una sustancia peligrosa prioritaria y reguló su uso desde 2003. Finalmente la USEPA, aceptando el riesgo que representaba, preparó una guía de la sustancia para el medio acuático, recomendando un valor guía para agua dulce de concentración media no mayor a 6,6 µg/L de cuatro días (US EPA 2005). Sin embargo, en otros países como India, China e inclusive los de Sud América se produce y comercializa en grandes cantidades y no se han tomado medidas respecto del control de su uso y posibles reemplazos(Guenther *et al.* 2002). En Argentina se ha informado la presencia de nonilfenol en el arroyo Morón en la provincia de Buenos Aires, probablemente relacionada con la descarga de detergentes (Co.P.A.A.R.A. 2009). Sin embargo, el caso más emblemático de la Argentina, surgió en pleno litigio por la planta de celulosa ubicada en Uruguay, cuando un informe realizado por el especialista Juan Carlos Colombo, director del Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad Nacional de La Plata, informó que la planta de celulosa Botnia emitía nonilfenol en las aguas del río Uruguay (Cibeira 2009).

La presencia de nonilfenol en el medio acuático está estrechamente relacionada con la actividad antrópica, así los cuerpos de agua con mayor contaminación se encuentran asociados a descargas de plantas de tratamiento, particularmente porque dichas plantas son ineficientes en la eliminación del nonilfenol. Se encontró que la eficiencia en la remoción de nonilfenol en las plantas de tratamiento es muy variable oscilando entre un 11% a un

99%, dependiendo del tipo de tratamiento empleado (Berryman *et al.* 2004). Se sabe que un tratamiento compuesto por un proceso de ozonificación y subsecuentemente una filtración de carbón activado con cloración es capaz de remover hasta un 95% de nonilfenol (Petrovic *et al.* 2003), por lo que el agregado de estas técnicas o también el tratamiento con UV, dentro de las ya existentes en las plantas podría remover la sustancia, más aún cuando la misma es generada en los procesos de tratamiento y es común encontrarlos en mayores concentraciones en los efluentes que en las sustancias que entran al tratamiento. Sin embargo estos procesos son muy costosos (Soares *et al.* 2008).

Además, la contaminación del agua está también asociada a la proximidad de zonas industriales, zonas urbanizadas, cercanía a bocas de tormenta, o descargas pluviales y desagues. En Estados Unidos, el nonilfenol no solo es uno de los contaminantes de mayor presencia sino que fueron informadas concentraciones medias comprendidas entre 0,002 y 1,6 mg/L en muestras ambientales tomadas de diversos cuerpos de agua entre 1999-2000 (Shackelford *et al.* 1983). Asimismo, en ríos de Italia previo a acuerdos realizados con las industrias, se encontraban concentraciones de nonilfenol en el orden de los 0,2 mg/L (Soares *et al.* 2008).

La vida media y descomposición del nonilfenol fue estudiada bajo diversas condiciones, así se comprobó que su degradación está influenciada por la materia orgánica, la temperatura, las condiciones aeróbicas, las bacterias asociadas y las condiciones lumínicas. La vida media del nonilfenol en agua de estanque y agua corriente fue estimada en 16,5 y 16,3 días, respectivamente. Sin embargo, no hubo degradación del compuesto cuando se utilizó agua esterilizada mediante autoclave y sedimento (Sundaram y Szeto 1981). También se ha informado que en condiciones de anoxia el nonilfenol no se degrada (Soares *et al.* 2008). Por otro lado, la concentración inicial del compuesto, así como la temperatura del agua afectan la tasa de degradación de la sustancia; así la vida media del compuesto en agua (31mg/L) fue de 20 días a 22°C (Staples *et al.* 1999). Además, se ha estimado que la vida media de degradación de los nonilfenoles puede ser mayor a 60 años una vez que ingresa a los sedimentos (Shang *et al.* 1999).

El nonilfenol ha sido calificado como un metabolito crítico por su altísima resistencia a la biodegradación, y porque al ser altamente lipofílico tiende a acumularse no

solo en los sedimentos, sino también en los tejidos grasos de los organismos acuáticos (Arukwe *et al.* 2000; Ekelund *et al.* 1990).

La primera evidencia de que los alquilfenoles podían ser estrogénicos, compuestos capaces de interferir el normal desarrollo y funcionamiento del sistema endocrino, fue publicada en 1938 (Dodds y Lawson 1938). Sin embargo, no fue hasta 1991 cuando accidentalmente se observó que el nonilfenol, que era empleado en la fabricación de los tubos de ensayos usado en los experimentos, era capaz de iniciar la proliferación de células tumorales de mama como si hubiera estrógenos presentes (Soto *et al.* 1991).

Se ha descubierto que el nonilfenol puede simular la hormona natural 17β-estradiol compitiendo por el sitio de unión al receptor (Bevan *et al.* 2003) (Figura 3.2.). La hormona natural, influye sobre el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales femeninas, así como en la maduración y funcionamiento de los órganos sexuales accesorios (Alberts *et al.* 1983). También está involucrada en el sistema neuroendocrino y esquelético y es capaz de promover carcinogenesis en los "tejidos blanco" (Lee y Lee 1996). Por lo tanto, se espera que el nonilfenol sea responsable del inicio de una variedad de respuestas en los organismos expuestos. También se ha informado que el nonilfenol podría tener actividad antiandrogénica, siendo capaz de interferir en el normal funcionamiento de los andrógenos que son esenciales para el normal desarrollo de los machos y su sistema reproductor. En este caso se ha sugerido que la vía no sería por competencia con el receptor adrogénico, sino por una activación de múltiples etapas del receptor (Lee *et al.* 2003). Así, se han estudiado los efectos del nonilfenol en distintos organismos, observándose la inducción de síntesis de proteínas femeninas en la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss* (Jobling *et al.* 1996), en el pez *Oryzias latipes* (Tabata *et al.* 2001),como asimismo se observó que la morfología y la fertilidad de los machos fue afectada por la exposición al nonilfenol en *Xiphophorus maculates* (Kinnberg *et al.* 2000). Con respecto a los anfibios, el nonilfenol causó feminización en *Xenopus laevis* (Mosconi *et al.* 2002), e indujo anormalidades morfológicas, aumento de apoptosis y alteración del desarrollo embrionario en el momento de la diferenciación de la cresta neural (Bevan *et al.* 2003).

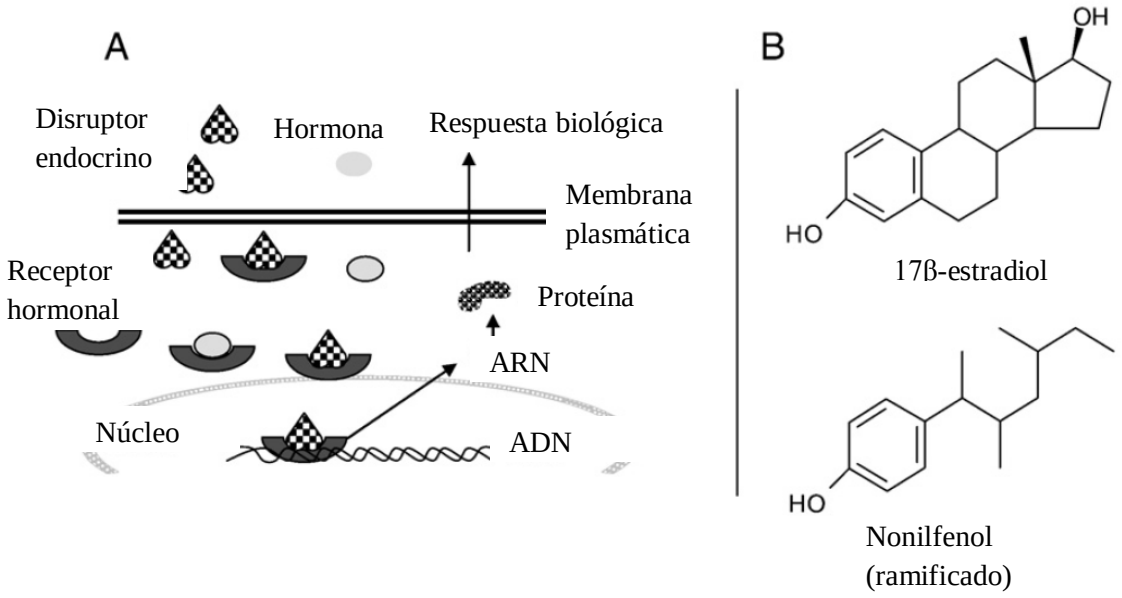


Figura 3.2.: (A) Competencia por la unión al receptor estrogénico entre el nonilfenol y el 17β-estradiol en la célula, uno de los mecanismos de acción del nonilfenol. (B) Comparación de la estructura química del 17β-estradiol y el nonilfenol ramificado. Modificado de "Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters" (Soares *et al.* 2008)

El efecto tóxico del nonilfenol ha sido ampliamente estudiado en una gran diversidad de taxones, así en el caso de los invertebrados se informó un valor medio agudo para *Daphnia magna* de Concentración Efectiva (CE) de 140,6 µg/L (US EPA 2005), así mismo se informó una CL50-96 h de 97,5 mg/l, un NOEC menor a 25 mg/l para *Hydra attenuata* (Pachura et al. 2005), y una CL50-96 h de 1670 µg/l para el crustáceo *Corophium volutator* (Brown et al. 1999). Los peces de agua dulce se encuentran en el rango medio de toxicidad, así la CL50 aguda media es de 110 µg/L para *Etheostoma rubrum* y de 289 µg/L para *Gila elegans* (US EPA 2005). En anfibios se han informado valores de CL50 a las 96 h de 0,34µg/l (0,31-0,37), 0,12 µg/l (0,09 y 0,15) y 3,9-5,4 mg/L en *Rana spenocephala, Bufo boreas y Xenopus laevis*, respectivamente (Bridges *et al.* 2002; Mann y Bidwell 2000). También se ha informado una CL50-134h de 6,4 (6,1–6,6) mg/L y CL50-140h de 9,2 (9,1–9,4) mg/L para *Crinia insignifera* y *Litoria adelaidensis*, respectivamente (Mann y Bidwell 2000). Sin embargo, hasta el momento no se ha informado sobre la toxicidad del nonilfenol para anfibios autóctonos, como es el caso de *Rhinella arenarum.*

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Obtención de material biológico

Los embriones y larvas de *Rhinella arenarum* (sapo común americano) se obtuvieron, se seleccionaron y mantuvieron según lo descripto en la sección 2.3.1.1.

3.3.2. Criterio de aceptación del material biológico.

El criterio de aceptación del material biológico fue el mismo, así la calidad y fecundidad de los huevos fue evaluada diariamente, considerándose aceptable una tasa de fertilidad mayor al 75 % y más de un 70% de sobrevida de embriones normales al alcanzarse el estadio de néurula (E.13) (Herkovits y Pérez-Coll 1999).

3.3.3. Protocolos experimentales

Entre los años 2007 y 2011 se realizaron los bioensayos con embriones y larvas provenientes de parejas independientes, habiendo repetido, como mínimo tres veces, cada uno de los protocolos experimentales que se describen a continuación. Algunos de los bioensayos de exposición al Nonilfenol, fueron repetidos hasta cinco veces, usando embriones y larvas de diferentes camadas.

3.3.3.1 Exposición continua.

Se aplicó el conjunto de bioensayos estandarizados ANFITOX (Herkovits y Pérez-Coll 1999) descriptos en la sección 2.3.3.1.

- ANFIEMB

- ANFIAGU.
- ANFICOR.

Por otro lado, se realizaron bioensayos de toxicidad crónica comparando la toxicidad del nonilfenol con el octilfenol, utilizando embriones en estadio de blástula temprana (E.4) de *Rhinella arenarum* por 336h.

Asimismo, se realizaron bioensayos de toxicidad crónica comparando la toxicidad del nonilfenol con el octilfenol, utilizando larvas en estadio de Opérculo Completo (E.25) de *Rhinella arenarum* hasta completar la metamorfosis. Se consideró que un individuo había culminado la metamorfosis cuando habiendo desarrollado los miembros posteriores y habiendo salido los anteriores, sufrió la reducción completa de la cola.

Este test es comparable al ANFICOR pero más prolongado en el tiempo de exposición. La diferencia radica en que en estos bioensayos no solo se registró la letalidad, sino el tiempo requerido y el peso de los individuos al alcanzar la metamorfosis, así como el porcentaje acumulado de individuos que lograron metamorfosear.

3.3.4. Condiciones generales de los tratamientos.

Las condiciones generales de los tratamientos se realizaron según lo descripto en la sección 2.3.4.

3.3.5. Evaluación de los efectos teratogénicos.

La evaluación de los efectos teratogénicos se realizaron según lo descripto en la sección 2.3.5.

3.3.6. Preparación de las soluciones.

Se preparó una solución madre de nonilfenol 45,4 g/L tomando el volumen necesario de Nonilfenol (Fluka, grado técnico, pureza 96,9 %, densidad 0,937 g/cm^3. CAS: 84852-15-3. Comercializado por Sigma-Aldrich) en acetona. Para la toxicidad comparada, también se preparó una solución madre de octilfenol 40 g/L tomando el peso necesario (Pureza 97%, Cas: 140-66-9. Comercializado por Sigma-Aldrich) en acetona.

Las soluciones de uso, se prepararon de una segunda solución stock de 800 mg nonilfenol/L y 400mg octilfenol, en un rango de 0,0025 a 4 mg/L, para ambas sustancias. Las soluciones fueron preparadas diluyendo la solución stock en SA. Simultáneamente, a los individuos control en SA, se mantuvieron controles de acetona, que consistieron en triplicados de 10 embriones o larvas expuestos a la máxima concentración de acetona utilizada en el bioensayo.

3.3.7. Análisis de datos

Los datos de perfiles de toxicidad se analizaron según el modo descrito en la sección 2.3.10.

3.4. Resultados

3.4.1. Determinación de la toxicidad del Nonilfenol sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4) por 168h.

3.4.1.1. Efectos Letales.

Los efectos letales del Nonilfenol sobre *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua por 168 h fue evaluada mediante el protocolo ANFITOX. Se expusieron varias camadas de individuos a la sustancia. La letalidad de los embriones por exposición al nonilfenol desde el inicio de su desarrollo se informó mediante un perfil de toxicidad (curvas TOP) graficado a partir de las CL10, 50 y 90 a diferentes tiempos de exposición.

La toxicidad del nonilfenol sobre los embriones mostró ser tiempo dependiente, observándose un aumento significativo de la misma a lo largo del tiempo de exposición. Si bien el valor NOEC a las 24 y 48 h se mantuvo en 1,5 mg nonilfenol/L, la CL50-72h fue 1,5 (1,36 – 0,28) mg nonilfenol/L, descendiendo significativamente a 1,06 (1,02 – 1,11) mg nonilfenol/L a las 96h y a 0,96 (0,93 – 0,99) mg nonilfenol/L a las 120h. Luego la toxicidad se mantuvo constante hasta finalizar la exposición. (Figura 3.3).

No hubo diferencias en la susceptibilidad entre las diferentes camadas, así el coeficiente de variación en la susceptibilidad de las mismas no superó el 9% (Tabla 3.1.).

Tabla3.1.: Concentraciones letales 50 a diferentes tiempos, con sus intervalos de confianza para diferentes camadas de embriones de *Rhinella arenarum* tratados en forma continua con nonilfenol a partir del inicio de su desarrollo, blástula (E.4).

CL50-72h	IC(-)	IC(+)	CL50-96h	IC(-)	IC(+)	CL50-120h	IC(-)	IC(+)	CL50-144h	IC(-)	IC(+)	CL50-168h	IC(-)	IC(+)
1,50	0,14	0,28	1,06	0,04	0,05	0,96	0,03	0,04	0,96	0,03	0,04	0,96	0,03	0,04
1,42	0,07	0,09	1,25	0,04	0,06	0,93	0,02	0,02	0,89	0,03	0,02	0,89	0,03	0,02
1,55	0,23	0,21	1,24	0,16	0,15	0,88	0,08	0,07	0,85	0,08	0,06	0,85	0,08	0,06
-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,90	0,06	0,07	0,87	0,05	0,05	0,86	0,04	0,05

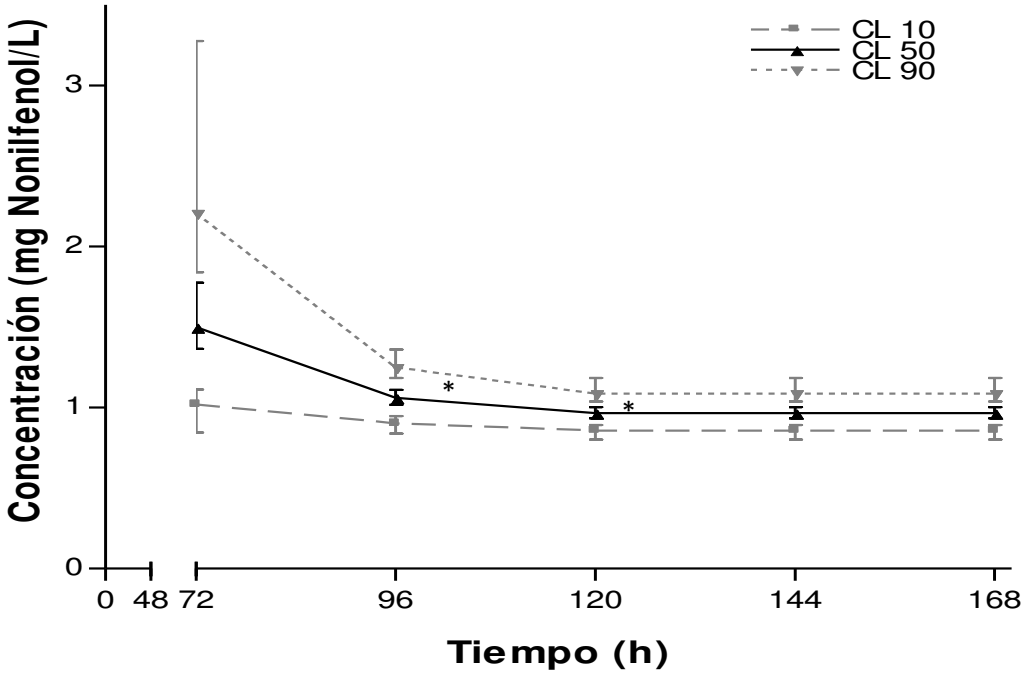


Figura 3.3.: Curvas TOP de isotoxicidad. Representación de las CL 10, 50 y 90, y sus intervalos de confianza, del Nonilfenol para *R. arenarum* expuestos a partir del inicio del desarrollo embrionario (E.4) hasta 168h de exposición. * Diferencia significativa de la CL50 respecto de la correspondiente para el día anterior ($p \leq 0,05$).

3.4.1.2. Efectos subletales.

Los embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a nonilfenol a partir del estadio de blástula temprana (E.4) fueron fijados al finalizar el desarrollo embrionario (168h), observándose diferentes malformaciones en proporciones concentración-dependiente. Las principales anomalías durante las primeras horas de exposición consistieron en disociación celular, dificultad para completar la gastrulación, tapón vitelino persistente. Una vez avanzado el desarrollo, se observó principalmente un retraso en el mismo, reducción general del cuerpo y cola, microcefalia, subdesarrollo de branquias, incurvaciones en el eje, y distintos tipos de edema, incluyendo edemas en la cavidad del corazón y en las branquias, así como anomalías en la formación de las estructuras bucales y ausencia de

espiralamiento del tubo digestivo. El Nonilfenol causó extrusión del extremo caudal del eje de la aleta (Figura 3.4.).

A las 24 h de exposición se obtuvo un valor LOEC de 1,5 mg nonilfenol/L, mientras que hacia las 96 h dicho valor disminuyó a 0,75 mg nonilfenol/L. Luego continuó disminuyendo y hacia las 168 h el valor LOEC fue de 0,05 mg nonilfenol/L. La Concentración Efectiva (CE) 50 para malformaciones a las 96 h fue 0,97 (0,90-1,19) mg nonilfenol/L. Así, el índice teratogénico (IT) para las 96 h de exposición, estimado a partir de la relación entre la CL50 y la CE50, resultó en 1,08.

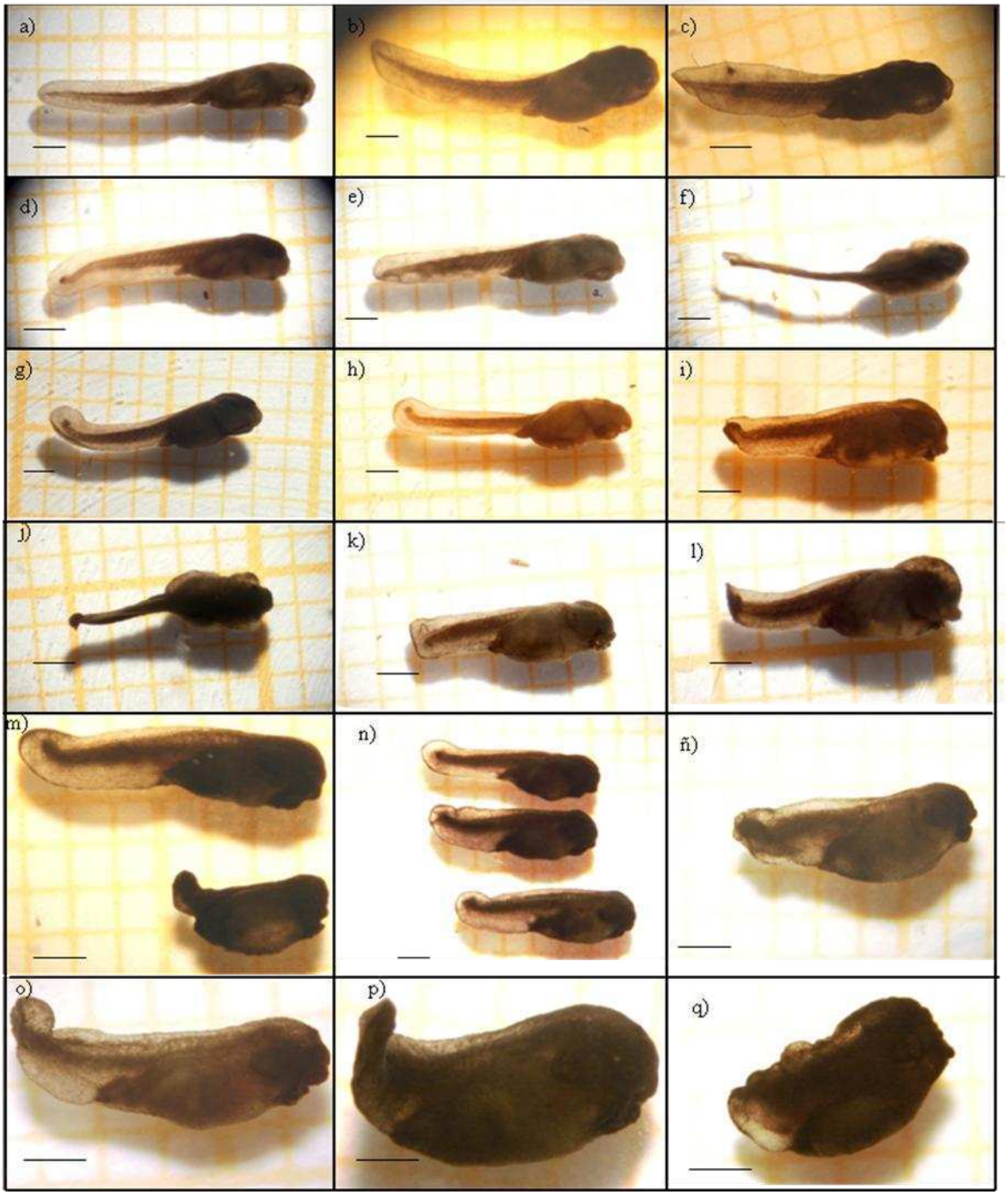


Figura 3.4.: Embriones de *R. arenarum* tratados con nonilfenol a partir de blástula y fijados a las 168h (finalización del desarrollo embrionario de los controles). a) Control; b) y c) 0,05 mg nonilfenol/L; d) a f) 0,25mg nonilfenol/L; g) y h) 0,5 mg nonilfenol/L; i) a m) 0,75 mg nonilfenol/L; n) y ñ) 0,85 mg nonilfenol/L y o) a q) 1 mg nonilfenol/L. Obsérvese las incurvaciones en el eje y el retraso en el desarrollo. Nótese la reducción general de la talla y de la cola y el ondulamiento de la misma. Las malformaciones también incluyen edemas, ampollas y subdesarrollo de branquias y característicamente la extrusión del extremo caudal del eje de la aleta. Escala: 1mm.

3.4.2. Determinación de la toxicidad del Nonilfenol en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a partir del estadio de Opérculo completo (E.25) por 168h.

3.4.2.1. Efectos Letales.

Los efectos letales del Nonilfenol sobre larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a Nonilfenol en forma continua por 168 h fueron evaluados mediante el protocolo ANFITOX. Se expusieron varias camadas de individuos. La letalidad de las larvas por exposición al nonilfenol desde el comienzo del desarrollo larval se informó mediante un perfil de toxicidad (curvas TOP) graficado a partir de las CL10, 50 y 90 en función del tiempo de exposición.

La toxicidad del nonilfenol para las larvas expuestas a partir del estadio de opérculo completo (E.25) por 168 h, no resultó dependiente del tiempo de exposición, entre las 72 h y 168 h. A diferencia del patrón de toxicidad observado en los embriones expuestos desde la segmentación, no se observaron diferencias significativas entre las CL50 a medida que se extendió la exposición (Figura 3.5.). De esta manera, la CL50 se mantuvo constante en 0,37 (0,35 – 0,39) mg nonilfenol/L. Sin embargo, el valor NOEC a las 24 h y 48 h aproximado fue de 0,45- 0,4 mg nonilfenol/L.

No se encontraron diferencias en la susceptibilidad entre las diferentes camadas; así el coeficiente de variación en la susceptibilidad de las mismas alcanzó valores máximos entre 14 y 17,4 entre las 72 h y 120 h donde hubo mayor variabilidad, con valores comprendidos entre 3,9 y 8 para los restantes tiempos de exposición (Tabla 3.2.).

Tabla 3.2.: Concentraciones letales 50 con sus intervalos de confianza a diferentes tiempos, para diferentes camadas de larvas de *Rhinella arenarum* tratadas en forma continua con nonilfenol desde el comienzo del desarrollo larval, Estadio de Opérculo completo (E.25).

CL50-72h	IC(-)	IC(+)	CL50-96h	IC(-)	IC(+)	CL50-120h	IC(-)	IC(+)	CL50-144h	IC(-)	IC(+)	CL50-168h	IC(-)	IC(+)
0,38	0,37	0,39	0,38	0,37	0,39	------	------	------	------	------	------	0,35	0,34	0,36
0,371	0,356	0,386	0,371	0,352	0,387	0,371	0,352	0,387	0,371	0,352	0,387	0,371	0,352	0,387
0,494	0,475	0,513	0,475	0,456	0,493	0,475	0,456	0,493	0,406	0,383	0,431	0,377	0,353	0,402

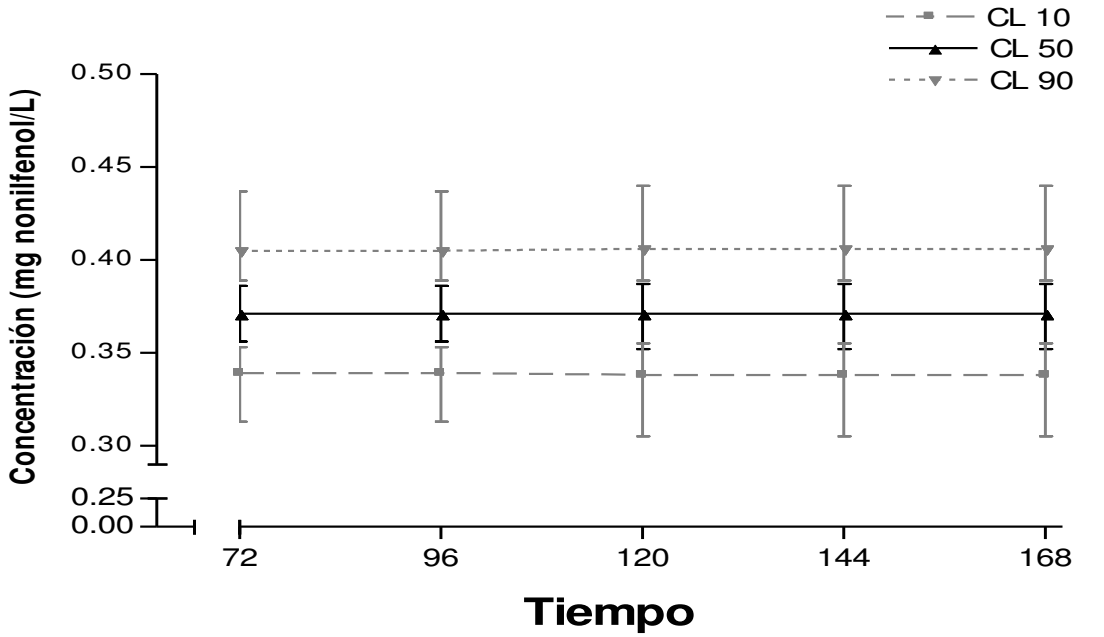


Figura 3.5.: Curvas TOP de isotoxicidad. Representación de las CL 10, 50 y 90, y sus intervalos de confianza, del Nonilfenol sobre *R. arenarum* desde el comienzo del desarrollo larval (E.25) a lo largo de 168h de exposición. * Diferencia significativa de la CL50 respecto de la correspondiente para el día anterior ($p \leq 0,05$).

3.4.2.2. Efectos subletales

Las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a Nonilfenol desde el comienzo de su desarrollo mostraron, a tiempos de exposición cortos, importantes incurvaciones en el eje de la cola, tanto en su grado de inclinación como de incidencia, también se observaron bordes irregulares de las aletas, ampollas e hidropesía (Figura 3.6.). Así, para concentraciones NOEC de letalidad a las 24 h, se observaron ya desde las 5 h de exposición dichas malformaciones. De esta manera, la incidencia de incurvaciones fue de 30%, 73%,

83% y 100% para concentraciones de 0,24 mg nonilfenol/L, 0,3 mg nonilfenol/L, 0,35 mg nonilfenol/L y 0,4 mg nonilfenol/L, respectivamente.

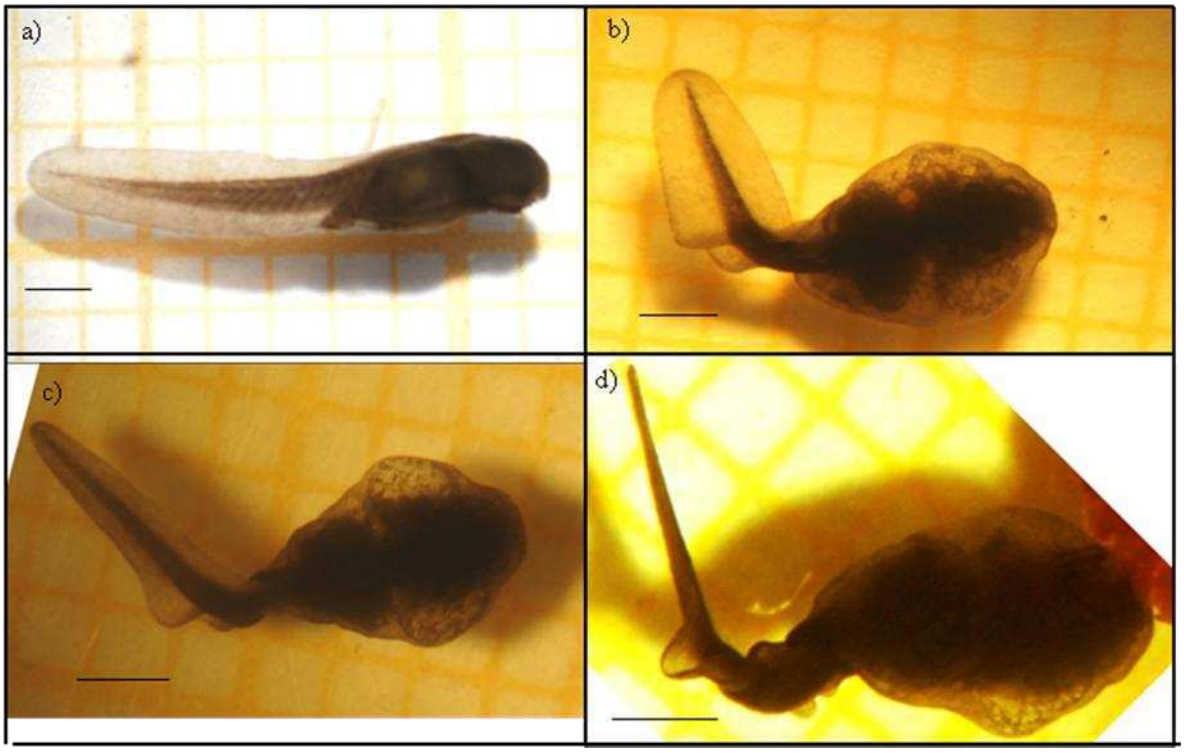


Figura 3.6.: Larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a nonilfenol a partir del inicio del desarrollo larval. a) Control, b) 0,45 mg nonilfenol/L a las 5 h de exposición, c) y d) 0,45 mg nonilfenol/L a las 24 h de tratamiento. Obsérvese la incurvatura lateral de la aleta, el borde irregular y la presencia de ampollas e hidropesía. Escala: 1mm.

3.4.3. Comparación de la sensibilidad de los embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a dos alquilfenoles en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4) por 336h.

Los efectos letales sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos tanto a nonilfenol, como octilfenol en forma continua por 336 h fueron evaluados mediante el protocolo ANFITOX. Se expusieron varias camadas de individuos. La letalidad de los embriones desde el inicio del desarrollo embrionario se informó mediante un perfil

comparativo de toxicidad graficado a partir de las CL 50 de cada alquilfenol en función del tiempo de exposición.

La toxicidad del nonilfenol sobre los embriones de *R. arenarum* durante las primeras 168 h de tratamiento mostró el mismo comportamiento que el informado para el bioensayo continuo desde el mismo estadio por 168 h. Sin embargo, la toxicidad del nonilfenol aumentó significativamente al extenderse la exposición, así a las 336h la CL50 fue de 0,17 (0,12 – 0,24) mg nonilfenol/L, representando un aumento de casi diez veces en comparación con la toxicidad informada a las 72 h (Figura 3.7.).

Con respecto al octilfenol, la toxicidad mostró ser tiempo dependiente, aumentando significativamente desde las primeras 24 h a 48 h del tratamiento, siendo las CL50 de 16,58 (13,83 – 18,23) mg octilfenol/L y 9,37 (8,58 – 9,85) mg octilfenol/L, respectivamente. De esta manera, la toxicidad del alquilfenol siguió aumentando hacia la exposición aguda, crónica corta y crónica hasta alcanzar un aumento de casi 30 veces a las 336h con una CL50 de 0,58 (0,33 – 0,83) mg octilfenol/L (Figura 3.7.).

Comparativamente, para los embriones de *R. arenarum* expuestos desde el inicio de su desarrollo (E.4) por 336h, el nonilfenol resultó ser más tóxico que el octilfenol. De esta manera, las CL50´s a las 72 h fueron para el nonilfenol y octilfenol de 1,5 (1,36 – 1,78) mg nonilfenol/L y 6,63 (5,37 – 7,89) mg octilfenol/L, respectivamente. Luego, disminuyeron en ambos casos a las 96 h a valores de 1,02 (0,96 – 1,07) mg nonilfenol/L y 4,04 (2,06 – 5,47) mg octilfenol/L, respectivamente, hasta alcanzar los valores ya mencionados de CL 50 a las 336 h de 0,17 mg nonilfenol/L y 0,58 mg octilfenol/L. Así, la toxicidad del nonilfenol resultó entre dos y cuatro veces mayor a lo largo de todo el tiempo de exposición (Figura 3.7.).

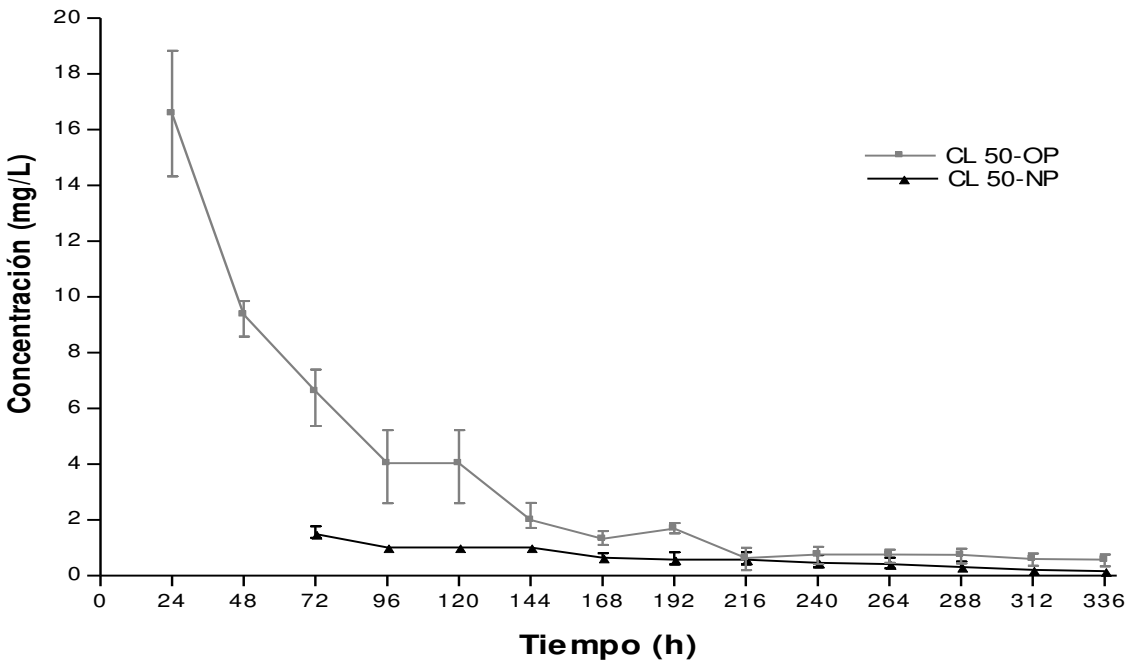


Figura 3.7.: Representación de las CL 50 del Nonilfenol (NP) y Octilfenol (OP) para *R. arenarum* expuestas desde el inicio del desarrollo embrionario (E.4) a lo largo de 336 h de exposición.

Los efectos subletales del octilfenol en cuanto a la teratogenicidad consistieron principalmente en disociación celular, dificultad para completar la gastrulación, tapón vitelino persistente, durante las primeras horas de exposición. Una vez avanzado el desarrollo, se observó principalmente retraso en el desarrollo, reducción general del cuerpo y cola, microcefalia, subdesarrollo de branquias, incurvaciones en el eje, y distintos tipos de edema, incluyendo edemas en la cavidad del corazón y en las branquias, así como anomalías en la formación de las estructuras bucales y ausencia de espiralamiento del tubo digestivo. Característicamente, igual que en el caso del nonilfenol, se observó extrusión del extremo caudal del eje de la aleta. A las 168 h de exposición el valor LOEC para malformaciones fue de 0,5 mg octilfenol/L, considerando que fue la más baja concentración ensayada.

3.4.4. Comparación de la sensibilidad de larvas de *Rhinella arenarum* expuestos a dos alquilfenoles en forma continua a partir del estadio Opérculo Completo (E.25) hasta completar la metamorfosis.

Con el fin de evaluar la susceptibilidad diferencial de las larvas de *Rhinella arenarum* a nonilfenol y octilfenol en forma continua, se expusieron varias camadas de individuos en forma crónica siguiendo el protocolo ANFITOX hasta completar la metamorfosis. La letalidad sobre las larvas desde el inicio de su desarrollo se informó mediante un perfil comparativo de toxicidad graficado a partir de las CL 50 de cada alquilfenol en función del tiempo de exposición por 1152 h (48 días), momento en que empezaron a metamorfosear los controles.

Las camadas de larvas *R. arenarum* expuestas a nonilfenol, resultaron más sensibles al tóxico que las expuesta al tratmiento continuo por 168h. La toxicidad del nonilfenol aumentó significativamente al extenderse la exposición, así a los 48 días la CL50 fue de 0,11 (0,08 – 0,14) mg nonilfenol/L, representando un aumento de casi tres veces en comparación con la toxicidad informada a las 24 h. Se observaron cambios diarios significativos en la letalidad solamente entre las 24h y 48h, y entre las 72 h y 144 h (Figura 3.8.).

Con respecto al octilfenol, la toxicidad mostró ser tiempo dependiente, aumentando significativamente al prolongarse la exposición, así la CL50 a las 24 h y 1152 hs (48 días) fueron 0,38 (0,15 - 0,53) mg octilfenol/L y 0,07 (0,04 – 0,1) mg octilfenol/L, respectivamente; aumentando así, casi 6 veces. Se observó un aumento significativo diario en la letalidad recién entre las 168 h y 192 h (Figura 3.8.). Para ambas sustancias, concentraciones superiores a 0,75 mg/L causaron letalidad del 100% de los individuos antes de las 24 h de exposición.

Las larvas expuestas desde el comienzo del desarrollo larval (E.25) mostraron una significativa mayor susceptibilidad que los embriones expuestos desde el inicio del desarrollo (E.4), de hasta 43 veces las primeras 24 h.

Contrariamente a lo observado para la exposición desde el desarrollo embrionario (E.4), para el caso de la exposición de las larvas no se encontraron diferencias significativas entre la toxicidad de ambas sustancias.

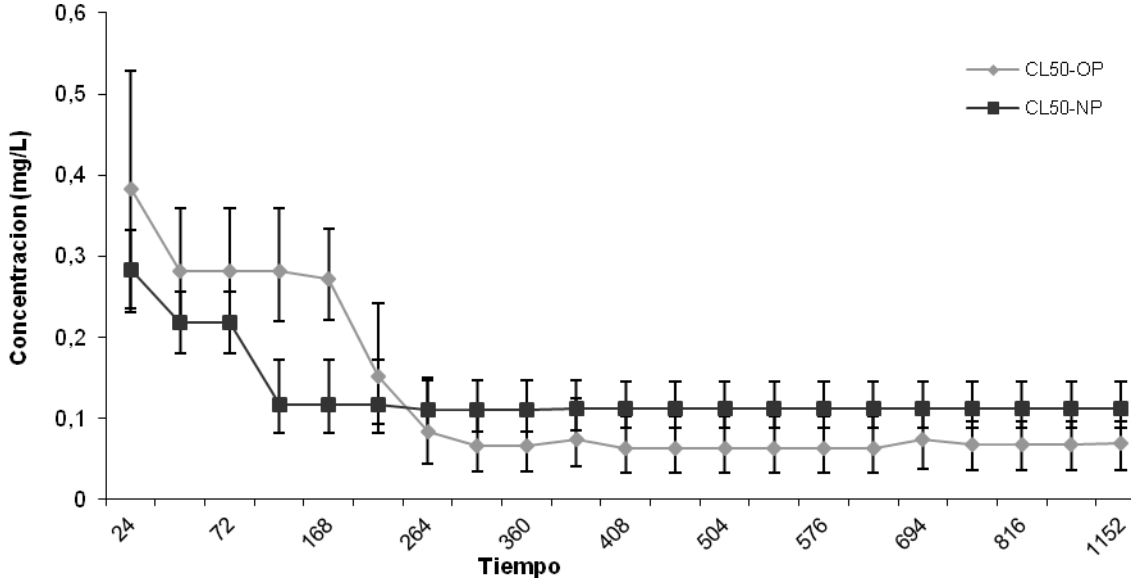


Figura 3.8.: Representación de las CL 50, y sus intervalos de confianza, del Nonilfenol (NP) y Octilfenol (OP) sobre *R. arenarum* desde el final del desarrollo embrionario o comienzo del larval (E.25) a lo largo de 1152 h (48 días) de exposición.

Con respecto a la metamorfosis, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos por exposición a los dos alquilfenoles, ni con los controles, con respecto, tanto al peso de los individuos al alcanzar la metamorfosis, como al tiempo necesario para alcanzarla (Figuras 3.9 y 3.10.).

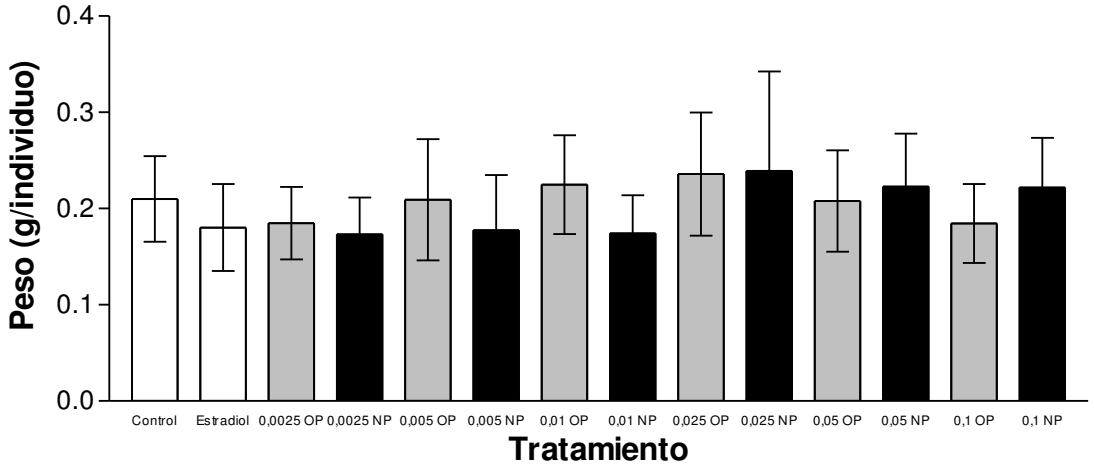


Figura 3.9.: Peso alcanzado en el momento de la metamorfosis de las larvas *de Rhinella arenarum* expuestas desde el inicio del desarrollo larval (E.25) a octilfenol (OP;□) y nonilfenol (NP;■).

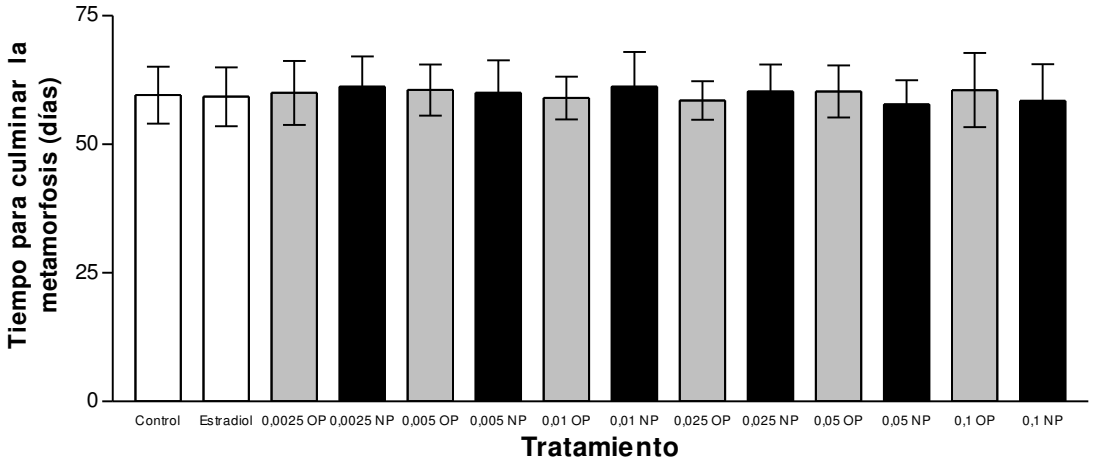


Figura 3.10.: Tiempo transcurrido hasta alcanzar la metamorfosis de las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas desde el inicio del desarrollo larval (E.25) a octilfenol (OP; □) y nonilfenol (NP;■).

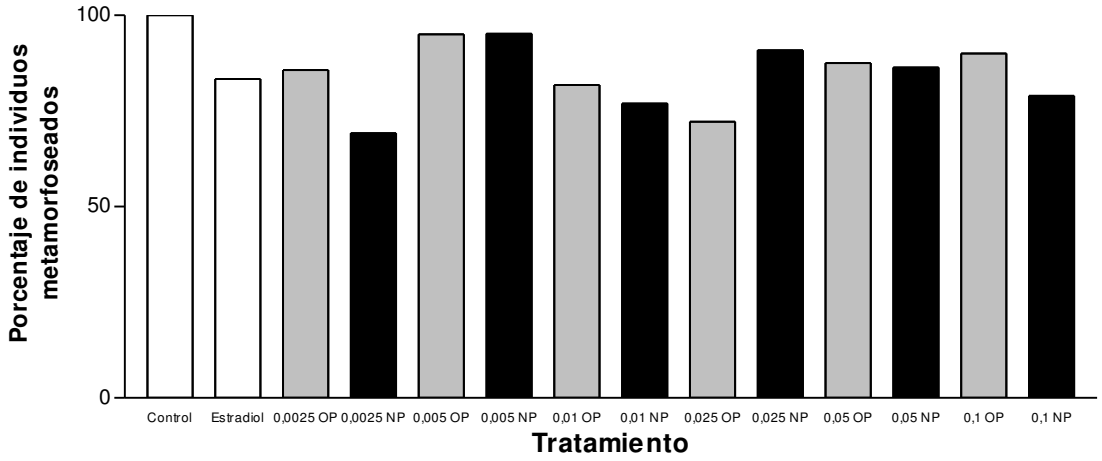


Figura 3.11.: Porcentaje de individuos metamorfoseados en función de los sobrevivientes al día 48 de las larvas *de Rhinella arenarum* expuestas desde el inicio del desarrollo larval (E.25) a octilfenol (OP,▒) y nonilfenol (NP,■).

3.5. Discusión

El nonilfenol presentó una alta toxicidad tanto para embriones, como larvas de *Rhinella arenarum*, causando efectos letales y subletales.

En cuanto a los efectos letales, la susceptibilidad de los individuos expuestos desde el inicio del desarrollo embrionario (E.4) mostró ser dependiente del tiempo de exposición, disminuyendo significativamente más de 1,5 veces hasta las 120 h, donde la CL50 fue de 0,96 (0,93 – 0,99) mg nonilfenol/L . Por otro lado, este aumento en la toxicidad podría estar indicando una susceptibilidad estadio-dependiente, dado que los individuos atravesaron durante la exposición, el desarrollo embrionario incluido el periodo organogénico, los cuales han sido informados como los periodos más sensibles a diversas noxas, tanto en el caso de los metales (Pérez-Coll y Herkovits 1990; Sztrum *et al.* 2011), como para algunos compuestos orgánicos (Aronzon *et al.* 2011a). Sin embargo, para el caso del nonilfenol, la etapa larval resultó significativamente más sensible que el desarrollo embrionario temprano, encontrándose una diferencia en las concentraciones letales de hasta 5,5 veces, coincidentemente a lo informado para la exposición de *Rhinella arenarum* a Bisfenol A, otro compuesto orgánico utilizado en la industria de plásticos y aditivos plásticos (Hutler Wolkowicz *et al.* 2011), que al igual que el nonilfenol causa disrupción endocrina.

La toxicidad del nonilfenol por exposición continua desde el estadio de opérculo completo o inicio del desarrollo larval (E.25) en adelante no mostró cambios significativos a lo largo de la exposición (168 h), demostrando que el nonilfenol alcanza su máxima toxicidad en las primeras 72 h de exposición, con una CL50 de 0,37 (0,22 - 0,39) mg nonilfenol/L. Este patrón de efecto tóxico máximo sobre las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas desde el E.25, es similar al ya informado para metales como el cadmio (Pérez-Coll y Herkovits 1996) y para compuestos orgánicos como el 2,4-D (Aronzon *et al.* 2011a).

Cuando la exposición al nonilfenol desde el inicio del desarrollo embrionario (E.4) se extendió a 336 h, se observó un aumento de la susceptibilidad de más de 10 veces, hasta alcanzar una CL50-336h de 0,17 (0,12 – 0,24) mg nonilfenol/L, lo que podría deberse a que

al aumentar el tiempo de exposición quedó comprendido el desarrollo larval, el cual resultó más susceptible. El mismo patrón de respuesta se observó para la exposición a octilfenol, en la que hubo un aumento en la susceptibilidad de los individuos de casi 30 veces, con una CL50-24h de 16,58 (13,83 – 18,23) mg octilfenol/L y una CL50-336h de 0,58 (0,33 – 0,83) mg octilfenol/L. Comparativamente, para los embriones de *R. arenarum* expuestos desde el inicio de su desarrollo (E.4) por 336h, el nonilfenol resultó ser más tóxico que el octilfenol.

En el caso de la exposición extendida del nonilfenol hasta las 1152 h (48 días), de las larvas desde el inicio del desarrollo larval (E.25), se observó un aumento significativo en la susceptibilidad al prolongarse la exposición, así a los 48 días la CL50 fue de tan solo 0,11 (0,08 – 0,14) mg nonilfenol/L, representando un aumento de casi tres veces en comparación con la toxicidad informada a las 24 h.

Con respecto al octilfenol, la toxicidad también mostró ser tiempo dependiente, aumentando significativamente al prolongarse la exposición, hasta casi 6 veces, con un valor CL50-48 días de 0,07 (0,04 – 0,1) mg octilfenol/L. Por otro lado, se informó la CL50-96h en 0,28 (0,22 – 0,4) mg octilfenol/L, valor que coincide con lo informado también para *R. arenarum* en el estadio 26 (Piazza 2006). En el mismo trabajo se informó la CL50-96h de 0,38 (0,38 – 0,4) mg octilfenol/L para el estadio 28, lo que marcaría un aumento en la resistencia de los individuos. Esto confirmaría la mayor susceptibilidad de los individuos al comienzo del desarrollo larval.

Contrariamente a lo observado para la exposición desde el desarrollo embrionario (E.4), para el caso de las larvas no se encontraron diferencias significativas entre la toxicidad de ambas sustancias. Si bien estas diferencias, podrían deberse a los mecanismos tóxicos de acción de cada sustancia en particular, este hecho podría estar relacionado con la mayor solubilidad del octilfenol en agua y la mayor lipofilicidad del nonilfenol (Ying *et al.* 2002), así al comienzo del desarrollo estas características del nonilfenol permitirían una acumulación del mismo en los tejidos grasos, que luego serían movilizados al ser los tejidos utilizados para el desarrollo de los individuos.

Con respecto a la metamorfosis no se encontraron diferencias significativas ni en el peso de los individuos ni el tiempo requerido para alcanzar la metamorfosis con respecto a

los controles para ninguno de los tratamientos tanto del nonilfenol como del octilfenol, coincidentemente con lo informado también para la exposición a octilfenol de larvas de *R. arenarum* al comienzo de la prometamorfosis (Piazza 2006).

Este trabajo destaca la importancia de realizar bioensayos de toxicidad en diferentes etapas del ciclo de vida de una especie e identificar el período más sensible a fin de recomendar umbrales de tolerancia conservativos para su preservación.

El nonilfenol causó también efectos subletales, así el índice teratogénico (IT=CL50/CE50) para las 96 h en la exposición desde el desarrollo embrionario temprano, fue 1,08; valores similares en el IT aunque no en la CL50 fueron encontrados para otras especies de anfibio, como *Xenopus laevis*, *Crinia insignifera* y *Litoria adelaidensis* (Mann y Bidwell 2000). Si bien el valor informado de IT es menor de 1,5 y se considera que el riesgo de sufrir efectos teratogénicos a este tiempo no es considerablemente mayor al letal (ASTM 1993a); se observaron anomalías desde las primeras horas de exposición, que consistieron en disociación celular, dificultad para completar la gastrulación y la persistencia de tapones vitelinos en individuos expuestos desde el inicio del desarrollo embrionario. Una vez avanzado el desarrollo, se observó principalmente un retraso en el mismo, reducción general del cuerpo y cola, microcefalia, subdesarrollo de branquias, incurvaciones en el eje, y distintos tipos de edema, incluyendo edemas en la cavidad del corazón y en las branquias, así como anomalías en la formación de las estructuras bucales y ausencia de espiralamiento del tubo digestivo. Estas anomalías pueden ser consideradas como efectos inespecíficos de este agente tóxico, dado que las mismas fueron informadas tanto por exposición a metales (Aronzon *et al.* 2011b; Pérez-Coll y Herkovits 1990; Sztrum 2010), como a otros compuestos orgánicos sobre *Rhinella arenarum* (Aronzon *et al.* 2011a; Hutler Wolkowicz *et al.* 2011; Pérez-Coll y Herkovits 2004; Svartz *et al.* 2012). Sin embargo, como característica notoria se observó la extrusión del extremo caudal del eje de la aleta (Figura 3.4. y 3.6.). Algunos autores plantean como posible causa de estas alteraciones, incluyendo las incurvaciones, una inhibición en la síntesis de colágeno, lo que originaría un defecto en el desarrollo de los primordios vertebrales tempranos (Birge *et al.* 1983). Sin embargo, se observaron anomalías en el eje del cuerpo en larvas expuestas desde el final del desarrollo embrionario a tiempos de exposición cortos (5 h y 24 h). Algunos

autores han propuesto la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa como una de las posibles responsables de las curvaturas observadas por exposición a insecticidas organofosforados que causarian una desorganización de los miotomos (Bonfanti *et al.* 2004), y si bien estudios en peces confirmaron la inhibición de la actividad enzimática por el nonilfenol (Li 2008), este efecto podría relacionarse con cualquier mecanismo que causara un excesivo flujo de Ca^{2+}, causando una sobre estimulación del aparato contráctil del miocito. Hasta una necrosis muscular (Leonard y Salpeter 1979). Más aún, se ha informado el efecto tóxico del nonilfenol en células reproductoras masculinas que mostraron un desbalance por el ingreso excesivo de calcio causado por la alteración de la membrana celular (Gong *et al.* 2008).

Así, el corto tiempo en el que el nonilfenol ejerce efectos teratogénicos, resalta la importancia de la teratogénesis como un parámetro final de evaluación de riesgo.

Hasta el momento no se había informado sobre la toxicidad del nonilfenol en una especie de anfibio autóctona como es el caso de *Rhinella arenarum.* Comparativamente con la mayoría de los anfibios, *R. arenarum* resultó mucho más sensible, más de diez veces en comparación con *Xenopus laevis,* y unas 55 veces y casi 80 veces más sensible que *Crinia insignifera* y *Litoria adelaidensis*, respectivamente (Mann y Bidwell 2000). No se podría descartar que la utilización de diferentes protocolos sea responsable de la diferencia en la susceptibilidad entre estas especies y *R. arenarum*. Además, se ha informado que las diferencias entre FETAX y ANFITOX en las condiciones de salinidad y temperatura en el medio de mantenimiento, podrían modificar los resultados de la toxicidad (Herkovits y Pérez-Coll 2003). Sin embargo, diferencias tan grandes podrían deberse a la susceptibilidad propia de cada especie. Esto resalta la importancia de evaluar la toxicidad de las noxas en especies autóctonas, como es el caso de *R. arenarum*, que brinde un panorama representativo de las implicancias sobre los ecosistemas y las especies de Argentina, con el fin de tomar decisiones, establecer umbrales, y elaborar planes de manejo más acordes con la situación de la región.

Para analizar el riesgo ecológico (HQ) de esta sustancia en *Rhinella arenarum*, se lo pudo estimar numéricamente utilizando la aproximación planteada por USEPA (1998), adoptando el peor escenario posible basándose en el “principio precautorio”, así se realiza

el cociente entre una medida puntual de la toxicidad, que podría ser la CL50, y un valor ambiental. Dado que no se conoce información sobre concentraciones de exposición de nonilfenol en Argentina, y no se puede establecer un valor estimado en el ambiente, podría utilizarse la mayor concentración informada del tóxico en el medio, que fue de 1,6 mg/L en muestras tomadas de diversos cuerpos de agua entre 1999-2000 en Estados Unidos (Shackelford *et al.* 1983) . Como medida de toxicidad puntual para el caso del nonilfenol se podría utilizar la CL50 más baja que fue la del estadio de opérculo completo (E.25) desde las 384 h hasta los 48 días de exposición (0,112 mg nonilfenol/L); de esta forma el valor de HQ es 14,28. Como medida de referencia, el valor HQ se lo compara con el "valor de preocupación" (LOC, del inglés: *level of concern*) propuesto por USEPA. El LOC es una herramienta de política ambiental que se utiliza para interpretar el cociente de riesgo y analizar el riesgo potencial para los organismos *no blanco*, así como la necesidad de tomar medidas reglamentarias. El valor LOC para considerar la existencia de un potencial riesgo es 1. Si el HQ supera el valor 1, es posible que la sustancia en cuestión sea responsable de producir efectos adversos. Esto pone de manifiesto la gravedad de la situación ambiental que representan las concentraciones del nonilfenol en el ambiente, más aún, concentraciones mayores a la evaluada pueden encontrarse localmente en las zonas de descargas de plantas de tratamiento ya que la eficiencia en la remoción del nonilfenol es muy variable y generalmente deficitaria (Soares *et al.* 2008). Considerando la información obtenida, esta situación representaría un riesgo no solo para el desarrollo normal y comportamiento de este anfibio, cuyas alteraciones pueden aumentar la vulnerabilidad de los individuos a otros factores, sino que también afectaría directamente la sobrevida de *R. arenarum*, contribuyendo a la declinación de las poblaciones de anfibios.

Capítulo 4: Diazinón

4.1. Objetivos e hipótesis.

4.1.1. Objetivos.

Evaluar la toxicidad letal y subletal del Diazinón, utilizando bioensayos de toxicidad con embriones y larvas de *Rhinella arenarum* (ANFITOX), realizando las curvas de isotoxicidad o curvas TOP, en ensayos agudos (de hasta 96 h) y crónico-cortos (168 h).

En forma adicional, se propuso analizar la toxicidad estadio-dependiente al Diazinón en diferentes estadios del desarrollo embrio-larval de *Rhinella arenarum* por pulsos de 24 h.

En forma complementaria se propuso evaluar la incorporación del Diazinón, por exposiciones agudas y crónicas, en embriones y larvas de *Rhinella arenarum.*

4.1.2. Hipótesis.

El Diazinón causa importantes efectos letales y subletales en embriones y larvas de *Rhinella arenarum* a tiempos de exposición agudos y crónicos cortos.

La toxicidad del Diazinón en los estadios embrio-larvales de *Rhinella arenarum* puede analizarse a partir de curvas de isotoxicidad.

La susceptibilidad al Diazinón de los embriones y larvas de *Rhinella arenarum* varía a lo largo del desarrollo embrionario y larval y los diferentes estadios embrionarios tienen una sensibilidad diferente al insecticida.

La incorporación al Diazinón depende del tiempo y la concentración de exposición, así como de la etapa del desarrollo de *R. arenarum* en que son expuestos.

4.2. Introducción

A principios del siglo XIX, se descubrió accidentalmente la acción pesticida de algunos elementos naturales como el azufre, cobre, arsénico, piretrinas (sustancias obtenidas de los pétalos del crisantemo - *Chriysanthemum cinerariefolium*-) y fósforo; y también se inicio el uso de los derivados del petróleo. En 1922, se comenzaron a utilizar diferentes aceites insecticidas y poco más tarde, los primeros productos sintéticos. Müller, en 1940, descubrió las propiedades insecticidas del dicloro-difenil-tricloroetano, mejor conocido como DDT. A partir de esa fecha se inició la industria de los plaguicidas organosintéticos. El uso intensivo de estos compuestos comenzó a producir enormes problemas de contaminación ambiental y daños a la salud, tal es el caso del DDT, el más conocido entre los organoclorados y que fuera usado extensivamente para el control de plagas hasta su prohibición en 1979. Sus metabolitos se encuentran aún como contaminantes del suelo y agua, así como en tejidos animales y humanos. Los insecticidas organoclorados tuvieron una gran aceptación debido a su elevada efectividad en el control de una gran variedad de plagas, pero como consecuencia de la altísima toxicidad de estos compuestos en animales silvestres, baja degradabilidad y persistencia en el ambiente, su uso fue prohibido en los años ´70 por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA). En su reemplazo, surgieron los plaguicidas denominados de "nueva generación" como los carbamatos (estructura química basada en un alcaloide de la planta *Physostigma venenosum*) y los compuestos organofosforados que se comenzaron a sintetizar en 1948. Los nuevos compuestos fueron reemplazando gradualmente a la mayoría de los plaguicidas clorados. En el presente los carbamatos y organofosforados suelen ser los ingredientes activos de la mayoría de los insecticidas y de algunos herbicidas (González 2004; Wheeler 2002).

Los modelos de producción y cultivo se basan en la obtención de beneficios económicos por medio de la expansión de la barrera agropecuaria y de la intensificación de la producción mediante el uso de agroquímicos, el mejoramiento genético y la mecanización de las prácticas. Así el uso de plaguicidas se masificó y multiplicó, lo que

está estrechamente vinculado con los cambios introducidos en los modelos de producción y cultivo, que duplicaron la productividad de la agricultura. Los plaguicidas por sí solos son responsables de al menos el 30% de ese aumento de producción. Los países en vías de desarrollo también los han ido empleando cada vez más y, en la actualidad, consumen la cuarta parte de este tipo de productos. Se calcula que por cada unidad monetaria invertida en plaguicidas el agricultor ahorra pérdidas por valor de unas 3 a 5 unidades (González 2004).

El Diazinón, *O,O*-dieril *O*-2-isopropil-6-metilpirimidil-4-il fosforotioato (Figura 4.1.), es un insecticida organofosforado no sistémico de amplio rango y larga persistencia (IPCS 1998b). Sus propiedades químicas fueron descriptas primero por Gaseer (1953) y fue introducido al mercado por la compañía química suiza J.R. Geigy S.A. bajo los nombres comerciales Basudin, Diazitol, Neocidol y Nucidol. Ha sido sintetizado por manipulación química de agentes neurotóxicos desarrollados originalmente como armas químicas. Es altamente efectivo contra formas adultas y juveniles de insectos, pero también de otros invertebrados como ácaros y nematodos. Ha sido aplicado desde los inicios de los 50´s, en cultivos de maíz, frutas, cítricos, bananas, viñedos, caña de azúcar, tabaco, papas, café, cacao, té, cultivos hortícolas, algodón y arroz. También es ampliamente utilizado en veterinaria para el control de ectoparásitos de animales de campo y domiciliario como pulgones, escarabajos y cochinillas.

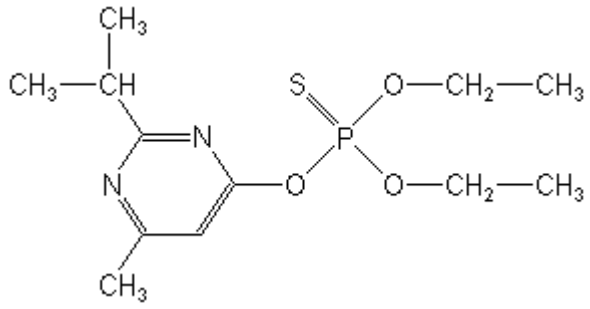


Figura 4.1. Estructura química del Diazinón.

Se ha demostrado que después de las aplicaciones de Diazinón en cultivos y plantas, el plaguicida desaparece del suelo rápidamente a través de la volatilización y es fácilmente escurrido de la superficie pudiendo alcanzar aguas superficiales, en las que es uno de los plaguicidas más comúnmente detectado (Hamm y Hinton 2000). También puede alcanzar las aguas subterráneas (Albanis *et al.* 1998) y de esta manera afectar la biota silvestre (Figura 4.2.). El Diazinón tiene una vida media que va desde las 70 h hasta las 12 semanas, dependiendo del pH, la temperatura, la iluminación y la presencia de microorganismos (Scheunert *et al.* 1993). Se ha demostrado su alta persistencia, siendo uno de los organofosforados más estables en agua, con un bajo porcentaje de degradación a los 30 días (Kanazawa 1975). La mayor fuente de residuos está en los cultivos por su uso como insecticida, mientras que los residuos en las carnes y productos derivados de animales proviene de su uso veterinario (IPCS 1998b; Tomlin 2003).

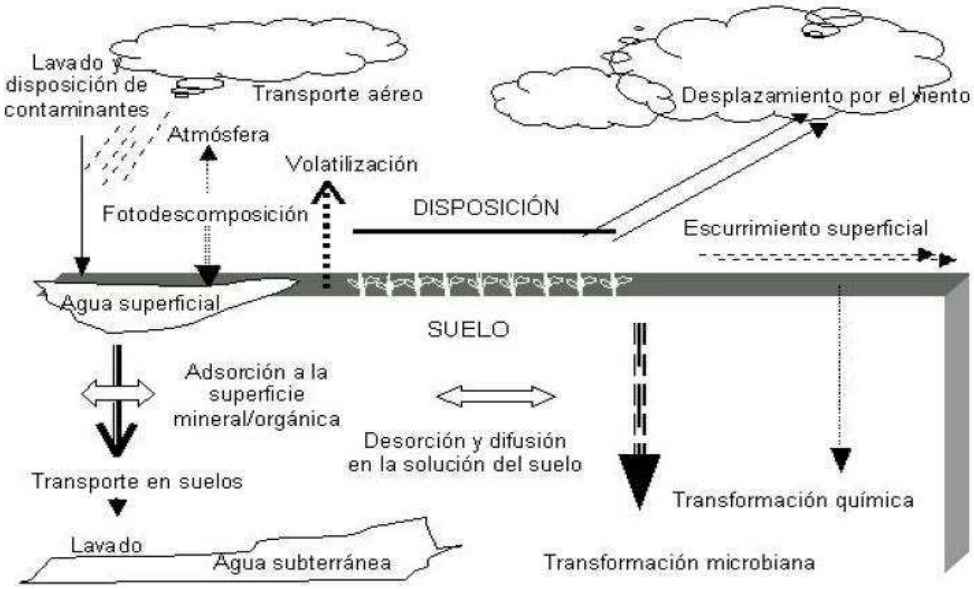


Figura 4.2.: Diferentes mecanismos de transporte de los plaguicidas en el ambiente. Extraído de "Riesgos químicos por el uso de plaguicidas en el ambiente"(González 2004).

Una vez que ingresan al ambiente acuático, las sustancias químicas persistentes pueden acumularse en los organismos a través de diferentes mecanismos, ya sea por bioconcentración, definida como la incorporación directa desde el agua por las branquias y

la piel; por ingestión, la cual se da por la incorporación de partículas suspendidas, o por biomagnificación, que resulta del consumo de alimentos contaminados (van der Oost *et al.* 2003). Inclusive, cuando no es posible detectar efectos agudos o crónicos, la bioacumulación debe ser considerada como un criterio de riesgo en sí mismo, ya que algunos de los efectos pueden ser reconocidos en una fase posterior de la vida de los individuos expuestos, o incluso en individuos en los eslabones más altos de la red trófica. La bioacumulación de las sustancias químicas en la biota puede ser el indicio temprano para efectos adversos a nivel de ecosistemas (Franke *et al.* 1994). Así, los niveles de los contaminantes en los organismos vivos están determinados principalmente por la cinética de absorción y eliminación, que son característicos de cada sustancia y de cada organismo.

Los factores de bioconcentración, entendidos como la relación entre la concentración de la sustancia en el organismo y la concentración del compuesto en el agua, fueron obtenidos en caracoles y peces luego de un periodo de siete días de exposición a Diazinón. Así entre los primeros, el índice varió entre 6 y 17 para las diferentes especies, mientras que en el caso de los peces el índice fue desde 18 a 152 para *Poecilia reticulata* y *Pseudorasbora parva*, respectivamente. También se evaluó la incorporación del pesticida en *Oryzias latipes* durante 72 h. La que a las 24h alcanzó un *plateau*, y un factor de bioconcentración de 28 (Tsuda *et al.* 1995). Además, dicho autor evaluó la toxicidad aguda y la incorporación tanto del Diazinón, como de su oxon dando una CL50-48h de 4,4 mg/L y 0,22 mg/L y factores de bioconcentración de 49 y 0,5, respectivamente.(Tsuda *et al.* 1997)

El Diazinón tiene como blanco principal el sistema nervioso, mediante la inhibición de la actividad Acetilcolinesterasa (AChE), enzima que metaboliza la acetilcolina (ACh). La ACh es el principal neurotransmisor endógeno de los sistemas neuronales, especialmente en las sinapsis neuromusculares, en el sistema nervioso autónomo y en el cerebro. Durante la trasmisión colinérgica de los impulsos nerviosos, la ACh se une a uno de los dos tipos generales de receptores: los receptores nicotínicos, que son canales iónicos químicamente cerrados, o a los receptores muscarínicos, que están acoplados a través de proteínas G a sistemas de segundos mensajeros dentro de las células. En las sinapsis neuromusculares, la ACh se une a los receptores nicotínicos, lo que resulta en la excitación

y la contracción muscular. Los receptores colinérgicos muscarínicos (MCHR) dominan en el sistema nervioso autónomo y en el cerebro en los que la unión MCHR-ACh puede causar excitación o inhibición. La Acetilcolinesterasa (AChE), vinculada a las membranas postsinápticas, degrada ACh en colina y ácido acético para poner fin a la transmisión neuronal colinérgica (Beauvais *et al.* 2000) (Ecuación 4.1.). El Diazinón tiene como blanco principal la inhibición de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE), mediante la fosforilación del grupo hidroxilo de la serina en el dominio de unión al sustrato (Fulton y Key 2001). La reacción es análoga a la del sustrato, excepto que el derivado fosforilado es mucho más resistente a hidrólisis subsecuentes que el derivado acetilado común, lo que hace que la inhibición sea esencialmente irreversible (Galloway y Handy 2003).

La AChE esta ampliamente distribuida en invertebrados y vertebrados. Como consecuencia de la acumulación del neurotrasmisor se produce una sobre estimulación de los receptores colinérgicos que resultan en un patrón general de neurotoxicidad, inhibiendo el centro respiratorio del cerebro y las uniones neuromusculares del aparato respiratorio (Coppage y Braidech 1976); causando también hiperactividad, pérdida de la coordinación, temblores, espasmos musculares, convulsiones, nado anormal, y finalmente la parálisis e incluso la muerte. Dado que existe una similitud fisiológica entre el sistema nervioso de vertebrados y el de insectos, existe la posibilidad de que el mismo mecanismo que afecta a los insectos también pueda afectar a los vertebrados (Chambers y Carr 1995)

$$(CH_3)_3N^+-CH_2CH_2-O-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-CH_3 \xrightarrow{\text{AChE}} (CH_3)_3N^+-CH_2CH_2OH + CH_3COOH$$

Acetilcolina (ACh) Colina Acido acético

Ecuación 4.1.: La Acetilcolinesterasa (AChE), vinculada a las membranas postsinápticas degrada ACh en cólina y ácido acético para poner fin a la transmisión neuronal colinérgica. Extraído de "Environmental Toxicology" (Ming-Ho 2005)

El Diazinón puede ingresar a los organismos mediante la piel, la alimentación y la inhalación luego de lo cual, atraviesa una reacción de biotransformación por la cual el azufre de su grupo P=S es sustituido por un oxígeno. Esto da como resultado la conversión a su análogo oxigenado, en el caso del Diazinón, su metabolito Diazoxón (O,O-diethil O-(2-isopropil-4-metil-6-pirimidinil) fosfato) (Figura 4.3.). El Diazinón se hidroliza rápidamente en condiciones ambientales ácidas y básicas y es inestable en presencia de radiaciones UV. Se ha observado que la conversión metabólica del Diazinón puede ocurrir en aves, peces y mamíferos. Se sabe que la metabolización de los organofosforados es mediada por la enzima citocromo P450 dependiente del sistema monooxigenasa. La citocromo P450 pertenece a la familia de las proteínas hemo y cataliza la oxidación de una amplia variedad de sustancias químicas. Tiene una gran importancia ya que está implicado en la activación o desactivación de muchos xenobióticos. En este caso, la reacción de desulfuración resulta en un aumento dramático de la toxicidad aguda del plaguicida. Así, mientras que el plaguicida organofosforado al que el organismo inicialmente fue expuesto tiene por sí mismo poca capacidad para inhibir la AChE, su forma desulfurada, el Oxón, exhibe una potencia de inhibición que puede ser de dos a tres órdenes mayores de magnitud (Flaskos 2012). Así, cuando se evaluó la toxicidad por exposición a Diazinón y su correspondiente oxón en *Rana boylii*, las CL50-96h resultaron en 7,49 mg/L y 0,76 mg/L, respectivamente (Sparling y Fellers 2007). Al evaluarse la toxicidad del plaguicida en estadios tempranos del pez *Oryzias latipes* se observó una inhibición de la AChE, la cual fue significativamente mayor cuando se expusieron los organismos al diazoxón. Para evitar la activación del pesticida a través del citocromo P450, se utilizaron inhibidores de la enzima en la exposición al Diazinón, resultando en una disminución de la inhibición de la AChE, aunque no se registraron diferencias en la incorporación del Diazinón. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la inhibición de la AChE al utilizar los inhibidores de P450 cuando se expusieron los individuos al diazoxón (Hamm *et al.* 2001).

Otros productos de la degradación del plaguicida incluyen el hidroxiDiazinón y el 2-isopropil-6-metil-4-hidroxipirimidinol (IMP), un producto persistente pero menos tóxico (Bavcon *et al.* 2003; Colovíc *et al.* 2010; Karpouzas y Singh 2006).

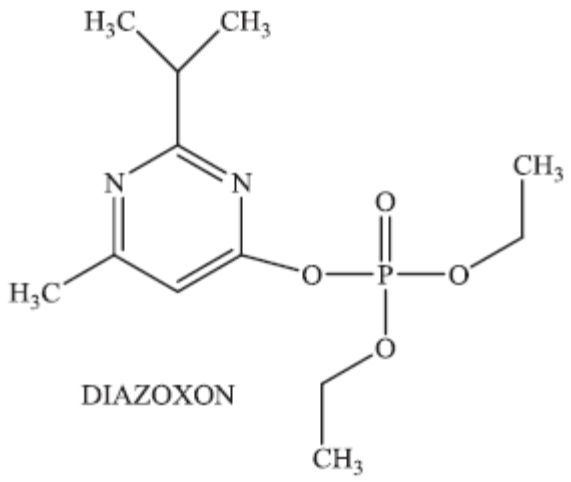


Figura 4.3.: Estructura química del Diazoxón.

Existen algunos indicios de que el Diazinón podría inducir disrupción endócrina en mamíferos. Se ha observado la disminución reproductiva, que incluyó menor tasa de hembras con embriones, así como la disminución en la tasa de nacimientos en roedores expuestos al plaguicida (Sheffield 1996). Se ha demostrado que el Diazinón también causa disrupción endocrina en el pez de agua dulce *Lepomis macrochirus*, induciendo cambios histopatológicos en los folículos ováricos, afectando los niveles de estradiol, lo que puede causar una disrupción en el eje hipotálamo-pituitario-gonadal, alterando el sistema y la capacidad reproductiva (Maxwell y Dutta 2005).

En cuanto al efecto tóxico agudo del Diazinón informado en peces adultos, se observó que es muy variable oscilando varios órdenes de magnitud según la especie utilizada en los ensayos (Alam y Maughan 1993; Ferrando *et al.* 1991; Sakr y Gabr 1992). Experimentalmente se observó que, los estadios tempranos de los ciclos de vida de los peces resultan ser siempre los más sensibles (Weis y Weis 1989). Sin embargo en el caso de *Oryzias latipes* se encontró un descenso significativo tanto en la CL50 como en el índice de inhibición de la AChE, indicando una mayor sensibilidad al Diazinón a medida que avanzaba el desarrollo (Hamm *et al.* 2001).

Tabla 4.1.: Datos publicados de toxicidad al Diazinón durante el desarrollo embrio-larval de diferentes anfibios.

Especie	Estadio	Compuesto	Concentración/ Tiempo	Valor	Referencia
Rana boylii	Larva	Diazinón	CL50-96h	7,49 mg/L	(Sparling y Fellers 2007)
Rana clamitans	Blástula	Diazinón	CL50-16d	0,005 mg/L	(Harris *et al.* 1998)
Rana clamitans	Blástula	Diazinón formulado	CL50-16d	0,0028 mg/L	(Harris *et al.* 1998)
Xenopus laevis			CL50-96h	9,84 mg/L	(Modra *et al.* 2011)
Pseudacris regilla	Embrión	Diazinón	CL20-8d	>0,175mg/L	(De Jong Westman *et al.* 2010)
Bufo melanostictus	Embrión		CL50-30d	6 mg/L	(Sumanadasa *et al.* 2008)
Bufo melanostictus	Larva		CL50-30d	7,5 mg/L	(Sumanadasa *et al.* 2008)

La Tabla 4.1. muestra los datos de toxicidad de Diazinón para algunos anfibios. Así, la CL50 aguda para *Rana boylii* es de 7,49 mg/L (Sparling y Fellers 2007), mientras que para *Xenopus laevis* dicho parámetro es de 9,84 mg/L (Modra *et al.* 2011). La exposición crónica al pesticida en *Bufo melanosyictus* resultó tener valores similares , tanto para exposiciones a partir del desarrollo embrionario como del larval (Sumanadasa *et al.* 2008). Sin embargo *Rana clamitans* resultó mucho más sensible, con valores del orden de

0,005mg/L, mostrando que el formulado comercial resultó ser aún más tóxico que el Diazinón solo (Harris *et al.* 1998).

Relyea (2004) también observó mortalidad en otras cuatro especies de anfibios expuestas a 2 mg/L de Diazinón, por lo que la CL50s de estas especies estarían por encima de este valor. Ha sido reportado que la exposición de ranas a plaguicidas organofosforados reduce su actividad, produce falta de coordinación en la natación, aumenta la vulnerabilidad a predadores, baja la tasa de crecimiento y aumenta la mortalidad (Bridges 1997). Como se puede observar la información sobre la toxicidad de este plaguicida en el grupo de anfibios es escasa, y no hay información sobre el efecto en *Rhinella arenarum*.

4.3. Materiales y Método

4.3.1. Obtención de material biológico

Los embriones y larvas de *Rhinella arenarum* (sapo común americano) se obtuvieron, se seleccionaron y mantuvieron según lo descripto en las secciones 2.3.1.1 y 2.3.1.2

4.3.2. Criterio de aceptación del material biológico.

El criterio de aceptación del material biológico fue el mismo, así la calidad y fecundidad de los huevos fue evaluada diariamente, considerándose aceptable una tasa de fertilidad mayor al 75 % y más de un 70% de sobrevida de embriones normales al alcanzarse el estadio de néurula (E.13) (Herkovits y Pérez-Coll 1999).

4.3.3. Protocolos experimentales

Entre los años 2007 y 2011 se realizaron los bioensayos con embriones y larvas provenientes de parejas independientes, habiendo repetido, como mínimo tres veces, cada uno de los protocolos experimentales que se describen a continuación. Algunos de los bioensayos de exposición al Diazinón, fueron repetidos hasta cinco veces, usando embriones y larvas de diferentes camadas.

4.3.3.1. Exposición continua.

Se aplicó el conjunto de bioensayos estandarizados ANFITOX (Herkovits y Pérez-Coll 1999) descriptos en la sección 2.3.3.1.

- ANFIEMB
- ANFIAGU.
- ANFICOR.

4.3.3.2. Exposición por 24 horas al Diazinón a partir de distintos estadios del desarrollo embrionario y larval.

A fin de evaluar la susceptibilidad diferencial en las distintas etapas del ciclo de vida de *Rhinella arenarum* se realizaron bioensayos de exposición por pulso de 24 h durante el periodo embrionario, organogénico y larval. A su vez, estos bioensayos simulan la exposición "por pulsos" que ocurre con cierta frecuencia en los cuerpos receptores, particularmente en situaciones de accidentes toxicológicos.

Para estos bioensayos se utilizaron embriones y larvas en estadio de Blástula (E.4), Gástrula (E.11), Surco Neural (E.14), Respuesta Muscular (E.18), Circulación Branquial (E.20), Boca Abierta (E.21) y Opérculo Completo (E.25), los cuales fueron expuestos a diferentes concentraciones de Diazinón por 24 h, luego de lo cual fueron exhaustivamente lavados con 200ml de SA y mantenidos en SA hasta las 168 h.

4.3.4. Condiciones generales de los tratamientos.

Las condiciones generales de los tratamientos se realizaron según lo descripto en la sección 2.3.4.

4.3.5. Evaluación de los efectos teratogénicos.

La evaluación de los efectos teratogénicos se realizaron según lo descripto en la sección 2.3.5

Al finalizar el ensayo AFIEMB, se evaluó la longitud alcanzada por los embriones expuestos desde el inicio del desarrollo embrionario a las 168 h en forma milimétrica con la utilización de un microscopio estereoscópico (ME) Zeiss Stemi DV4.

4.3.6. Efectos sobre el comportamiento.

La evaluación de los movimientos y de respuesta a los estímulos, se realizó primero con movimientos suaves de la cámara, seguido por la estimulación con una fuente de luz. En el caso que no se observaran respuestas de los individuos, se realizó una estimulación mecánica suave con una pinza, y finalmente se observó el latido cardíaco bajo microscopio estereoscópico (ME) Zeiss Stemi DV4.

4.3.7. Evaluación del riesgo ambiental.

El riesgo ecológico puede ser estimado numéricamente usando la aproximación del Cociente de Peligro (*Hazard Quotient*, HQ por sus siglas en inglés) (US EPA 1998), basada en la comparación de una concentración ambiental esperada (EEC) y un valor estándar de toxicidad.

Para el caso del Diazinón, la EEC fue calculada como un porcentaje de la dosis máxima de aplicación propuesto, 4,5 Kg/ ha del ingrediente activo (Syngenta Crop Protection Inc.). Este porcentaje depende de la exposición, ya sea a través de la dispersión, del lavado y la escorrentía, lo cual correspondería a un 10% o de la exposición por pulverización aérea lo que correspondería a un 100%. Como los embriones y las larvas de *Rhinella arenarum* suelen encontrarse en charcas temporales de baja profundidad, para el

cálculo de la EEC se asumió una profundidad de agua de 15 cm y un área de 1 m^2 (Boutin et al. 1993; Boutin et al. 1995)

Así, adoptando el peor escenario posible basándose en el "principio precautorio", una medida puntual de la toxicidad podría ser la CL10. De esta forma, el valor HQ se lo compara con el "valor de preocupación" (*level of concern*, LOC por sus siglas en inglés) propuesto por USEPA. El LOC es una herramienta de política ambiental que se utiliza para interpretar el cociente de riesgo y analizar el riesgo potencial para los organismos no blanco, así como también la necesidad de tomar medidas reglamentarias. El valor LOC para considerar la existencia de un potencial riesgo es 1. Si el HQ supera el valor 1, es posible que la sustancia en cuestión sea capaz de producir efectos adversos.

4.3.8. Incorporación del Diazinón.

4.3.8.1. Ensayos preliminares para la evaluación de la incorporación del Diazinón.

Con el fin de evaluar la incorporación del Diazinón se expusieron 60 larvas en estadio de Opérculo Completo (E.25) de *Rhinella arenarum* por triplicado a 240 ml de soluciones de 6 mg Diazinón/L y 7,5 mg Diazinón/L. A las 48 h, 72 h y 144 h se retiraron los individuos, se realizaron 2 lavados exhaustivos con 200ml de SA, luego de lo cual fueron secados, pesados, y almacenados a -20°C.

Simultáneamente se realizó un bioensayo de toxicidad ANFICOR, con la misma camada de larvas con el fin de evaluar su sensibilidad al plaguicida.

4.3.8.2. Ensayos definitivos para la evaluación de la incorporación del Diazinón.

4.3.8.2.1. Exposición continua desde el inicio del desarrollo embrionario.

Con el fin de evaluar la incorporación del Diazinón en las etapas tempranas del desarrollo embrionario, se expusieron 60 embriones en estadio de Blástula (E.4) de *Rhinella arenarum* por triplicado a 240 ml de soluciones de 1,5 mg Diazinón/L; 3 mg Diazinón/L y 4 mg Diazinón/L. A las 96 h, 240 h y 504 h se retiraron los individuos, se realizaron 2 lavados exhaustivos con 200ml de SA, luego de lo cual fueron secados, pesados, y almacenados a -20°C.

Simultáneamente se realizó un bioensayo de toxicidad ANFIEMB, con la misma camada de embriones a fin de evaluar la sensibilidad de la misma al plaguicida.

4.3.8.2.2 Exposición continua desde el final del desarrollo embrionario.

Con el fin de evaluar la incorporación del Diazinón se expusieron 60 larvas en estadio de Opérculo Completo (E.25) de *Rhinella arenarum* por triplicado a 240 ml de soluciones de 0,5 mg Diazinón/L; 1,5 mg Diazinón/L y 3 mg Diazinón/L. A las 96 h, 240 h y 504 h se retiraron los individuos, se realizaron 2 lavados exhaustivos con 200ml de SA, luego de lo cual fueron secados, pesados, y almacenados a -20°C.

Paralelamente se realizó un bioensayo de toxicidad ANFICOR, con la misma camada de larvas con el fin de evaluar la sensibilidad de la misma al plaguicida.

4.3.8.3 Protocolo para la determinación de la incorporación del Diazinón.

Con el fin de analizar el contenido de Diazinón las muestras biológicas s fueron homogenizadas por uso de un homogenizador tipo politron, estos homogenatos fueron secados con sulfato de sodio anhidro (y calcinado a 550 °C previamente) y extraídos por soxhlet con una mezcla de Hexano/acetona según los lineamientos USEPA (1994) (M 8141a). Estos extractos fueron llevados a sequedad en rotavapor y corriente de nitrógeno, resuspendidos en hexano y sometidos a un clean up de fluorisil, recolectando la fracción de

12% de éter etílico en hexano (US EPA 1994) (M 3620C). Las muestras luego fueron llevadas a sequedad en rotavapor y corriente de nitrógeno, resuspendidas en hexano e inyectadas en un Cromatógrafo gaseoso equipado con un NPD seteado a 250°C, usando una columna HP-5 de 30m×0.32mm, H2 como carrier a 0.8 ml/min, inyección Split en relación 1:50 a 220 ºC y horno con rampa desde 160ºC hasta los 250ºC a 10 °C/min. La identidad del analito investigado se confirmó por espectrometría de masas de cuadrupolo simple operando en modo SIM, monitoreando los iones m/z=304, 179, 137, previamente caracterizados en el instrumento por barrido SCAN de estándares entre 70 y 550 umas. El cociente de las áreas de iones específicos en los estándares y las muestras fue usado como criterio de identidad. La recuperación fue del 97,8%.

4.3.9. Preparación de las soluciones.

Las soluciones de Diazinón fueron preparadas inmediatamente antes de su uso, a partir de una solución madre de 3 g/L, la cual fue realizada tomando el volumen necesario de Diazinón (pureza 99,9%, número de cas: 333-41-5, Lot LB75417, Supelco Analytical) diluyéndolo en acetona.

Las soluciones de uso, en un rango de 1,5 a 45 mg Diazinón /L, fueron preparadas diluyendo la solución madre en SA. Asimismo se mantuvieron controles de acetona, que consistieron en triplicados de 10 embriones o larvas expuestos a la máxima concentración de acetona utilizada en el bioensayo.

Las soluciones se analizaron en un cromatógrafo líquido Agilent con arreglo de diodos modelo 1100, separación con columna Gemini C18 15cm×4,6 mmID a 30ºC, fase móvil mezcla isocrática de ACN:Buffer fosfato pH=3 (70:30), usando en DAD a 245 nm. La identidad de los picos se confirmó por barrido espectral entre 200 y 400 nm.

4.3.10. Análisis de datos

Los perfiles de toxicidad se analizaron según el modo descrito en la sección 2.3.10.

Se calcularon los factores de bioconcentración (FBC), definidos como la relación entre la concentración de Diazinón en los embriones o larvas (mg) y la concentración del Diazinón en el medio de exposición (mg/L).

Las diferencias en los valores de incorporación se analizaron según el método descripto en la sección 2.3.10.

4.4. Resultados

4.4.1 Determinación de la toxicidad del Diazinón sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4) por 168h.

4.4.1.1. Efectos letales.

Los efectos letales del Diazinón sobre los embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua por 168 h fueron evaluados mediante el protocolo ANFITOX. Se expusieron embriones provenientes de distintas ovulaciones al plaguicida. La letalidad de los embriones por exposición al Diazinón a partir del inicio de su desarrollo se informó mediante un perfil de toxicidad (curvas TOP) graficado a partir de las CL10, 50 y 90 en función del tiempo de exposición.

Para las primeras 48 h de exposición, el valor NOEC empírico para letalidad fue 30 mg Diazinón/L, mostrando un aumento significativo de la toxicidad entre el periodo agudo (96 h) y el crónico corto (168 h), con CL50-96h de 27,18 (26,13 - 28,36) mg Diazinón/L, y CL50-168h de 20,12 (19,1 - 20,9) mg/L, respectivamente (Figura 4.4.). No se encontraron diferencias en la susceptibilidad entre las diferentes camadas, así el coeficiente de variación en la susceptibilidad de las mismas no superó el 11,7% (Tabla 4.2).

Tabla 4.2.: Concentraciones letales 50 (en mg Diazinón/L) con sus intervalos de confianza (IC) a diferentes tiempos de exposición, para cuatro camadas de embriones de *Rhinella arenarum* tratadas en forma continua con el plaguicida a partir del inicio del desarrollo embrionario, blástula (E.4).

CL50-96h	IC(-)CL50	IC(+) CL50	CL50-144h	IC(-)CL50	IC(+) CL50	CL50-168h	IC(-)CL50	IC(+) CL50
-------	-------	-------	22,35	20,37	28,68	18,699	17,41	20,07
-------	-------	-------	21,43	20,22	22,81	22,66	20,74	28,28
23,56	22,54	24,49	18,43	17,41	19,08	18,09	17,33	18,58
24,22	22,82	26,05	21,11	14,02	31,79	22,38	21,24	23,58

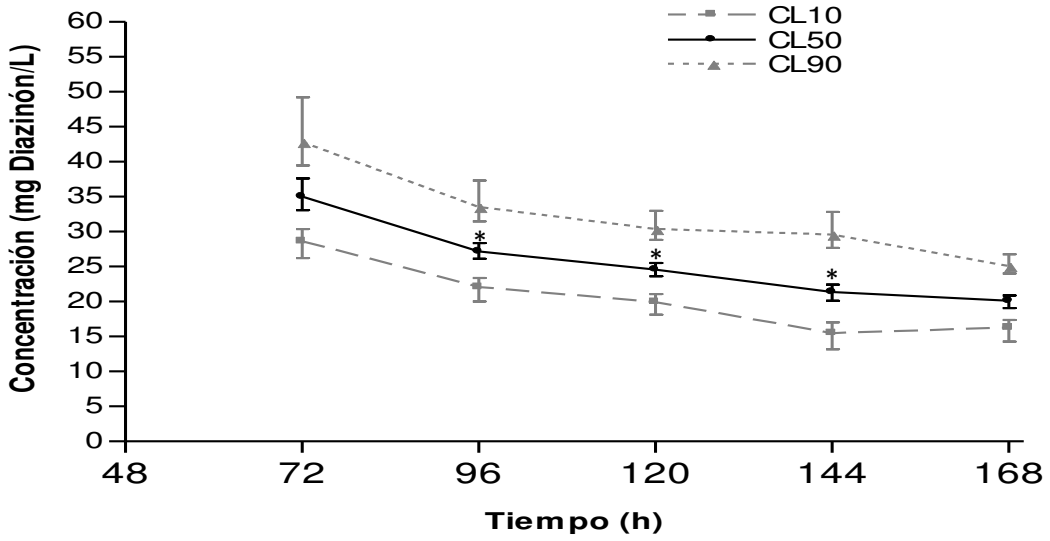


Figura 4.4.: Curvas TOP de isotoxicidad graficadas a partir de las CL 10, 50 y 90 y sus intervalos de confianza de Diazinón para *R. arenarum* expuestos desde el inicio del desarrollo embrionario (E.4) hasta el período crónico corto de exposición inclusive. * Diferencia significativa de la CL50 respecto de la correspondiente para el día anterior ($p \leq 0,05$).

4.4.1.2. Efectos subletales.

Los embriones expuestos a Diazinón desde el inicio del desarrollo embrionario mostraron efectos subletales, así el valor de CE50-96 h fue 17,83 mg Diazinón/L (16,64 – 19,12). Las principales malformaciones observadas fueron subdesarrollo general, disociación celular, subdesarrollo o agenesia de branquias y subdesarrollo e incurvación de la aleta. La CE50 mostró una reducción hacia las 120 h y 144 h, con valores de 19,12 mg Diazinón/L y 12,52 (10,19-15,39), respectivamente. A las 168 h de exposición, cuando los controles habían alcanzado el estadio de opérculo completo o finalización del desarrollo embrionario (E.25), los individuos expuestos a la menor concentración ensayada, 6 mg Diazinón/L, presentaban hidropesía general. Las principales malformaciones observadas fueron incurvaciones en el eje, retraso en el desarrollo, reducción general de la talla y de la cola y su ondulamiento. Las malformaciones se completaron con edemas generalizados, subdesarrollo de branquias, ausencia de elongación y espiralamiento del tubo digestivo y su ensanchamiento a nivel de la cloaca. (Figura 4.5.).

El análisis estadístico de la longitud de los embriones a las 168 h de exposición mostró que los individuos tratados con concentraciones a partir de 13,5 mg Diazinón/L, fueron significativamente más cortos que los controles (Figura 4.6.).

Los efectos subletales en relación al comportamiento fueron característicos y se registraron a partir de las 96 h, con un NOEC de 6 mg Diazinón/L. A partir de los 12 mg Diazinón/L se observó menor respuesta a los estímulos, y a 18 mg Diazinón/L los individuos presentaban espasmos. Finalmente, los embriones expuestos a 22,5 mg Diazinón/L carecieron de respuesta a los estímulos. A las 120h, los efectos se intensificaron y los individuos expuestos a 6 mg Diazinón/L y 12 mg Diazinón/L mostraron espasmos de corta amplitud, y a partir de 15 mg Diazinón/L no respondieron a los estímulos, sin embargo se confirmó su sobrevida ya que presentaban débil latido cardíaco.

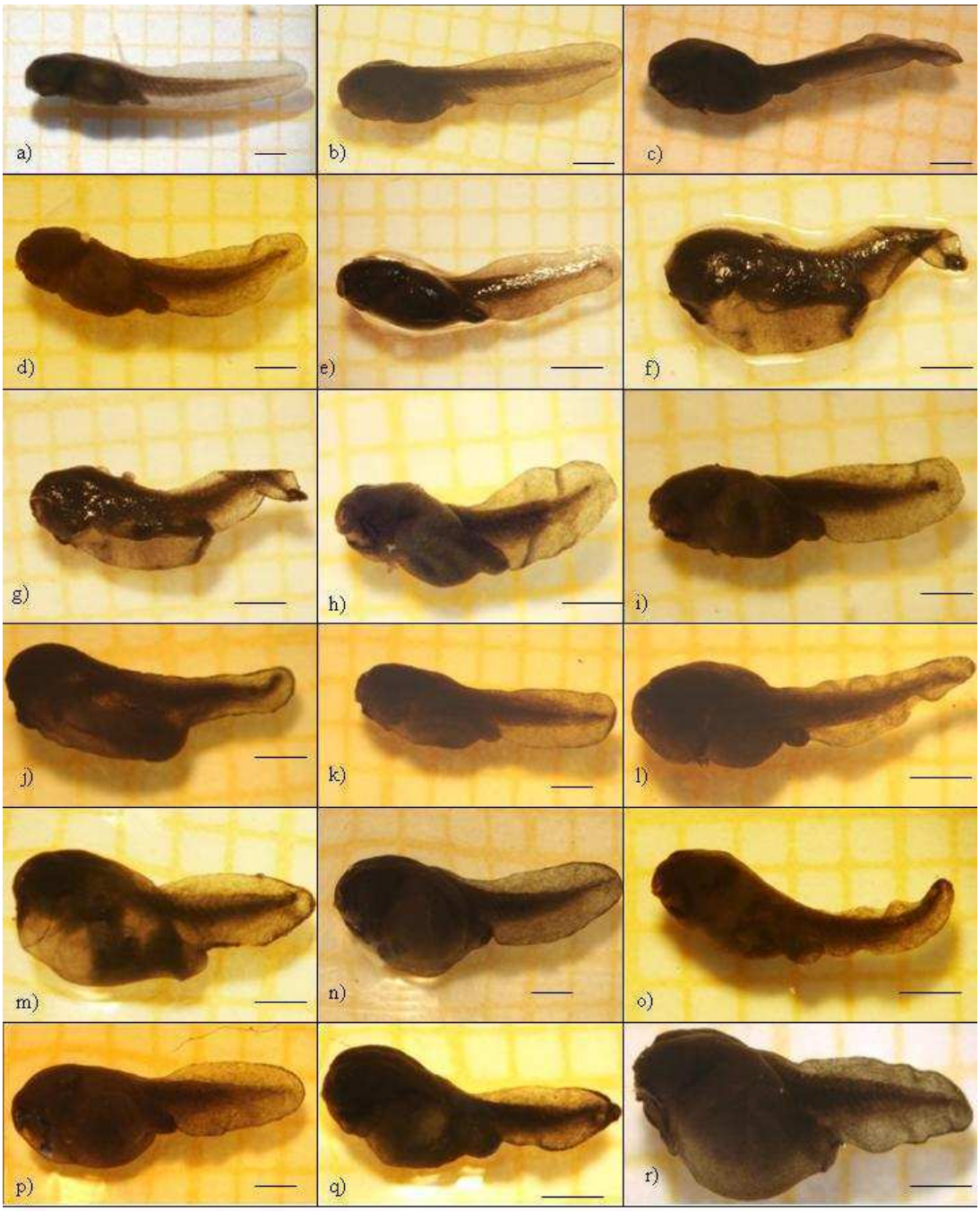


Figura 4.5. Embriones de *R. arenarum* tratados con Diazinón a partir de blástula y fijados a las 168h (finalización del desarrollo embrionario de los controles). a) Control. b) y c) 9 mg Diazinón/L, obsérvense las incurvaciones en el eje y el retraso en el desarrollo. d) a l) 13 mg Diazinón/L. Además de las malformaciones ya descriptas nótese la reducción general de la talla y de la cola y el ondulamiento de la misma. m) a r) 18 mg Diazinón/L .Las malformaciones se completan con edemas generalizados, subdesarrollo de branquias, ausencia de espiralamiento del tubo digestivo y su ensanchamiento a nivel de la cloaca. Escala: 1mm.

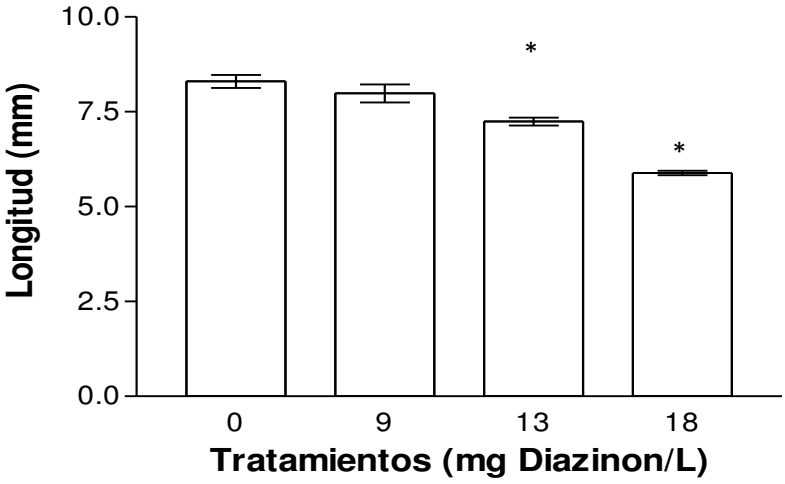


Figura 4.6.: Longitud de los embriones expuestos a partir del inicio de su desarrollo (E.4) por 168h a diferentes concentraciones de Diazinón. * Diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0,05$).

4.4.2. Exposición por pulsos de 24 horas al Diazinón a partir de distintos estadios del desarrollo embrionario y larval. Seguimiento por 168 h.

La susceptibilidad estadio-dependiente de los embriones de *R. arenarum* al Diazinón puede analizarse mediante los valores NOEC como se observa en la figura 4.7. Así, los embriones expuestos por 24 h a Diazinón desde los estadios de blástula (E.4) y gástrula (E.11) no presentaron efectos aún a la concentración máxima ensayada por lo que se sugiere un valor NOEC - 24 h de 22,5 mg Diazinón/L. A su vez, solo el tratamiento desde blástula mostró efectos sobre la sobrevida a lo largo del tiempo con un valor NOEC de 18 mg Diazinón/L a las 168h. Los embriones expuestos a 12 mg Diazinón/L, en estos dos estadios, mostraron alteraciones en el comportamiento como hiperquinesia. Los estadios de Surco Neural (E.14), Respuesta Muscular (E.18), Circulación Branquial (E.20) y Boca Abierta (E.21) no presentaron efectos aún a la concentración máxima ensayada por lo que se sugiere un valor NOEC a las 24h de 27 mg Diazinón/L. Para los embriones expuestos en Placa Neural (E.13) a partir de los 12 mg Diazinón/L se observó un retraso leve en el desarrollo y un aumento en la mortalidad con un valor NOEC empírico a las 168 h que descendió a 22,5 mg Diazinón/L. Tanto en los embriones expuestos en Respuesta

Muscular (E.18), Circulación Branquial (E.20) y Boca abierta (E.21) se registraron alteraciones en el comportamiento. Los individuos expuestos a 12 mg Diazinón/L mostraron movimientos espasmódicos, mientras que los expuestos a 18 mg Diazinón/L no tuvieron respuesta a los estímulos, con movimientos espasmódicos más cortos, mientras que los expuestos a 22,5 mg Diazinón /L no mostraron ningún tipo de respuesta a los estímulos. A su vez, tanto los embriones expuestos en Circulación Branquial (E.20), como en Boca Abierta (E.21) presentaron efectos aún a la mínima concentración ensayada por lo que se sugiere un valor NOEC empírico a las 168 h que descendió a 12 mg Diazinón/L. El tratamiento de las larvas (E.25) resultó el más sensible con un valor NOEC- 24 h de 18 mg Diazinón/L. (Figura 4.7.).

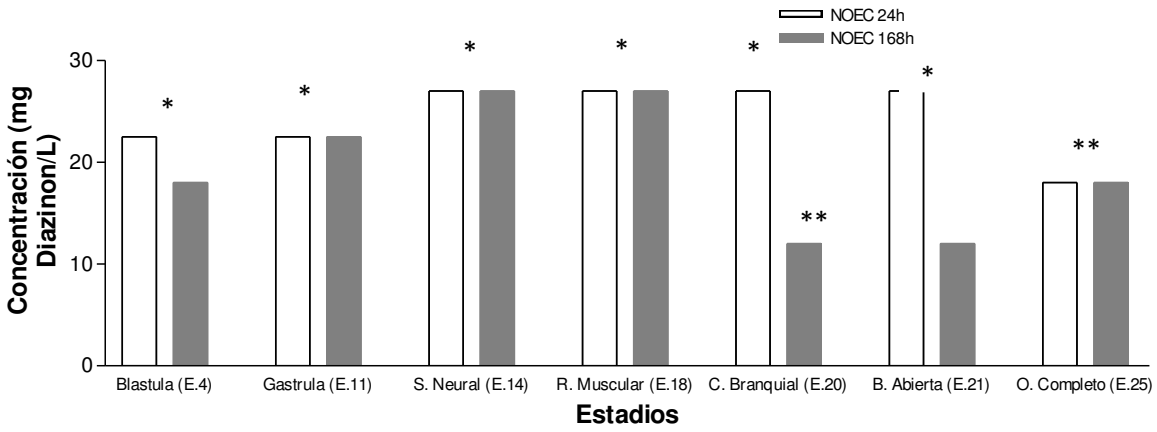


Figura 4.7.: Concentraciones empíricas que no producen un efecto letal observable (NOEC) de Diazinón en distintos estadios embrionarios y larval de *R. arenarum*, evaluados a las 24h y 168 h post-exposición. * Máxima concentración de exposición a la cual no hubo efecto letal significativo respecto de los controles. ** Mínima concentración de exposición que produjo efecto letal significativo respecto a los controles.

4.4.3. Determinación de la toxicidad del Diazinón sobre larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) por 168h.

4.4.3.1. Efectos Letales

La toxicidad del Diazinón sobre *Rhinella arenarum* desde el inicio del desarrollo larval (E.25) se evaluó a partir de los efectos obtenidos por exposición de larvas provenientes de distintas ovulaciones. El coeficiente de variación de la susceptibilidad entre camadas nunca superó el 10,5% (Tabla 4.3).

El perfil de toxicidad del Diazinón para las larvas mostró una mayor susceptibilidad, desde 3 a 4,4 veces, principalmente durante las primeras horas de exposición en comparación con los embriones expuestos desde el inicio del desarrollo embrionario. Así, para las larvas expuestas a partir del estadio de opérculo completo se ve un aumento significativo de la mortalidad desde las 24 h hasta las 168 h de exposición, con una CL50 que descendió casi a la mitad, de 11,24 (10,848 - 11,730) mg /L a 6,69 (6,198 - 7,076) mg Diazinón /L, (Figura 4.8.). Cabe destacar que para el bioensayo a partir de E.25, los valores empíricos NOEC a las 24 y 168 h fueron 9 y menores a 6 mg Diazinón/L respectivamente.

Tabla 4.3.: Concentraciones letales 50 (en mg Diazinón/L) con sus intervalos de confianza (IC) a diferentes tiempos de exposición, para cuatro camadas de larvas de *Rhinella arenarum* tratadas en forma continua con el plaguicida a partir del inicio del desarrollo larval, Opérculo Completo (E.25).

CL50-48h	IC(-)CL50	IC(+)CL50	CL50-96h	IC(-)CL50	IC(+)CL50	CL50-168h	IC(-)CL50	IC(+)CL50
14,16	13,57	14,7	-----	-----	-----	9,82	9,23	10,42
14,09	13,01	16,27	9,616	9,35	9,9	9,51	9,26	9,80
11,39	10,87	11,54	10,11	9,74	10,43	9,51	9,26	9,80
11,04	10,77	11,33	10,62	10,12	11,13	-----	-----	-----
13,32	12,60	14,37	11,70	11,07	12,26	8,34	7,54	6,86
12,42	11,64	13,25	9,44	8,65	9,96	-----	-----	-----

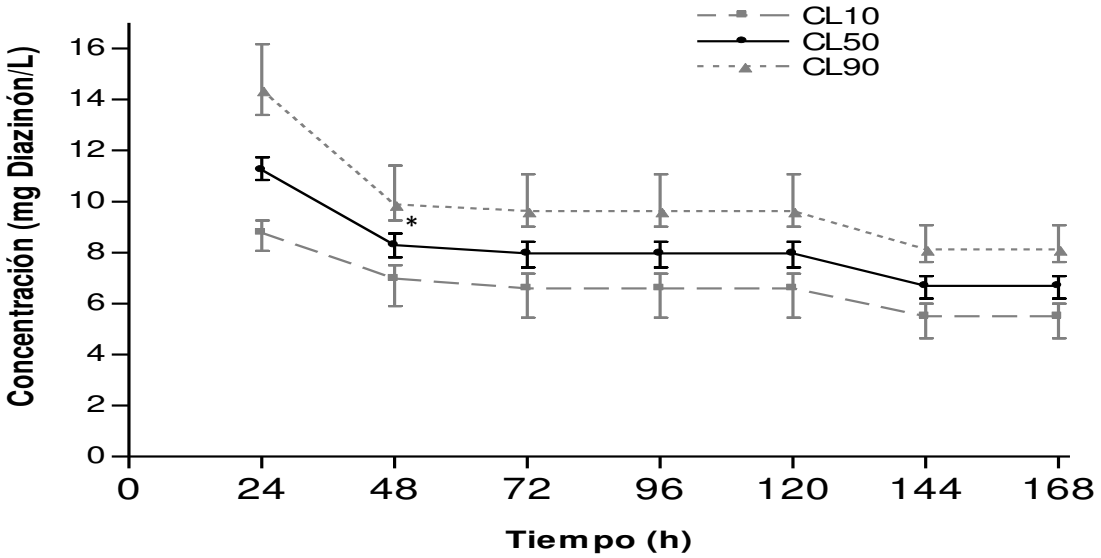


Figura 4.8.: Curvas TOP de isotoxicidad. Representación de las CL 10, 50 y 90 y sus intervalos de confianza del Diazinón sobre *R. arenarum* desde el inicio del desarrollo larval (E.25) a lo largo de 168h de exposición. * Diferencia significativa de la CL50 respecto de la correspondiente para el día anterior ($p \leq 0,05$).

4.4.3.2. Efectos Subletales

Los efectos subletales se asociaron principalmente al efecto neurotóxico del plaguicida expresándose en un comportamiento anormal de las larvas. Así, a las 24 h de exposición los individuos expuestos a 4,5 mg Diazinón/L presentaron mayor movilidad que los controles pero con trayectorias cortas y nado errático. Las larvas expuestas a concentraciones entre 6 a 9 mg Diazinón/L presentaron menor movilidad que los controles, también en forma errática y con trayectorias cortas. A partir de 10,5 hasta 12 mg Diazinón/L, los movimientos se hicieron más espaciados en el tiempo, hasta que a 15 mg Diazinón/L no hubo movimiento ni respuesta a los estímulos. A las 168 h de exposición crónico corta, las larvas expuestas a 4,5 mg Diazinón/L tuvieron movimientos cortos y espasmódicos y ya no se alimentaban, ya que el alimento quedaba intacto en el medio. A la exposición de 6 mg Diazinón/L, las larvas mostraron el mismo comportamiento y muchas presentaron hidropesía. A partir de 9 mg Diazinón/L, las larvas no respondieron a los estímulos y presentaron hidropesía general (Figura 4.9.).

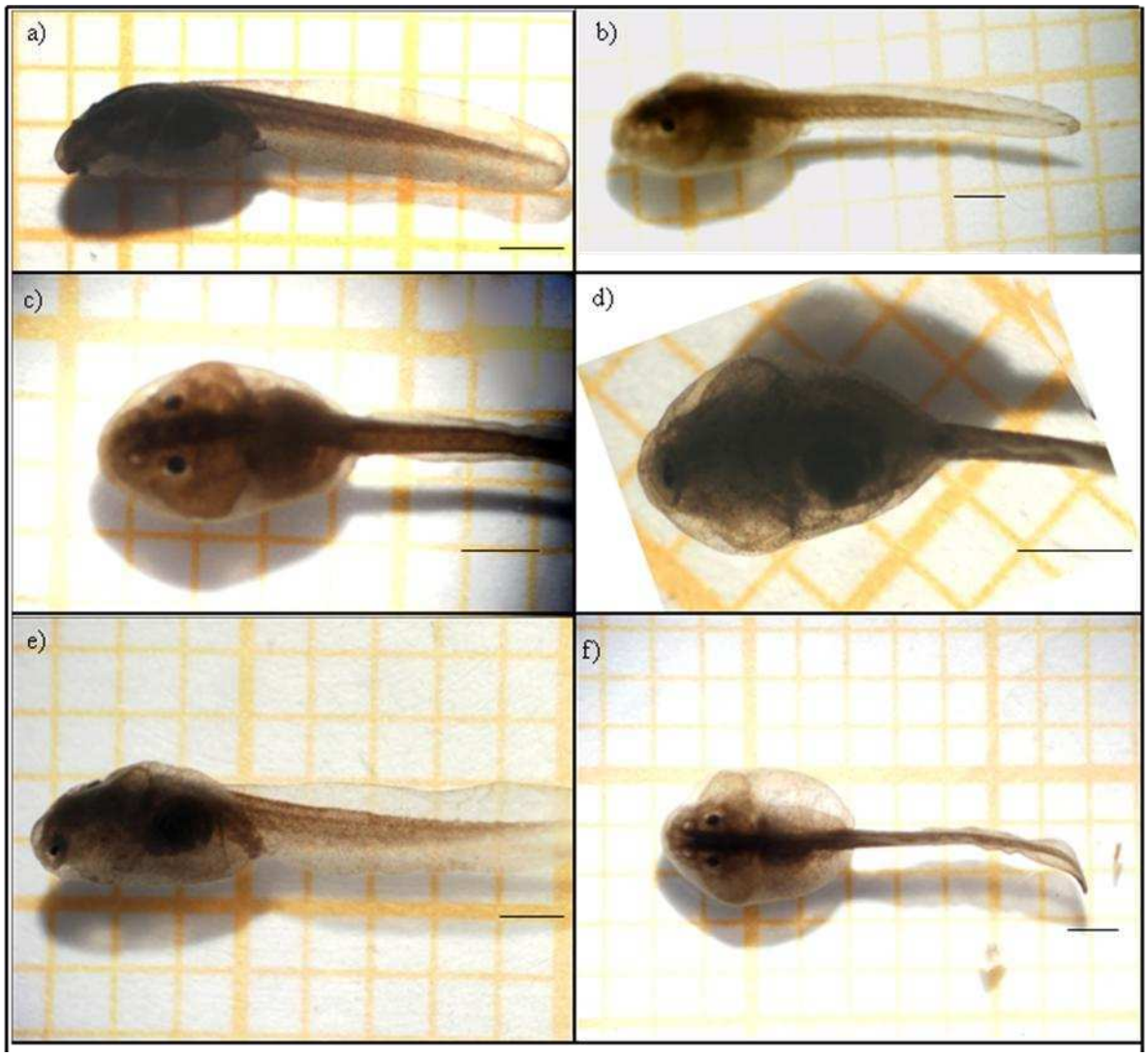


Figura 4.9.: Larvas de *R. arenarum* tratadas con Diazinón a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) y fijadas a las 168h a) Control. b) y c) 6 mg Diazinón/L d) a f) 9 mg Diazinón/L. Nótese el ondulamiento e incurvación de la aleta, los edemas generalizados, y el ensanchamiento del tubo cloacal.

4.4.4. Incorporación de Diazinón.

4.4.4.1 Ensayos preliminares:

Las CL50 a las 48 h, 72h y 168h fueron de 8,30 (7,81-8,75); 7,97 (7,41-8,42) y 6,69 (6,20-7,08) mg Diazinón/L, respectivamente. Teniendo en cuenta el patrón general de efecto letal del Diazinón, se observó un aumento de la toxicidad a lo largo del tratamiento, principalmente en las primeras 48 h y entre las 120 h y 144 h. Las CL10-48h, 72h y 168h fueron 6,97 (5,91-7,50); 6,60 (5,45-7,17) y 5,51 (4,64-6,00) mg Diazinón/L. Cabe destacar que los embriones empleados en este bioensayo resultaron más sensibles al tóxico que los utilizados en bioensayos previos si bien se conservó la tendencia en el perfil de toxicidad (Figura 4.10.). Los efectos subletales observados fueron edemas y alteraciones en el comportamiento (inicialmente hiperquinesia con movimientos erráticos que evolucionaron a quiescencia con espasmos de corta amplitud y finalmente la ausencia de respuesta a los estímulos).

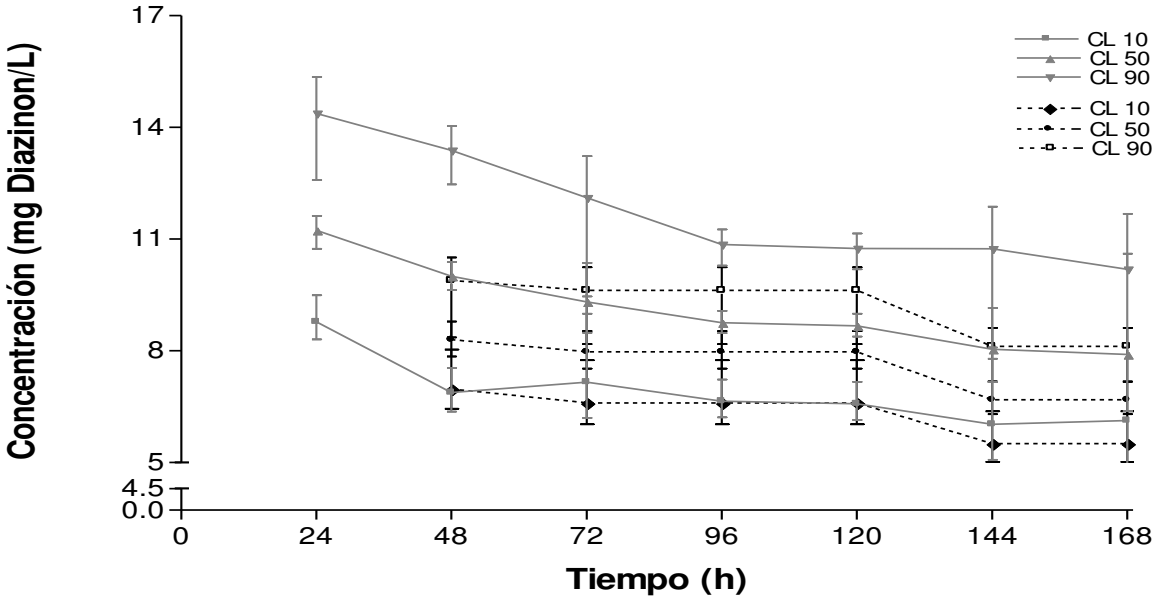


Figura 4.10.: Curvas TOP de isotoxicidad. Representación de las CL 10, 50 y 90 y sus intervalos de confianza del Diazinón sobre *R. arenarum*, expuestas a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) por 168h, mostrando las CLs y sus desvíos para el bioensayo a partir del cual se cuantificó la incorporación (·····) y para bioensayos anteriores (————).

La figura 4.11. muestra los cromatogramas correspondientes a los extractos de las muestras biológicas (larvas de *R. arenarum*) y la solución patrón de Diazinón. La incorporación fue concentración-dependiente observándose mayor incorporación de Diazinón en organismos expuestos a mayor concentración ($p<0,0002$). Cabe destacar que se observó una tendencia a la disminución en la incorporación con el tiempo de exposición, siendo significativa tanto para la concentración más baja (6 mg Diazinón/L) entre las 48 h y 144 h, y la más alta (7,5 mg Diazinón/L) en los dos tiempos ensayados (Figura 4.12.) .

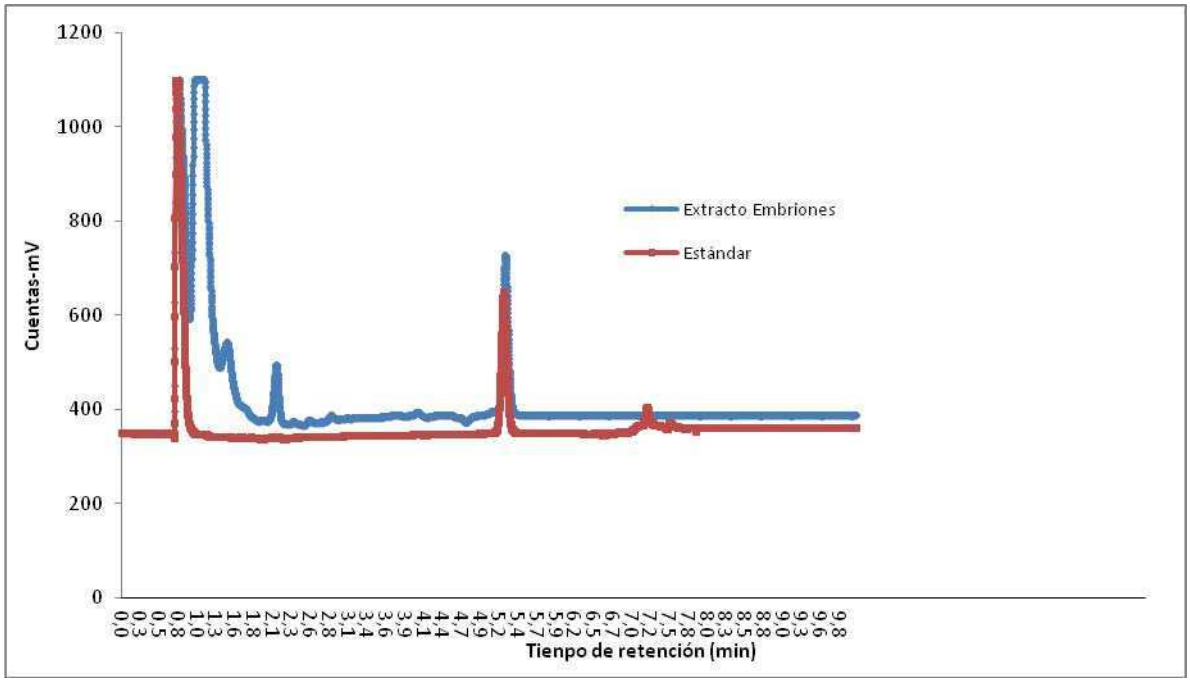


Figura 4.11.: Cromatogramas correspondientes a los extractos de las muestras biológicas (larvas de *R. arenarum*) y el patrón de Diazinón

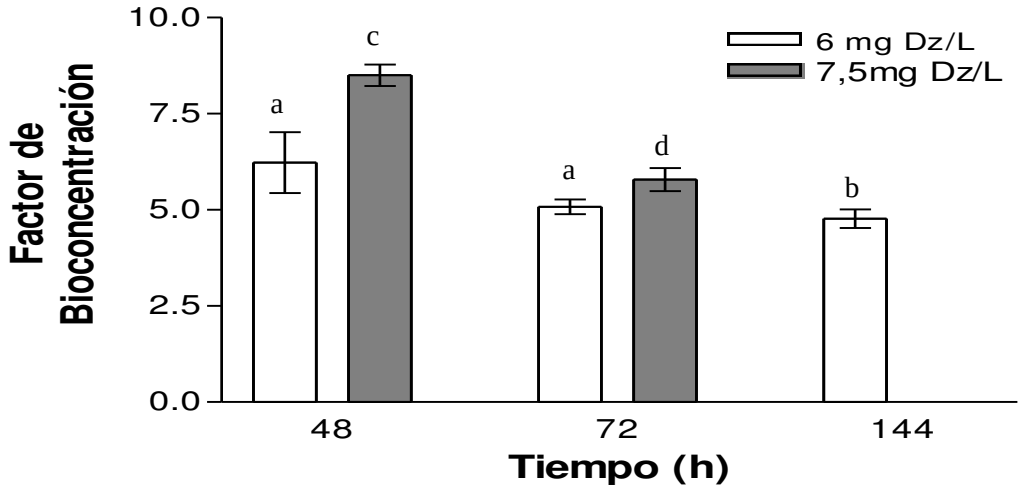


Figura 4.12.: Factores de Bioconcentración (FBC) del Diazinón (Dz) para larvas tempranas de *Rhinella arenarum* expuestas a partir del comienzo del desarrollo larval (E25). Letras diferentes indican diferencias significativas.

4.4.4.2. Ensayos definitivos

4.4.4.2.1. Exposición continua desde el inicio del desarrollo embrionario.

Bioensayos de toxicidad con los embriones provenientes de la ovulación en la cual se analizó la incorporación de Diazinón.

La toxicidad del Diazinón sobre los embriones de *Rhinella arenarum* desde el inicio del desarrollo embrionario (E.4), tuvo el mismo patrón que las camadas anteriores hasta las 168 h. Al profundizar la exposición, la toxicidad del plaguicida aumentó significativamente hasta alcanzar valores de CL50´s de 12,14 (10,97 - 13,15) mg Diazinón/L y 6,84 (5,65 - 7,77) mg Diazinón/L a las 240 h y 504 h, respectivamente (Figura 4.13.).

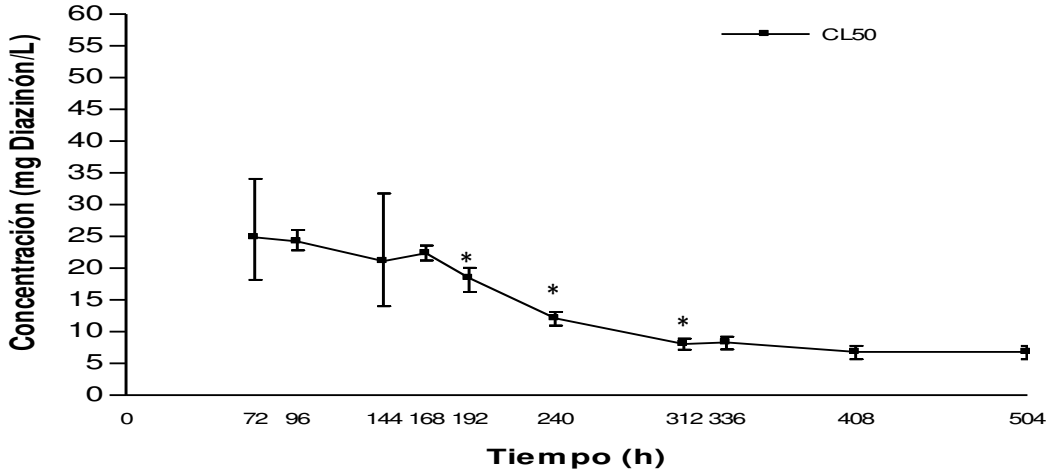


Figura 4.13.: Concentración Letal 50 (CL50), y sus intervalos de confianza, de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a Diazinón desde el inicio del desarrollo embrionario (E.4) en forma crónica.

Incorporación del Diazinón en embriones expuestos desde el inicio del desarrollo embrionario (E.4) por 504 h. Ensayo definitivo.

La incorporación del Diazinón resultó significativamente más alta para las primeras 96h de exposición. Sin embargo estos valores se redujeron drásticamente en función del tiempo hasta las 240 h, luego descendió con menor intensidad no registrándose diferencias significativas en la incorporación entre las 240 h y 504 h. Por otro lado, la incorporación en las primeras 96 h estuvo significativamente correlacionada con la exposición hasta los 3 mg Diazinón/L, después se alcanzaría un umbral, sin registrárse diferencias significativas entre la exposición a 3mg Diazinón/L y 4 mg Diazinón/L (Figuras 4.14 y 4.15).

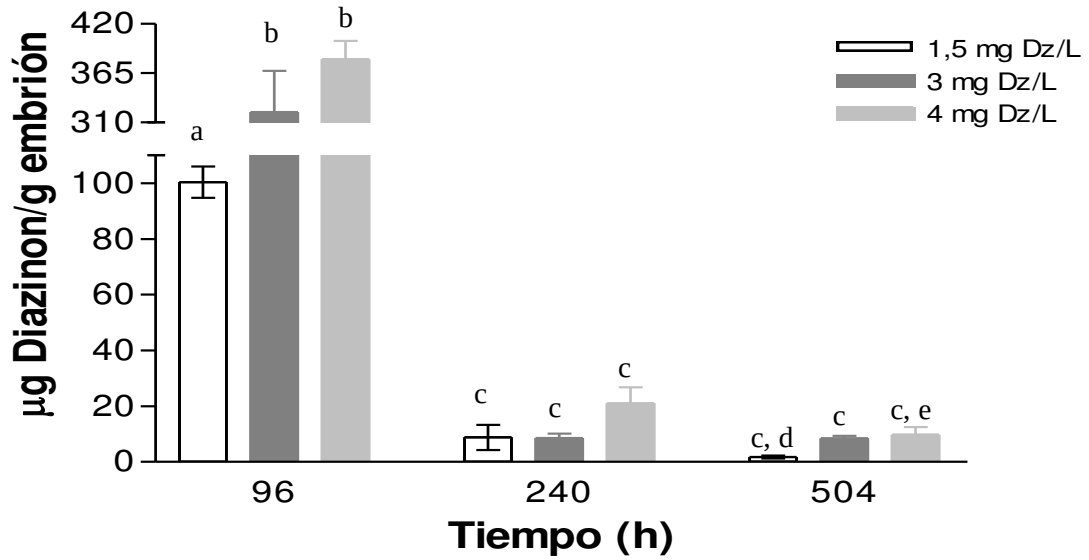


Figura 4.14.: Incorporación de Diazinón (Dz) para embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a partir del inicio del desarrollo embrionario (E.4) por 504 h. Letras diferentes indican diferencias significativas.

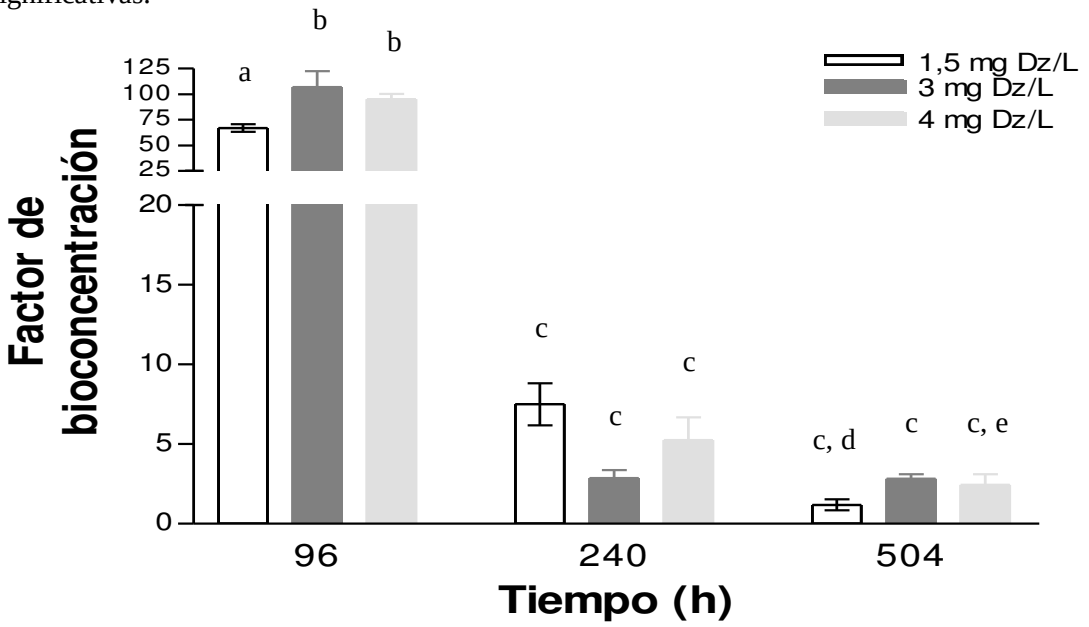


Figura 4.15.: Factor de bioconcentración (FBC) del Diazinón (Dz) para embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a partir del inicio del desarrollo embrionario (E.4) por 504 h. Letras diferentes indican diferencias significativas.

4.4.4.2.2 Exposición continua desde el inicio del desarrollo larval (E.25).

Bioensayos de toxicidad con los embriones provenientes de la ovulación en la cual se analizó la incorporación de Diazinón.

La toxicidad del Diazinón sobre las larvas tempranas de *Rhinella arenarum* desde el inicio del desarrollo larval (E.25), mostraron el mismo patrón que las camadas anteriores hasta las 168 h. Al profundizar la exposición, la toxicidad del insecticida aumentó significativamente hasta CL50´s de 5,166 (2,247 - 5,821) mg Diazinón/L y 1,922 (1,385 - 2,357) mg Diazinón/L, a las 240 h y 504 h respectivamente (Figura 4.16.).

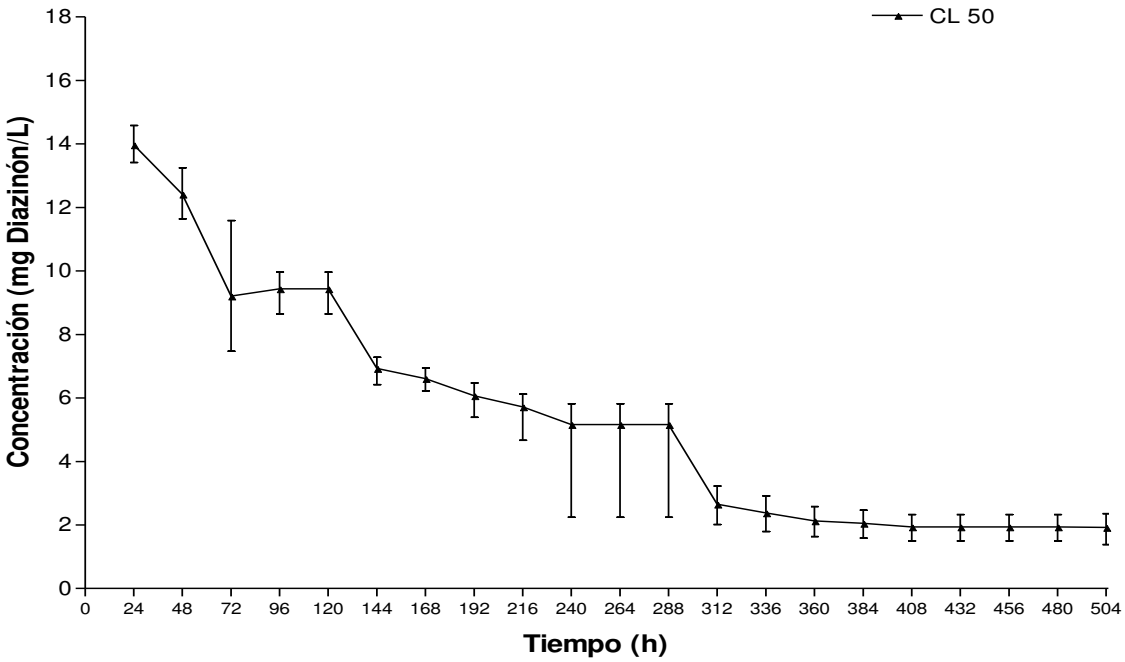


Figura 4.16.: Concentración Letal 50 (CL50), y sus intervalos de confianza, de larvas tempranas de *Rhinella arenarum* expuestas a Diazinón desde el inicio del desarrollo larval (E.25) por 504 h.

Incorporación de Diazinón en larvas tempranas expuestas desde el final del desarrollo embrionario (E.25) por 504h.

La incorporación de Diazinón mostró el mismo patrón que para el ensayo preliminar, en el que a mayor concentración hubo mayor incorporación, principalmente durante las primeras 96 h. Para los tratamientos más bajos (0,5 mg Diazinón/L y 1,5 mg Diazinón/L) se observó un descenso significativo en la incorporación del insecticida con el aumento del tiempo de exposición, no fue el mismo caso para la exposición a 3 mg Diazinón/L (Figura 4.17). El patrón de los Factores de Bioacumulación (FBC) fue similar, aunque menos marcado que el de incorporación (Figura 4.18).

Resumiendo, la incorporación de Diazinón fue marcadamente estadio-dependiente: entre 1 y 27 veces mayor para los embriones que para las larvas. Los Factores de Bioconcentración (FBC) para embriones tuvieron valores a las 96 h de hasta 107 mientras que para larvas fueron de solo 4.

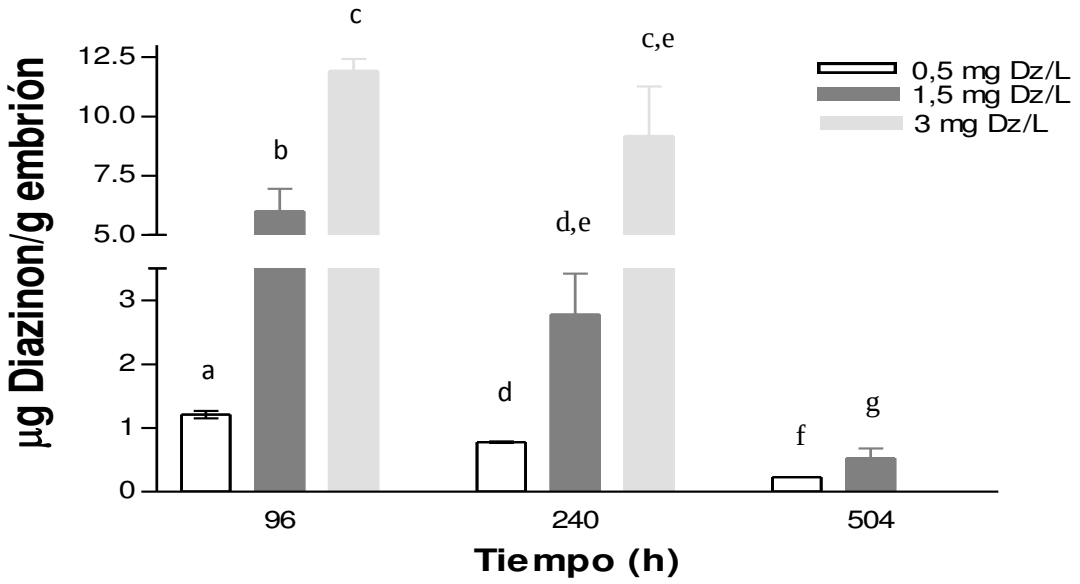


Figura 4.17.: Incorporación del Diazinón (Dz) en larvas tempranas de *Rhinella arenarum* expuestos a Diazinón desde el inicio del desarrollo larval (E.25) por 504 h. Letras diferentes indican diferencias significativas.

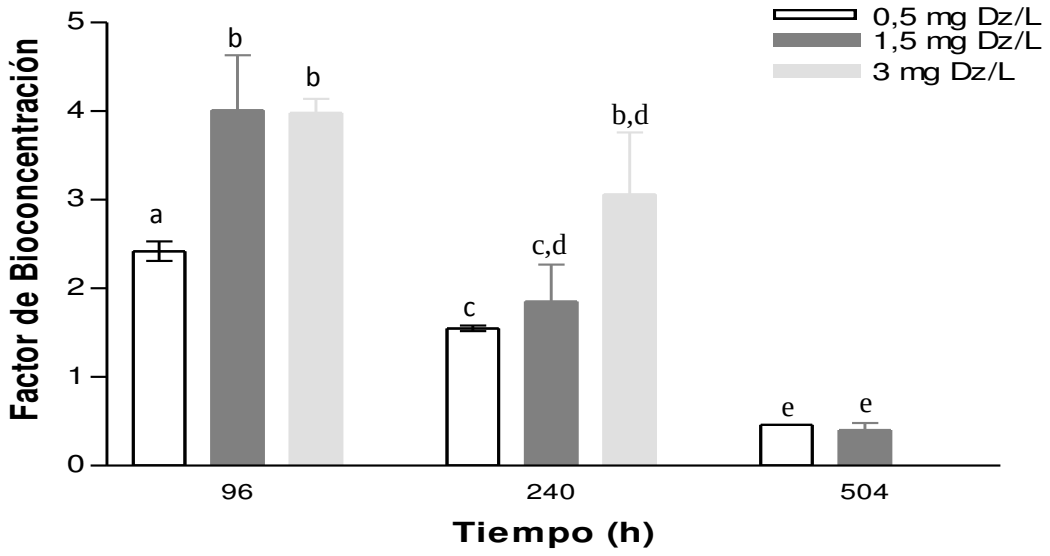


Figura 4.18: Factor de Bioconcentración (FBC) del Diazinón en larvas tempranas de *Rhinella arenarum* expuestos a Diazinón desde el inicio del desarrollo larval (E.25) por 504 h. Letras diferentes indican diferencias significativas.

4.5 Discusión

El Diazinón resultó ser un insecticida tóxico tanto para los embriones como para las larvas de *Rhinella arenarum*.

El Perfil de toxicidad (Curvas TOP) del Diazinón para embriones de *R. arenarum*, expuestos a partir del estadio de 2 blastómeros hasta finalizar el desarrollo embrionario (168 h) mostró como desciende significativamente la CL50 entre el periodo agudo de exposición al crónico corto, resultando así la toxicidad dependiente del tiempo de exposición. Asimismo, cuando se prolongó la exposición por 504 h la toxicidad siguió aumentando significativamente hasta alcanzar un valor máximo de toxicidad de CL50 de 6,84 (5,65 - 7,77) mg Diazinón/L, entre cuatro y tres veces más sensibles que en el periodo agudo (96 h) y crónico corto (168 h), respectivamente.

A su vez, se observó una diferencia importante entre las concentraciones que producen letalidad con las que causan teratogénesis. El insecticida provocó efectos subletales importantes en los embriones expuestos desde el inicio de su desarrollo, así, el índice teratogénico (IT) estimado de la relación entre la CL50 y la CE50, resultó en 1,52 y 1,71 a las 96 h y 144 h, respectivamente, mientras que el potencial teratogénico (PT), estimado como la relación entre el valor NOEC para letalidad y malformaciones a un determinado tiempo de exposición, resultó mayor a 2 a las 168 h. Estos valores ponen de manifiesto la alta teratogenicidad que ejerce el tóxico en los embriones de *R. arenarum* ya que valores de IT y PT mayores a 1,5 significan que existe una separación significativa entre los rangos de concentración necesarios para producir mortalidad y los que se requieren para producir malformaciones, por lo tanto presenta un gran potencial para ejercer malformaciones y otras alteraciones subletales, sin que exista una mortalidad significativa. Las principales malformaciones observadas fueron retraso en el desarrollo, subdesarrollo general, disociación celular, reducción general de la talla y de la cola, incurvación de la misma, ondulamiento de la altea, subdesarrollo o agenesia de branquias. Las malformaciones se completaron con edemas generalizados, subdesarrollo de branquias y ensanchamiento del tubo cloacal. Otros autores han informado la presencia de edemas como la principal y característica anormalidad en peces expuestos al Diazinón. Este tipo de

malformación ocurre como resultado de una alteración en el endotelio, que podría generarse por una activación local del insecticida, llevando a la apoptosis y pérdida de integridad celular, resultando así en un edema (Hamm y Hinton 2000; Osterauer y Köhler 2008). Por otro lado, el análisis estadístico de las diferencias en la longitud de los embriones expuestos en forma continua desde el inicio del desarrollo embrionario por 168 h a diferentes concentraciones de Diazinón, resalta que los embriones tratados con concentraciones a partir de 13,5 mg Diazinón/L, fueron significativamente menos desarrollados que los controles. Otros autores también informaron el retraso en el desarrollo, si bien esta alteración no es característica del insecticida sino que también se observó por la exposición a otras noxas (Aronzon *et al.* 2011a; Aronzon *et al.* 2011b; Sztrum *et al.* 2011). Esta reducción en la talla podría ser consecuencia de la ausencia de ingesta de los animales tratados, fenómeno que se observó ya desde el momento en que los controles comenzaban a alimentarse, y que está fuertemente asociado a las anormalidades observadas en el comportamiento, la ausencia total de actividad.

Los efectos subletales sobre el comportamiento fueron registrados aún a menores concentraciones en relación con las malformaciones, así el potencial teratogénico estimado como la relación entre el valor NOEC para letalidad o CL10, en este caso, y alteraciones en el comportamiento resultó casi en 4 para las primeras 96 h, siendo el valor NOEC de alteraciones en el comportamiento, la concentración de exposición más baja ensayada. Estas alteraciones en el comportamiento a bajas concentraciones o a tiempos cortos se expresaron como hiperquinesia, o movimientos espasmódicos, pero a concentraciones mayores o tiempos prolongados de exposición, resultaron en falta de movimiento y respuesta a los estímulos. Estas alteraciones en el comportamiento coinciden con los patrones descriptos de neurotoxicidad, que podría estar causada por la inhibición de la Acetilcolinesterasa (AChE), blanco principal del Diazinón (Fulton y Key 2001). Como la AChE de las membranas postsinápticas degrada al neurotrasmisor, acetilcolina (ChE) para poner fin a la transmisión neuronal colinérgica (Beauvais *et al.* 2000), como consecuencia el neurotrasmisor se acumula y se produce una sobrestimulación de los receptores colinérgicos causando neurotoxicidad, inhibiendo el centro respiratorio del cerebro y las uniones neuromusculares del aparato respiratorio (Coppage y Braidech 1976); además produce hiperactividad, pérdida de la coordinación, temblores, espasmos musculares,

convulsiones, nado anormal, y finalmente la parálisis e incluso la muerte. También, se ha demostrado la correlación entre las alteraciones en el comportamiento, el nado y los cambios en la actividad de la AChE (Beauvais *et al.* 2000).

La disminución del latido cardíaco observada, también fue observada en peces y podría ser también consecuencia de la inhibición de la AChE en el corazón vía nervio vago, deprimiendo la frecuencia, el poder de contracción y la excitación del corazón (Osterauer y Köhler 2008).

Por otro lado, independientemente de su capacidad inhibitoria sobre la AChE también se ha informado la interferencia del Diazinón con los mecanismos y eventos del desarrollo del sistema nervioso, afectando la regulación génica del ciclo celular y la apoptosis en el desarrollo de células nerviosas, con un patrón de vulnerabilidad dependiente de la etapa específica de desarrollo (Flaskos 2012; Slotkin y Seidler 2012).

Estas alteraciones observadas ponen de manifiesto y encienden una alarma ya que no solo la inhibición de la AChE afecta a los organismos *blanco*, sino que también puede afectar a organismos *no blanco*, como los anfibios e incluso el Diazinón podría presentar otras vías de toxicidad independientemente de la inhibición de la AChE.

El perfil de toxicidad del Diazinón para las larvas tratadas desde el comienzo de su desarrollo (E.25) por 168 h también demostró un aumento significativo de la letalidad a lo largo del tratamiento, por lo que la toxicidad del insecticida es dependiente del tiempo de exposición. Así mismo, cuando se prolongó la exposición por 504 h la toxicidad siguió aumentando significativamente hasta alcanzar un valor máximo de toxicidad de CL50 de 1,92 (1,39 - 2,36) mg Diazinón/L, entre 4 y 3,5 veces más sensibles que en el periodo agudo (96 h) y crónico corto (168 h), respectivamente.

En el caso de las larvas tratadas desde E.25, también se observaron efectos subletales sobre el comportamiento, asociados al efecto neurotóxico. Como los individuos en este estadio de exposición presentan movilidad, los efectos fueron observados desde las primeras 24 h, a concentraciones de exposición más bajas que las de los estadios tempranos. El potencial teratogénico estimado como la relación entre el valor NOEC empírico para letalidad y NOEC empírico para alteraciones en el comportamiento resultó 2,

aunque el valor NOEC para alteraciones fue la menor concentración ensayada. El patrón de anormalidades resultó dependiente tanto de la concentración, desde 4,5 mg Diazinón/L a las 24 h, como del tiempo de exposición, y respondió también a las características de la neurotoxicidad, en la que a bajas concentraciones o tiempos cortos se expresaron como hiperquinesia, o movimientos espasmódicos, mientras que a concentraciones mayores o tiempos prolongados de exposición, resultaron en ausencia de movimiento y respuesta a los estímulos. Por otro lado la exposición prolongada, crónico corta, produjo efectos subletales, principalmente edemas generalizados.

En cuanto a la letalidad las larvas resultaron particularmente más sensibles, así el perfil de toxicidad mostró una susceptibilidad entre 3 a 4,4 veces superior, principalmente durante las primeras horas de exposición en comparación con los embriones expuestos desde el inicio de su desarrollo. Los estudios sobre la susceptibilidad estadio-dependiente a diferentes agentes tóxicos han mostrado que existe una toxicidad diferencial de cada compuesto con cada etapa del desarrollo (Aronzon *et al.* 2011a; Aronzon *et al.* 2011b; Hutler Wolkowicz *et al.* 2011; Sztrum *et al.* 2011). Sin embrago, con respecto a los organofosforados en general hay controversia, ya que si bien algunos estudios sobre la toxicidad de los organofosforados en general y del Diazinón en particular sobre la carpa común muestran una mayor sensibilidad de los estadios más tempranos (Aydın y Köprücü 2005), otros estudios con Medaka mostraron un aumento en la toxicidad durante el desarrollo embrio-larval (Hamm *et al.* 2001). Asimismo se ha informado un aumento en la sensibilidad de las larvas cuando se las exponen a otros organofosforados (Takimoto *et al.* 1984), lo mismo que en el caso de *Rhinella arenarum* (Anguiano *et al.* 1994).

Por otro lado, al ejercer la toxicidad mediante la inactivación de la AChE, es importante considerar cómo es la activación de dicha enzima en el desarrollo embrionario de los anfibios. Como ya se ha mencionado la AChE es una enzima vinculada a las membranas postsinápticas que degrada ACh para poner fin a la transmisión neuronal colinérgica (Beauvais *et al.* 2000), por lo que el inicio de su actividad durante el desarrollo embrionario estaría dado por la aparición de células especializadas. Se ha informado que la actividad de la AChE en *Xenopus laevis* comienza en los estadios en los que se desarrolla la médula espinal y el cerebro, equivalente al estadio 16, Tubo Neural, en *Rhinella arenarum.*

Para el estadio 18, Respuesta Muscular, en *R. arenarum* en que el embrión comienza a moverse espontáneamente, la actividad de la enzima se duplica, y aumenta progresivamente a medida que el embrión se vuelve más activo, eclosiona de la membrana vitelina y comienza a nadar. Por lo tanto, el aumento de la actividad de la AChE está bien correlacionado con el desarrollo muscular y nervioso (Gindi y Knowland 1979). Este hecho podría justificar el aumento de 3 a casi 5 veces de la susceptibilidad de las larvas en comparación a la de los embriones, como así también el aumento de la sensibilidad a lo largo del desarrollo embrionario en los embriones expuestos desde blástula.

Se ha informado que el Diazoxón, producto metabólico del Diazinón en el que el azufre de su grupo P=S es sustituido por un oxígeno, exhibe un potencial de inhibición de la AChE mayor que el mismo Diazinón, interfiriendo también en el desarrollo normal del sistema nervioso, induciendo apoptosis en células neuronales (Flaskos 2012). Como la metabolización de los organofosforados es mediada por el citocromo P450 dependiente del sistema monooxigenasa, sería de interés tener la información detallada de la aparición del P450, para evaluar su posible intervención en la toxicidad diferencial entre los dos periodos del desarrollo.

Con respecto a la incorporación del insecticida, ya el estudio preliminar en las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas desde el comienzo del desarrollo larval (E.25), mostró un efecto concentración-dependiente en la incorporación al Diazinón coincidentemente con lo informado para peces (Keizer *et al.* 1991), esto resultó evidente principalmente a las 48 h de exposición. Cabe destacar la disminución observada en la concentración del insecticida al aumentar el tiempo de exposición. Por otro lado, la mayor sensibilidad de los embriones utilizados en el presente estudio hizo que las concentraciones de exposición resultaran levemente tóxicas y no, por debajo del valor NOEC como se esperaba. De esta forma, la concentración más baja (6 mg Diazinón/L) estuvo siempre muy cercana a la CL10 y la más alta (7 mg Diazinón/L) a la CL50, quedando por encima de la misma hacia las 144 h, razón por la cual no se pudo obtener una medición a dicho tiempo.

Los ensayos definitivos sobre la incorporación tanto en los embriones tratados desde inicio (E.4) como desde el final (E.25) del desarrollo embrionario mostraron el mismo patrón, efecto concentración-dependiente, principalmente para las primeras 96 h de

exposición. La incorporación tuvo un descenso al prolongarse el tiempo de exposición, para ambos tratamientos, aunque fue más drástico durante el periodo embrionario y larval de los individuos expuestos desde el inicio del desarrollo embrionario (E.4). Distintos factores podrían estar influyendo en este descenso, uno de ellos podría ser la transformación metabólica del Diazinón mediante el citocromo P450 en su metabolito Diazoxón. Por otro lado, la incorporación del Diazinón fue marcadamente estadio-dependiente entre 1 y 27 veces mayor en exposiciones tempranas desde el inicio del desarrollo embrionario que las exposiciones desde larvas tardías.

Los Factores de Bioconcentración (FBC) para embriones tuvieron valores de hasta 107 a las 96 h, que se pueden incluir entre los más altos de los citados en la bibliografía. Así, entre los caracoles el factor varió entre 6 y 17, mientras que para peces, el índice alcanzó valores tan altos como 152 en *Pseudorasbora parva*, mientras que para otros peces el factor varió entre 65 y 18 para *Cyprinus carpio* y *Poecilia reticulata*, respectivamente.

Contrariamente, en el caso de las larvas de *Rhinella arenarum* el factor de bioconcentración fue de solo 4. Esta diferencia tan marcada en la incorporación del insecticida entre embriones y larvas podría deberse a la alta composición de lípidos presente en el vitelo de los embriones, que luego se va consumiendo a medida que avanza el desarrollo embrionario. En este sentido ya se había informado la relación entre la absorción y la lipofilicidad en huevos de peces, y el Diazinón en particular presenta una baja solubilidad en agua, lo que lo hace fácil de absorberse (Hamm *et al.* 2001).

Los resultados muestran que los embriones tempranos tienen una capacidad extraordinaria de acumular y tolerar altas concentraciones del insecticida sin afectarse y recién en estadios larvales y a tiempos crónicos regulan la concentración interna del tóxico. En cambio, las larvas muestran mucha mayor sensibilidad al tóxico aún con una baja incorporación. Es importante resaltar que si bien los organofosforados son considerados altamente degradables, el Diazinón es uno de los más estables habiéndose informado una degradación del 72% a los 30 días (Kanazawa 1975). Cabe destacar la relevancia que tiene evaluar la incorporación de los contaminantes, ya que éstos pueden bioconcentrarse y aún cuando no es posible detectar efectos agudos o crónicos sobre el organismo, la bioacumulación debe ser considerada como un criterio de riesgo en sí mismo, ya que

algunos de los efectos pueden ser reconocidos en una fase posterior de la vida de los individuos expuestos, o incluso en individuos en los eslabones más avanzados de la red trófica. La bioacumulación de las sustancias químicas en la biota puede ser la señal temprana para efectos adversos en los ecosistemas (Franke *et al.* 1994).

La mayoría de los estudios de toxicidad se basan en los efectos sobre determinados periodos del ciclo de vida, si bien el rango de toxicidad informada del Diazinón sobre anfibios es amplio. cuando se compara la toxicidad por exposición desde el inicio del desarrollo, *Rana clamitans* resulta la más sensible con una CL50 a los 16 días de solo 5 µg/L (Harris *et al.* 1998), así la diferencia en la sensibilidad con respecto a *Rhinella arenarum* estaría en los tres órdenes de magnitud. Asimismo, *R. arenarum* resulta 2,5 veces más resistente que *Xenopus laevis* (Modra *et al.* 2011). Sin embargo, cuando se compara la sensibilidad con otras especies durante el final del desarrollo embrionario y el periodo larval, *R. arenarum* presenta una sensibilidad similar a *Rana boylii* (Sparling y Fellers 2007), pero resulta cuatro veces más sensible que *Bufo melanostictus* (Sumanadasa *et al.* 2008). Estas diferencias en la toxicidad en los diferentes estadios del desarrollo y a distintos tiempos, resaltan la importancia de las evaluaciones de la toxicidad durante varios estadios del desarrollo de los anfibios para la protección temprana de las especies.

Si bien la información sobre valores de Diazinón en el ambiente es escasa, han sido informados valores en el orden de 0,1 a 1 mg/L en el valle central de California (Brady *et al.* 2006). Los valores de exposición sobre la toxicidad del insecticida en *Rhinella arenarum*, destacan el riesgo potencial que podría significar la presencia de este compuesto para las poblaciones del sapo común americano. Una forma de estimar numéricamente el riesgo ecológico, HQ por sus siglas en Inglés, es utilizar la aproximación planteada por la USEPA (1998), adoptando el peor escenario posible basándose en el "principio precautorio", mediante el cociente entre una medida puntual de la toxicidad, que podría ser la CL10, y un valor ambiental esperado de la exposición (Boutin *et al.* 1993; Boutin *et al.* 1995). De esta forma, el valor HQ se lo compara con el "valor de preocupación" (LOC, level of concern) propuesto por la USEPA. El LOC es una herramienta de política ambiental que se utiliza para interpretar el cociente de riesgo y analizar el riesgo potencial para los organismos *no blanco*, así como la necesidad de tomar medidas reglamentarias. El valor LOC para considerar la existencia de un potencial riesgo es 1. Si el HQ supera el

valor 1, es posible que la sustancia en cuestión sea responsable de producir efectos adversos. Para el caso del Diazinón el valor HQ calculado fue de 2,73. Como este valor se calculó a partir de una concentración letal resalta que el insecticida podría traer graves consecuencias a las poblaciones de *R. arenarum* relacionadas particularmente con la sobrevida. Más aún, la gran diferencia entre las concentraciones que ejercen algún tipo de malformaciones o alteraciones en la talla y/o el comportamiento, muestran que el riesgo podría ser aún mayor. Asímismo, resalta la gran importancia que tiene la evaluación y consideración de dichas alteraciones en los bioensayos de toxicidad, a fin de no subestimar el riesgo para las poblaciones de anfibios, ya que si bien algunas de estas alteraciones pueden no ser letales a corto plazo, aumentan la vulnerabilidad de los individuos, haciéndolos más susceptibles a predadores y agentes de estrés secundarios.

Capítulo 5: Toxicidad de las Mezclas.

5.1. Objetivos e hipótesis.

5.1.1. Objetivos.

Evaluar la toxicidad letal de las mezclas binarias del Cobre, Diazinón y Nonilfenol, en diferentes proporciones, utilizando bioensayos de toxicidad con embriones y larvas de *Rhinella arenarum* (ANFITOX) en ensayos agudos (de hasta 96 h) y crónico-cortos (168 h).

5.1.2. Hipótesis.

La toxicidad que causan las mezclas binarias de Nonilfenol y cobre, y de Diazinón y cobre en diferentes proporciones tiene una desviación de la aditividad hacia el antagonismo en embriones y larvas de *Rhinella arenarum*.

La toxicidad de las diferentes proporciones de mezclas binarias de Nonilfenol y Diazinón presenta una desviación de la aditividad hacia el sinergismo en embriones y larvas de *Rhinella arenarum*.

5.2. Introducción

Las evaluaciones de toxicidad de las sustancias químicas tradicionales se basan principalmente sobre los efectos de las sustancias individuales. Los datos de los resultados de la toxicidad singular de los compuestos han sido empleados y utilizados de base para decidir criterios de calidad de agua y normas para la protección de la vida acuática (Enserink *et al.* 1991; Mason 1992). Sin embargo, como ya lo hemos mencionado anteriormente, los ecosistemas acuáticos están usualmente contaminados por un gran número de compuestos químicos, provenientes de diversas actividades industriales, agrícolas y domésticas (Boedeker *et al.* 1993). Más aún, el comportamiento de los compuestos químicos en las mezclas podría no ser el esperado según los conocimientos para cada compuesto puro. La interacción de las mezclas puede resultar en complejos y sustanciales cambios en las propiedades de cada componente (Altenburger *et al.* 2003). La presencia simultánea de dos o más sustancias puede alterar las propiedades fisicoquímicas de los componentes como la solubilidad, lo que a su vez podría cambiar la biodisponibilidad y/o las respuestas a dichos componentes (Altenburger *et al.* 2003). Por estas razones, varios autores han manifestado la necesidad de incorporar el análisis de la toxicidad de mezclas como objetivo de evaluación de calidad ambiental.

Asimismo, la noción de que la interacción de los contaminantes en las mezclas puede ser sinérgica, llevó a replantear la relevancia ecológica de los límites de seguridad de las sustancias en muchos países. En este contexto, Enserink y *et al.* (1991) evaluaron diferentes mezclas de metales pesados, en concentraciones proporcionales a los niveles guía establecidos como criterio de referencia en Holanda, en *Daphnia magna* y larvas de *Salmo gairdneri*. Así, los niveles máximos permitidos para la protección de la calidad de agua holandesa, en mezcla resultaron tóxicos para los organismos prueba. Estos resultados indican claramente, que los criterios de calidad de agua establecidos mediante la evaluación individual de los compuestos no pueden proteger la biota si estuvieran presentes como mezclas, que es lo que usualmente ocurre en la naturaleza. En Holanda, estos hallazgos llevaron al desarrollo de nuevos criterios de calidad de agua considerando los resultados de

la toxicidad conjunta (Enserink *et al.* 1991). Algunos autores plantearon la necesidad de una reevaluación de los parámetros de criterio de agua establecidos por la Agencia de Protección de los Estados Unidos, basados en la evaluación de la toxicidad individual. Este hecho repercutió directamente en Argentina, ya que prácticamente todos los estándares de protección de agua fueron establecidos en base a las recomendaciones o estudios realizados por dicho organismo (Otitoloju 2003; Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación 2003). Calamari y Alabaster (1980), Marking (1985) y Calabrese (1991) plantearon tres tipos básicos de interacción: adición, sinergismo y antagonismo. Definieron adición, como la toxicidad conjunta que resulta igual a la esperada de la suma de las toxicidades individuales de los compuestos que forman parte de la mezcla. De esta forma, quedan planteados dos modelos de adición, que pueden ser: adición de la concentración o adición en la respuesta. En el primer caso, los compuestos presentan el mismo sitio de acción o el mismo mecanismo de toxicidad, por lo que no hay interferencia entre los compuestos químicos no interactúan. En este tipo de acción conjunta, los compuestos pueden ser sustituidos uno por otro. En el caso de la adición en la respuesta, los compuestos pueden tener diferentes sitios de acción; sin embargo los químicos tampoco se afectan entre sí en la actividad biológica de cada uno, en este caso tampoco interactúan. Esto ocurre cuando cada componente en la mezcla actúa sobre un sistema fisiológico o bioquímico diferente pero contribuyen a una respuesta común (Anderson y Weber 1975), en la que la toxicidad total de la mezcla es igual a la suma de las respuestas biológicas producidas por cada químico individual. A pesar de las controversias que implica el alcance de la caracterización del sitio de acción o mecanismo de acción, y que muchas veces estos datos no se conocen como así tampoco la identidad de algunos compuestos en las mezclas, se ha postulado que los modelos basados en la adición en la concentración pueden ser una herramienta realista al momento de la evaluación de cualquier tipo de mezcla (Backhaus *et al.* 2000) .

El sinergismo se da en los casos en que la toxicidad de la mezcla es mayor a la esperada si la toxicidad de la mezcla fuera aditiva. En contraposición, el antagonismo se da cuando la toxicidad de la mezcla es menor a la esperada si la mezcla fuera aditiva. En este tipo de acción conjunta al menos uno de los compuestos estaría afectando la actividad biológica de algún otro compuesto en la mezcla. La actividad biológica puede ser alterada tanto por variaciones en las tasas de absorción, metabolismo o eliminación.

En los bioensayos de toxicidad conjunta, una herramienta muy utilizada para determinar los efectos de una mezcla es el concepto de Unidad Tóxica (UT) (Sprague 1970), en la que la concentración de los compuestos en la mezcla son expresados como fracciones de sus CL50 o CE50. Por lo tanto la toxicidad conjunta de la mezcla es evaluada comparando la CL50 o CE50 de la mezcla con la correspondiente suma de las unidades tóxicas. Si la suma de las unidades tóxicas es igual a la unidad que produce el 50% de los efectos en la mezcla la acción conjunta se define como adición. Una desviación significativa de la misma podría, en caso de ser menor que uno dar una respuesta antagónica o sinérgica en caso de que sea mayor que uno.

Las mezclas creadas artificialmente para su evaluación en el laboratorio pueden ser equitóxicas o no equitóxicas. Las mezclas equitóxicas son aquellas en la que los componentes están presentes en la mezcla en la misma proporción de sus respectivas toxicidades. A diferencia de éstas, en las mezclas no equitóxicas los diferentes componentes no se encuentran en igual proporción en relación a sus propias toxicidades.

Los isobologramas (Figura 5.1.), cuyo nombre deriva de *iso*, igual y *bol*, efecto; están basados en modelos de concentración aditivos y son muy utilizados también en el análisis de la toxicidad conjunta. En el caso de las mezclas binarias, son gráficos bidimensionales con las concentraciones de los compuestos en los ejes de coordenadas. En el isobolograma una o varias líneas conectan diversas combinaciones entre los compuestos químicos que producen el mismo efecto tóxico. Las isobolas son curvas de iso-efecto que muestran combinaciones que resultan en la misma toxicidad. La isobola conecta dosis isoefectivas de las dos sustancias cuando se administran solas. Así, la línea principal diagonal une los valores entre la unidad de las Unidades Tóxicas de los dos compuestos, lo que representaría la línea de adición. La combinación de concentraciones (M1, M2 y M3) puede representarse por un punto en el gráfico, cuyos ejes son las concentraciones de las sustancias individuales. Entonces, si el valor que causa un efecto tóxico determinado se encuentra arriba y a la derecha, por encima de la línea de adición, entonces la mezcla es antagónica. Contrariamente, si el valor que causa un efecto tóxico determinado está por debajo y a la izquierda, de la línea de adición, entonces la mezcla es sinérgica (Figura 5.1.). Si bien originalmente los isobologramas fueron planteados para el análisis de variables

cuantales, son muy utilizados porque no solo pueden representar variables discretas, sino también continuas (Gessner 1995).

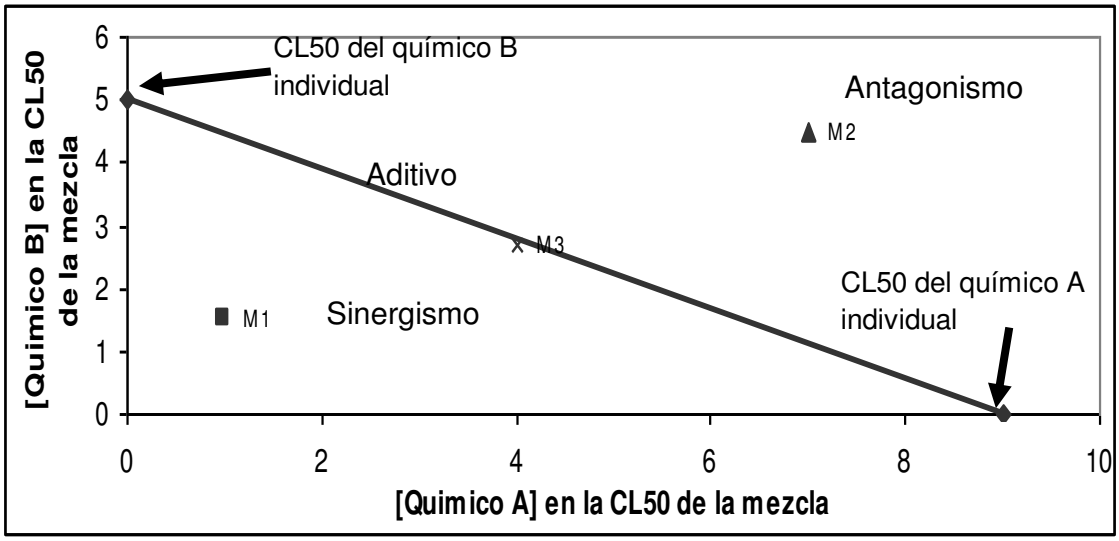


Figura 5.1.: Ejemplo de un isobolograma para mezclas binarias. Obsérvese la línea de adición y las áreas correspondientes al sinergismo y antagonismo.

En los bioensayos de toxicidad conjunta es muy importante realizar los bioensayos de toxicidad individual en paralelo, al mismo tiempo y con la misma camada de individuos que la mezcla. Esto le da robustez a la predicción de la interacción dado que disminuye las posibilidades de un falso positivo o falso negativo. El cambio en la sensibilidad entre los bioensayos puede derivar en una interpretación errónea de los resultados como una desviación de la adición (De Laender *et al.* 2009). Por otro lado, también se ha planteado que incluso realizando los estudios de toxicidad en simultáneo se puede arribar a falsos positivos o negativos, por lo que se recomienda siempre replicar los bioensayos (Cedergreen *et al.* 2007).

Los efectos tóxicos del cobre, Diazinón y nonilfenol, si bien no fueron estudiados hasta el momento sobre *Rhinella arenarum*, sí se habían evaluado en diferentes especies de anfibios y en forma aislada (Bridges *et al.* 2002; Ferreira *et al.* 2004; Mann y Bidwell 2000; Modra *et al.* 2011). Sin embrago, son pocos o inexistentes los trabajos enfocados en el estudio de las posibles interacciones de estos compuestos. Las tres sustancias abarcan un

posible abanico de contaminantes: un metal, un plaguicida y una sustancia de uso mayoritariamente industrial. Si bien comparten algunos usos en común como la actividad plaguicida del cobre (Davis *et al.* 2001), o la utilización del nonilfenol como adyuvante de muchos agroquímicos (Ying *et al.* 2002), lo que aumenta la posibilidad de encontrarlos juntos en el medio, finalmente e inevitablemente terminan encontrándose en el medio acuático producto de la deriva, escurrimiento y lixiviado (González 2004).

5.3. Materiales y Métodos

5.3.1. Obtención de material biológico

Los embriones y larvas de *Rhinella arenarum* (sapo común americano) se obtuvieron, se seleccionaron y mantuvieron según lo descripto en la sección 2.3.1.1.

5.3.2. Criterio de aceptación del material biológico.

El criterio de aceptación del material biológico fue el mismo, así la calidad y fecundidad de los huevos fue evaluada diariamente, considerándose aceptable una tasa de fertilidad mayor al 75 % y más de un 70% de sobrevida de embriones normales al alcanzarse el estadio de néurula (E.13) (Herkovits y Pérez-Coll 1999).

5.3. 3. Protocolos experimentales

Entre los años 2007 y 2011 se realizaron los bioensayos con embriones y larvas provenientes de parejas independientes, habiendo repetido, como mínimo tres veces, cada uno de los protocolos experimentales que se describen a continuación, usando embriones y larvas de diferentes camadas.

5.3.3.1. Exposición continua.

Se aplicó el conjunto de bioensayos estandarizados ANFITOX (Herkovits y Pérez-Coll 1999) descriptos en la sección 2.3.3.1.

- ANFIEMB
- ANFIAGU.
- ANFICOR.

5.3.4. Condiciones generales de los tratamientos.

Las condiciones generales de los tratamientos se realizaron según lo descripto en la sección 2.3.4.

5.3.4. Preparación de las soluciones.

Las soluciones individuales de Cobre, Nonilfenol y Diazinón se prepararon según se indicó en las secciones 2.3.9, 3.3.6 y 4.3.9. Se prepararon soluciones madres de mezclas binarias equitóxicas y no equitóxicas, mezclando diferentes proporciones de las soluciones correspondiente de cada compuesto en SA, las soluciones utilizadas en los bioensayos se obtuvieron por dilusiones de la solución madre. Simultáneamente para cada tratamiento, además de los individuos control en SA, se mantuvieron controles de acetona, en caso que correspondiera, que consistieron en triplicados de 10 embriones o larvas expuestos a la máxima concentración de acetona utilizada en el bioensayo. Además, se realizaron bioensayos de cada tóxico por separado utilizando de 6 a 9 concentraciones, con el fin de obtener los valores de CL50 de referencia, para cada camada de individuos ensayada.

La proporción de cada sustancia en cada mezcla se calculo y se expresó como fracción de la respectiva CL50 obtenida para la misma camada de individuos, en forma simultánea. Con tal fin se utilizó el concepto de Unidad Tóxica (UT) (Ecuación 5.1.)

$UT= [X]/CL50_X$ (Ecuación 5.1.)

Donde [X] es la concentración del tóxico en la mezcla y $CL50_X$, es la concentración letal 50 del tóxico a las 168 h.

5.3.5 Análisis de datos

Los valores de toxicidad representados por las CL50s para las sustancias individuales y las mezclas se obtuvieron según el método descrito en la sección 2.3.10. Con la información obtenida se graficaron los isobologramas. La evaluación de las interacciones de las mezclas se hizo siguiendo el método descrito por Marking L.L. (1977). Asimismo, con fines descriptivos se calculó el índice S, para cada mezcla ensayada.

$$S = [A]_m/CL50_A + [B]_m/CL50_B \qquad \text{(Ecuación 5.2.)}$$

Donde $[X]_m$ es la concentración de la sustancia en la mezcla y $CL50_x$ es la concentración letal 50 de la sustancia en el tiempo evaluado.

De esta forma, el valor de S resulta siempre positivo; más aún, valores iguales a uno implican adición, mientras que valores mayores a uno implican antagonismo, y valores menores a uno implican sinergismo.

5.4. Resultados

5.4.1. Determinación de la toxicidad conjunta de Cobre y Nonilfenol sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4) por 168h.

La letalidad de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua por 168 h a una mezcla binaria de cobre y nonilfenol fue evaluada mediante el protocolo ANFITOX. La toxicidad de la mezcla está representada mediante la CL50 de los tóxicos en forma individual y en comparación con sus respectivas CL50 en la mezcla, en los correspondientes isobologramas para cada tiempo de exposición.

En forma individual el cobre resultó más tóxico que el nonilfenol, así a las 72 h la diferencia fue de 35 veces, y aunque ambos compuestos mostraron el mismo comportamiento, durante el desarrollo embrionario, con un aumento en la toxicidad, este fue mayor en el caso del cobre, así la diferencia en la toxicidad de las dos sustancias fue de casi 50 veces a las 168 h. Los efectos sobre la sobrevida por exposición a las diferentes proporciones de la mezcla en relación a los obtenidos por la exposición a las sustancias individuales presentaron como patrón general una desviación de la adición hacia el antagonismo (Tabla 5.1 y Figura 5.2.).

Tabla 5.1.: Toxicidad de las mezclas binarias de Cobre y Nonilfenol en proporciones diferentes (1 UT Cobre/ 1 UT Nonilfenol; 3 UT Cobre/ 2 UT Nonilfenol; 2 UT Cobre/ 1 UT Nonilfenol; 2 UT Cobre/ 3 UT Nonilfenol; 1 UT Cobre/2 Nonilfenol) sobre embriones de *R. arenarum* expuestos a partir del estadio de blástula hasta finalizar el desarrollo embrionario (168h). Valor S= Índice de mezclas, sumatoria de las Unidades Tóxicas de las sustancias en la mezclas.

Tiempo de exposición (h)	**Relación de sustancias en la mezcla**	**Valor S**	**Interacción**
	1Cu/1NP	1,57	Antagonismo
	1Cu/1NP	1,55	Antagonismo
	3Cu/2NP	1,49	Antagonismo
	2Cu/1NP	1,50	Antagonismo
	2Cu/3NP	1,58	Antagonismo
72	1Cu/2NP	1,55	Antagonismo
	1Cu/1NP	1,74	Antagonismo
	1Cu/1NP	1,96	Antagonismo
	3Cu/2NP	1,45	Antagonismo
	3Cu/2NP	1,58	Antagonismo
	2Cu/1NP	1,60	Antagonismo
	2Cu/3NP	1,35	Antagonismo
96	1Cu/2NP	1,97	Antagonismo
	1Cu/1NP	1,58	Antagonismo
	1Cu/1NP	2,21	Antagonismo
	3Cu/2NP	1,82	Antagonismo
	3Cu/2NP	1,64	Antagonismo
	2Cu/3NP	1,80	Antagonismo
120	1Cu/2NP	1,87	Antagonismo

	1Cu/1NP	2,06	Antagonismo
	1Cu/1NP	1,61	Antagonismo
	3Cu/2NP	1,69	Antagonismo
	3Cu/2NP	1,79	Antagonismo
	2Cu/1NP	1,58	Antagonismo
	2Cu/3NP	1,65	Antagonismo
144	1Cu/2NP	1,63	Antagonismo
	1Cu/1NP	1,81	Antagonismo
	1Cu/1NP	1,72	Antagonismo
	3Cu/2NP	1,71	Antagonismo
	2Cu/1NP	1,40	Antagonismo
	2Cu/3NP	1,73	Antagonismo
168	1Cu/2NP	1,61	Antagonismo

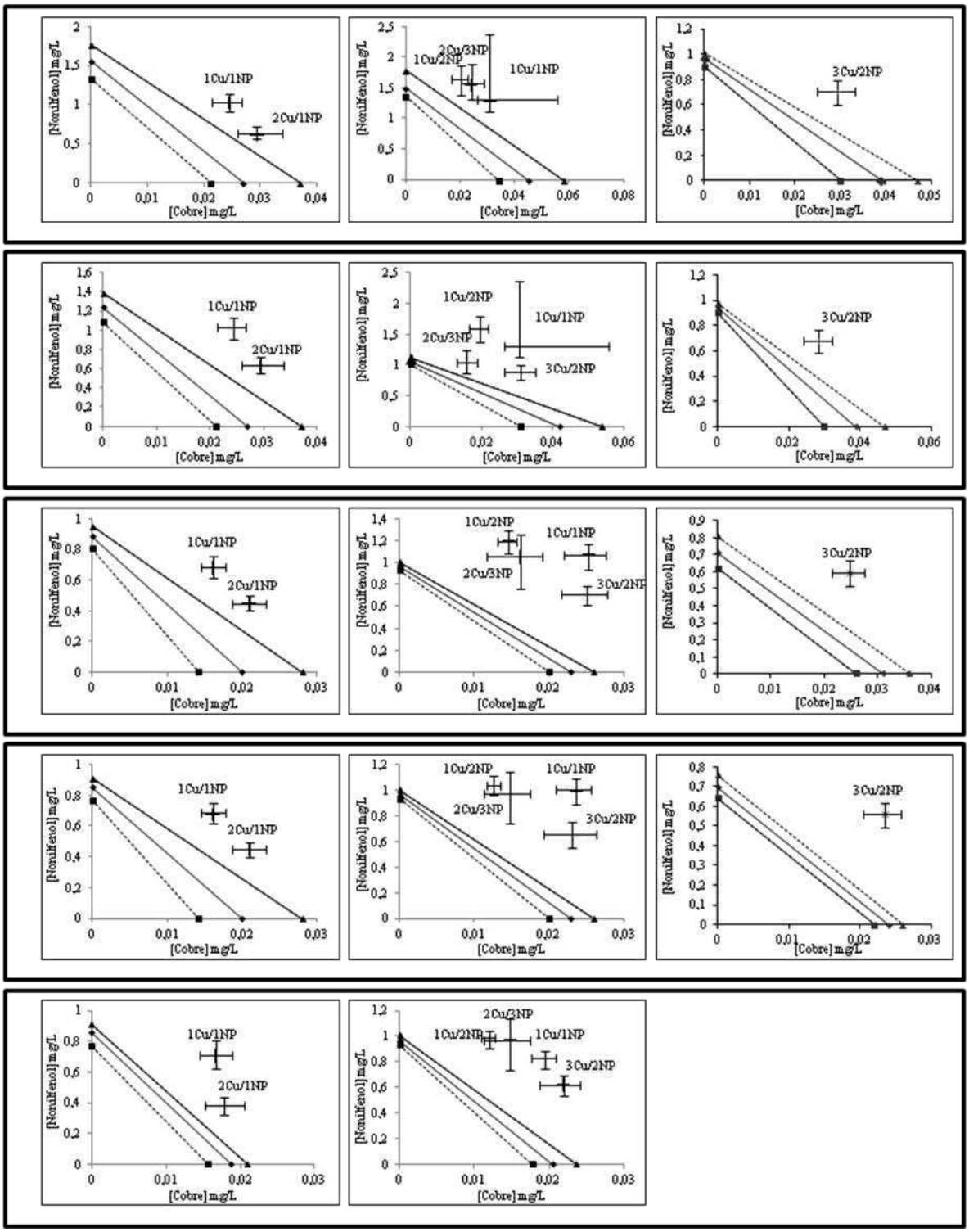


Figura 5.2: Isobologramas para las CL50, con sus intervalos de confianza (95%), de Cobre y Nonilfenol en forma individual, y de las mezcla binarias en proporciones diferentes (1 UT Cobre/ 1 UT Nonilfenol; 3 UT Cobre/ 2 UT Nonilfenol; 2 UT Cobre/ 1 UT Nonilfenol; 2 UT Cobre/ 3 UT Nonilfenol; 1 UT Cobre/2 Nonilfenol) sobre embriones de *R. arenarum* tratados a partir de blástula. Exposición por (a) 72 h; (b) 96 h; (c) 120 h; (d) 144 h y (e) 168 h.

5.4.2. Determinación de la toxicidad conjunta de Cobre y Nonilfenol sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) por 168h.

La letalidad de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua por 168 h a una mezcla binaria de cobre y nonilfenol fue también evaluada mediante el protocolo ANFITOX. La toxicidad de la mezcla está representada mediante la CL50 de los tóxicos en forma individual y en comparación con sus respectivas CL50 en la mezcla, en los correspondientes isobologramas para cada tiempo de exposición.

Al igual que el tratamiento desde el inicio del desarrollo embrionario, el cobre resultó más tóxico que el nonilfenol, más de siete veces. Sin embargo, a diferencia del metal que fue más toxico en el tratamiento durante el desarrollo embrionario, el orgánico resultó más tóxico a partir de la finalización del desarrollo embrionario. Así mismo, en el caso de la exposición desde el comienzo del desarrollo larval la toxicidad de ambas sustancias tanto en forma individual, como en mezcla se mantuvo constante a lo largo de la exposición.

Los efectos sobre la sobrevida por exposición a las mezclas en relación a los obtenidos por la exposición a las sustancias individuales presentaron como patrón general una desviación de la adición, hacia el antagonismo (Tabla 5.2). Sin embargo, aunque la suma de las unidades tóxicas de la CL50 de la mezcla siempre fue mayor a uno, para algunas proporciones, donde el cobre se encontraba en mayor relación al nonilfenol (3UT Cobre/ 2UT Nonilfenol y 2 UT Cobre/ 1 UT Nonilfenol), esta diferencia no fue significativa para superar la adición. No se observó el mismo comportamiento para la proporción en que el metal quintuplicaba la relación con el orgánico, que resultó claramente antagónica para todos los tiempos evaluados (Tabla 5.2. y Figura 5.3.).

Tabla 5.2.: Toxicidad de las mezclas binarias de Cobre y Nonilfenol en proporciones diferentes (1 UT Cobre/ 1 UT Nonilfenol; 3 UT Cobre/ 2 UT Nonilfenol; 2 UT Cobre/ 1 UT Nonilfenol; 5 UT Cobre/ 1 UT Nonilfenol; 2 UT Cobre/ 3 UT Nonilfenol; 1 UT Cobre/2 Nonilfenol) sobre embriones de *R. arenarum* expuestos a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) por 168h. Valor S= Índice de mezclas, sumatoria de las Unidades Tóxicas de las sustancias en la mezclas.

Tiempo de exposición (h)	**Relación de sustancias en la mezcla**	**Valor S**	**Interacción**
24	1Cu/1NP	1,39	Antagonismo
	3Cu/2NP	1,24	Adición
	2Cu/1NP	1,13	Adición
	2Cu/3NP	2,32	Antagonismo
	2Cu/3NP	1,64	Antagonismo
48	1Cu/1NP	1,45	Antagonismo
	3Cu/2NP	1,36	Antagonismo
	2Cu/1NP	1,23	Adición
	2Cu/3NP	2,37	Antagonismo
	2Cu/3NP	1,60	Antagonismo
	1Cu/2NP	1,80	Antagonismo
72	1Cu/1NP	1,50	Antagonismo
	3Cu/2NP	1,35	Antagonismo
	2Cu/1NP	1,28	Adición
	5Cu/1NP	1,50	Antagonismo
	2Cu/3NP	2,25	Antagonismo
	2Cu/3NP	1,57	Antagonismo
	1Cu/2NP	1,68	Antagonismo
96	1Cu/1NP	1,52	Antagonismo
	3Cu/2NP	1,39	Antagonismo
	2Cu/1NP	1,25	Adición

	5Cu/1NP	1,50	Antagonismo
	2Cu/3NP	2,29	Antagonismo
	2Cu/3NP	1,48	Antagonismo
	1Cu/2NP	1,71	Antagonismo
	1Cu/1NP	1,50	Antagonismo
	3Cu/2NP	1,30	Adición
	2Cu/1NP	1,06	Adición
	5Cu/1NP	1,48	Antagonismo
	2Cu/3NP	2,13	Antagonismo
	2Cu/3NP	1,38	Antagonismo
120	1Cu/2NP	1,71	Antagonismo
	1Cu/1NP	1,55	Antagonismo
	3Cu/2NP	1,25	Adición
	2Cu/1NP	1,05	Adición
	5Cu/1NP	1,58	Antagonismo
	2Cu/3NP	2,27	Antagonismo
	2Cu/3NP	1,42	Antagonismo
144	1Cu/2NP	1,81	Antagonismo
	1Cu/1NP	1,58	Antagonismo
	3Cu/2NP	1,05	Adición
	2Cu/1NP	1,05	Adición
	5Cu/1NP	1,50	Antagonismo
	2Cu/3NP	2,35	Antagonismo
	2Cu/3NP	1,59	Antagonismo
168	1Cu/2NP	1,86	Antagonismo

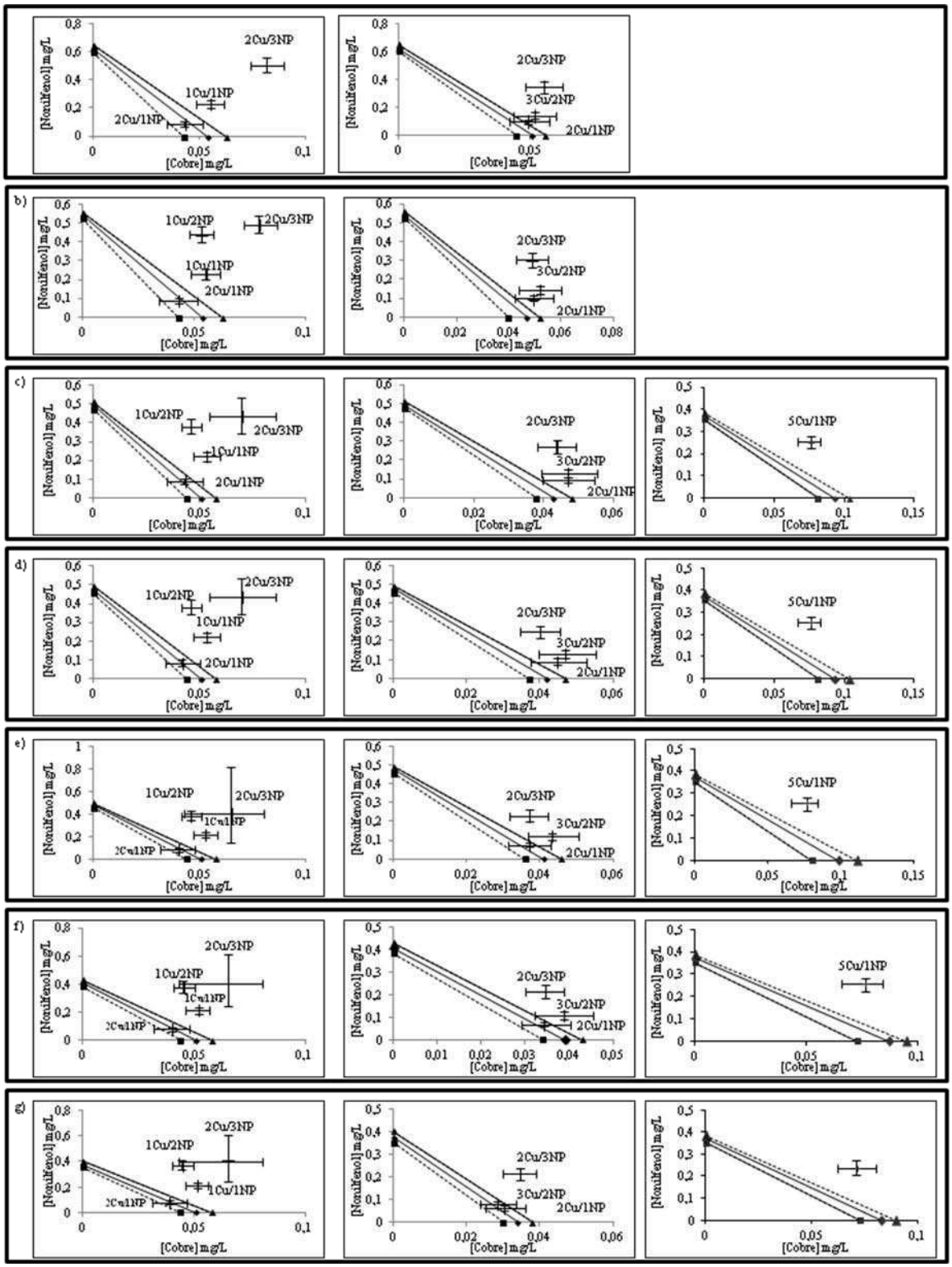


Figura 5.3.: Isobologramas para las CL50, con sus intervalos de confianza (95%), de Cobre y Nonilfenol en forma individual, y de las mezcla binarias en proporciones diferentes (1 UT Cobre/ 1 UT Nonilfenol; 3 UT Cobre/ 2 UT Nonilfenol; 2 UT Cobre/ 1 UT Nonilfenol; 5 UT Cobre/ 1 UT

Nonilfenol; 2 UT Cobre/ 3 UT Nonilfenol; 1 UT Cobre/2 Nonilfenol) sobre embriones de *R. arenarum* expuestos a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25). Exposición por (a) 24 h; (b) 48 h; (c) 72 h; (d) 96 h, (e) 120 h; (f) 144 h y (g) 168 h.

5.4.3. Determinación de la toxicidad conjunta de Cobre y Diazinón sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4) por 168h.

Los efectos letales de una mezcla binaria de cobre y Diazinón sobre los embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua por 168 h a fueron evaluados mediante el protocolo ANFITOX. La toxicidad de la mezcla está representada mediante la CL50 de los tóxicos en forma individual y en comparación con sus respectivas CL50 en la mezcla, en los correspondientes isobologramas para cada tiempo de exposición.

Comparando los resultados de la toxicidad del cobre y Diazinón en forma individual sobre los embriones de *Rhinella arenarum* (Capítulos 2 y 4.), puede observarse que el metal resultó varias veces más toxico que el Diazinón. Así, el cobre fue entre 820 y 1025 veces más tóxico que el insecticida entre las 72 h y 168 h de exposición respectivamente.

Simultáneamente se evaluó la toxicidad de la mezcla de ambos compuestos en diferentes proporciones, sobre el desarrollo embrionario de *Rhinella arenarum.* Así, la interacción de la mezcla equitóxica (1 UT Diazinón/ 1 UT Cobre) resultó antagónica ($p<0,05$) para todos los tiempos ensayados, desde 72 h hasta 168 h. El mismo patrón se observó para todos los tiempos evaluados de la mezcla con mayor proporción del metal (2 UT Diazinón/ 3 UT Cobre) desde las 96 h hasta las 168 h. Para la exposición en la que el metal duplica la relación con el insecticida (1 UT Diazinón/ 2 UT Cobre) se observó una tendencia al antagonismo, aunque no se encontró una diferencia significativa con lo esperado para la adición desde las 72 h hasta las 120 h, sin embargo, desde las 144 h hasta las 168 h la relación fue claramente antagónica ($p< 0,05$) (Tabla 5.3. y Figura 5.4.).

Por otro lado, al igual que el patrón de toxicidad individual de las sustancias, la toxicidad de la mezcla resultó en un aumento significativo en la mortalidad de los embriones de *Rhinella arenarum* al expandir el tiempo de exposición.

Tabla 5.3.: Toxicidad de las mezclas binarias de Cobre-Diazinón en tres proporciones diferentes (1 UT Diazinón/ 1 UT Cobre; 2 UT Diazinón/ 3 UT Cobre; 1 UT Diazinón/ 2 UT Cobre) sobre embriones de *R. arenarum* expuestos a partir del estadio de blástula hasta finalizar el desarrollo embrionario (168h). Valor S= Índice de mezclas, sumatoria de las Unidades Tóxicas de las sustancias en la mezclas.

Tiempo de exposición (h)	**Relación de sustancias en la mezcla**	**Valor S**	**Interacción**
72	1Dz/1Cu	1,44	Antagonismo
	1Dz/2Cu	1,02	Adición
96	1Dz/1Cu	1,71	Antagonismo
	2Dz/3Cu	1,75	Antagonismo
	1Dz/2Cu	1,14	Adición
120	1Dz/1Cu	2,01	Antagonismo
	2Dz/3Cu	1,82	Antagonismo
	1Dz/2Cu	1,16	Adición
144	1Dz/1Cu	1,89	Antagonismo
	2Dz/3Cu	1,66	Antagonismo
	1Dz/2Cu	1,40	Antagonismo
168	1Dz/1Cu	2,02	Antagonismo
	2Dz/3Cu	1,64	Antagonismo
	1Dz/2Cu	1,46	Antagonismo

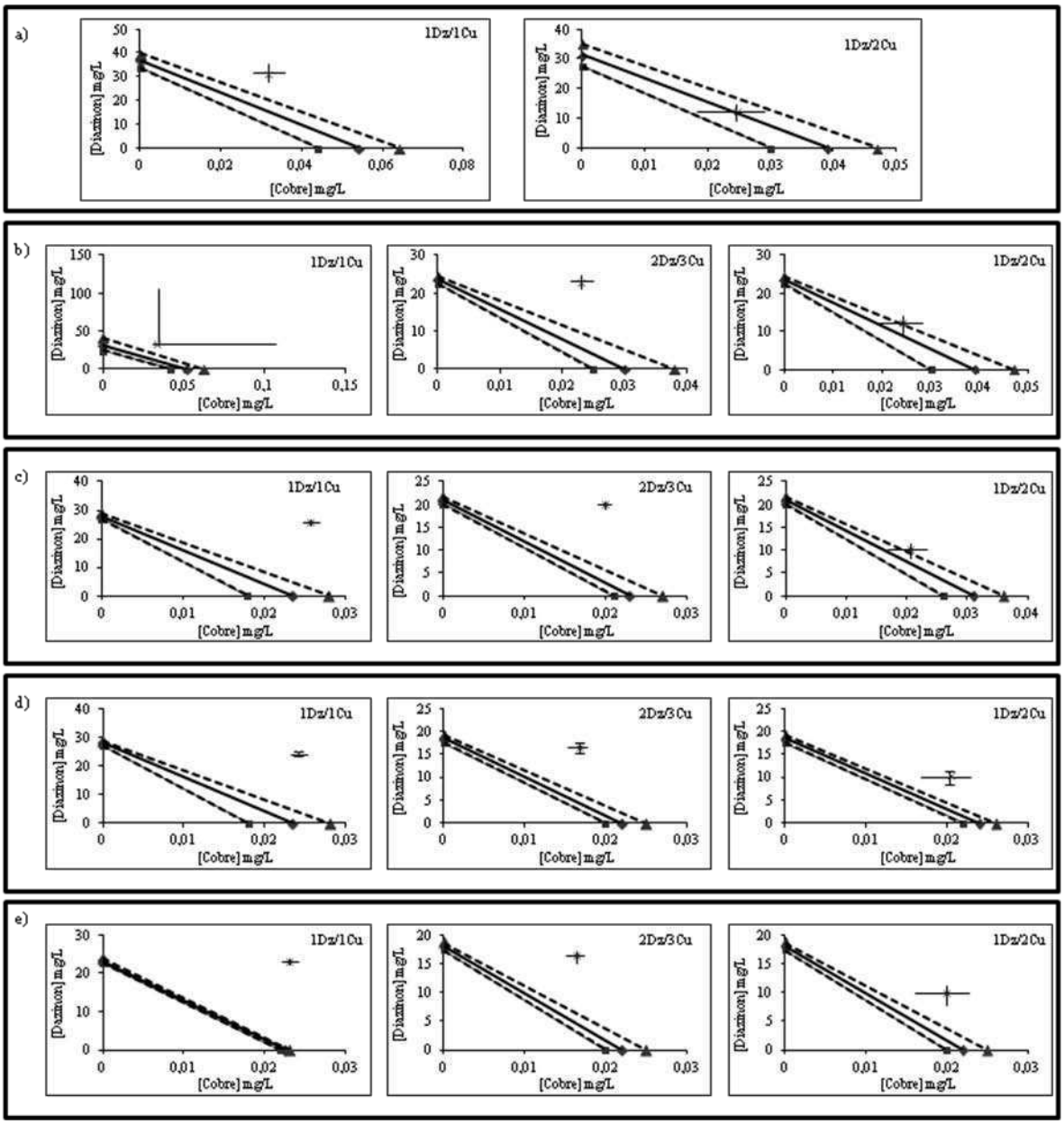


Figura 5.4.: Isobologramas para las CL50, con sus intervalos de confianza (95%), de Cobre y Diazinón en forma individual, y de las mezcla binarias en tres proporciones diferentes (1 UT Diazinón/ 1 UT Cobre; 2 UT Diazinón/ 3 UT Cobre; 1 UT Diazinón/ 2 UT Cobre) sobre embriones de *R. arenarum* tratados a partir de blástula. Exposición por (a) 72 h; (b) 96 h; (c) 120 h; (d) 144 h y (e) 168 h.

5.4.4. Determinación de la toxicidad conjunta de Cobre y Diazinón sobre larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) por 168h.

La letalidad de las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas desde el inicio del desarrollo larval (E.25) en forma continua por 168 h a una mezcla binaria de cobre y Diazinón, también fue evaluada mediante el protocolo ANFITOX. La toxicidad de la mezcla está representada mediante la CL50 de los tóxicos en forma individual y en comparación con sus respectivas CL50 en la mezcla, en los correspondientes isobologramas para cada tiempo de exposición.

Comparando los resultados de la toxicidad del cobre y Diazinón en forma individual sobre los embriones de *Rhinella arenarum* (Capitulo 2 y 4), al igual que en el tratamiento desde el inicio del desarrollo embrionario, el cobre resultó más tóxico que el insecticida, si bien la diferencia fue menor durante el final del desarrollo, varió entre 207 y 131 veces a las 24 h y 168 h, respectivamente. A diferencia del cobre que resultó menos tóxico durante el desarrollo larval, que durante el embrionario, la sensibilidad de las larvas en el estadio de Opérculo Completo al insecticida fue significativamente mayor que durante el desarrollo embrionario.

Tanto la toxicidad de la mezcla equitóxica de Diazinón y cobre (1 UT Diazinón/ 1 UT Cobre), como la de las mezclas con mayor proporción del insecticida (2 UT Diazinón/ 1 UT Cobre; 3 UT Diazinón/ 2 UT Cobre), resultaron en una interacción del tipo antagónica en todos los casos para todos los tiempos ensayados (Tabla 5.4 y Figura 5.5).

Tabla 5.4. : Toxicidad de las mezclas binarias de Cobre-Diazinón en tres proporciones diferentes (1 UT Diazinón/ 1 UT Cobre; 3 UT Diazinón/ 2 UT Cobre; 2 UT Diazinón/ 1 UT Cobre) sobre larvas de *R. arenarum* expuestas a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) por 168h. Valor S= Índice de mezclas, sumatoria de las Unidades Tóxicas de las sustancias en la mezclas.

Tiempo de exposición (h)	**Relación de sustancias en la mezcla**	**Valor S**	**Interacción**
24	1Dz/1Cu	1,63	Antagonismo
	2Cu/3Dz	1,65	Antagonismo
	1Cu/2Dz	1,21	Antagonismo
	1Cu/2Dz	1,53	Antagonismo
48	1Dz/1Cu	1,56	Antagonismo
	2Cu/3Dz	1,47	Antagonismo
	1Cu/2Dz	1,38	Antagonismo
	1Cu/2Dz	1,73	Antagonismo
72	1Dz/1Cu	1,58	Antagonismo
	2Cu/3Dz	1,57	Antagonismo
	1Cu/2Dz	1,40	Antagonismo
	1Cu/2Dz	1,45	Antagonismo
96	1Dz/1Cu	1,39	Antagonismo
	2Cu/3Dz	1,67	Antagonismo
	1Cu/2Dz	1,33	Antagonismo
	1Cu/2Dz	1,45	Antagonismo
120	1Dz/1Cu	1,32	Antagonismo
	2Cu/3Dz	1,67	Antagonismo
	1Cu/2Dz	1,22	Antagonismo
	1Cu/2Dz	1,39	Antagonismo
144	1Dz/1Cu	1,16	Antagonismo

	2Cu/3Dz	1,51	Antagonismo
	1Cu/2Dz	1,23	Antagonismo
	1Cu/2Dz	1,42	Antagonismo
168	1Dz/1Cu	1,16	Antagonismo
	2Cu/3Dz	1,45	Antagonismo
	1Cu/2Dz	1,11	Antagonismo
	1Cu/2Dz	1,43	Antagonismo

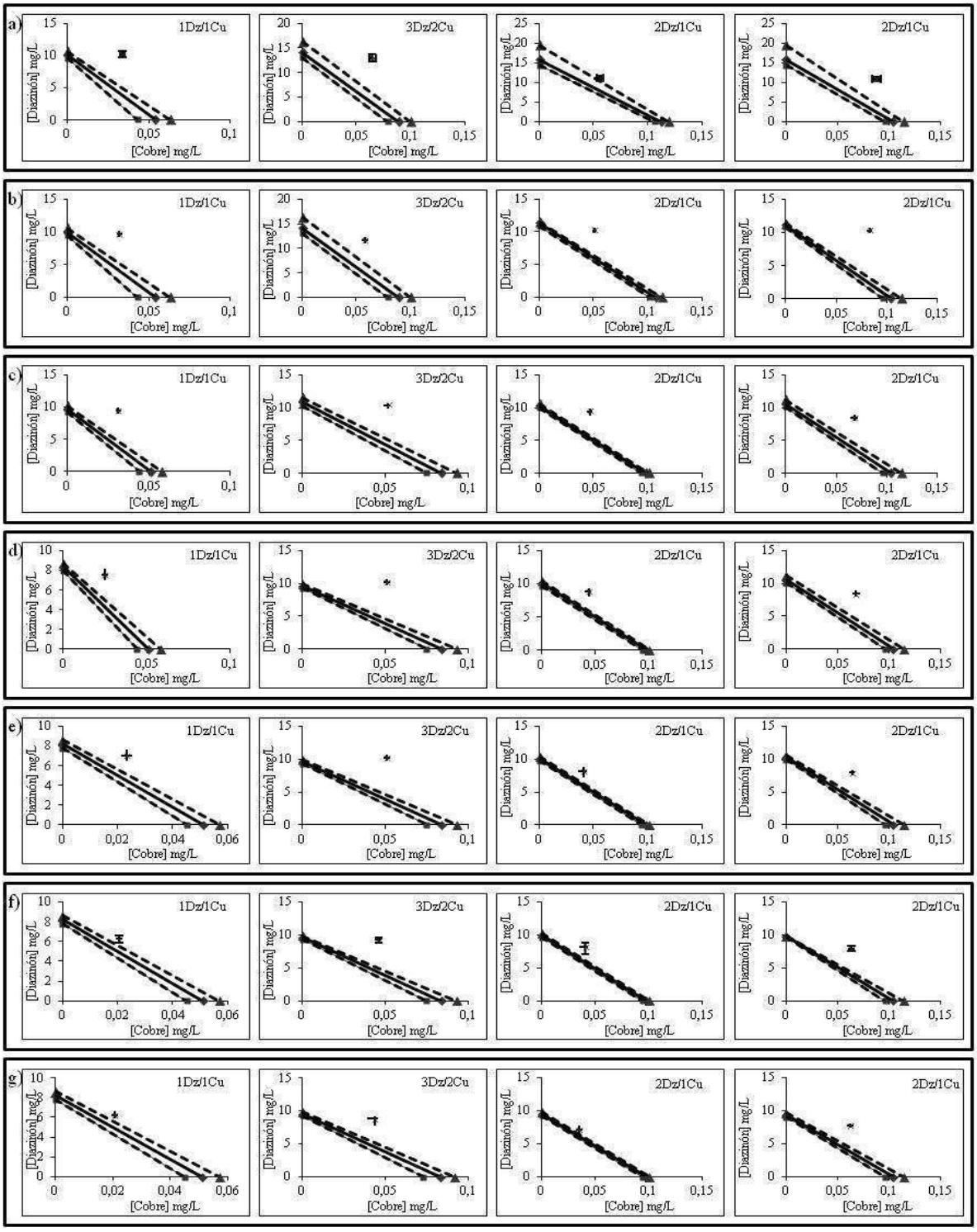


Figura 5.5: Isobologramas para las CL50, con sus intervalos de confianza (95%), de Cobre y Diazinón en forma individual, y de las mezcla binarias en tres proporciones diferentes (1 UT Diazinón/ 1 UT Cobre; 3 UT Diazinón/ 2 UT Cobre; 2 UT Diazinón/ 1 UT Cobre) sobre larvas de *R. arenarum* expuestas a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) por 168h. Exposición por (a) 24 h; (b) 48 h; (c) 72 h; (d) 96 h, (e) 120 h, (d) 144h y (f) 168 h.

5.4.5. Determinación de la toxicidad conjunta de Diazinón y Nonilfenol sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua a partir del estadio de Blástula (E.4) por 168h.

Los efectos letales de mezclas binarias de nonilfenol y Diazinón sobre embriones de *Rhinella arenarum* expuestos en forma continua por 168 h fueron evaluados mediante el protocolo ANFITOX. La toxicidad de la mezcla está representada mediante la CL50 de los tóxicos en forma individual y en comparación con sus respectivas CL50 en la mezcla, en los correspondientes isobologramas para cada tiempo de exposición.

Comparando la toxicidad en forma individual sobre los embriones de *Rhinella arenarum* (Capítulos 3 y 4), se observó que el nonilfenol resultó más toxico que el Diazinón, así la diferencia en la toxicidad fue de 23 a 21 veces a las 72 h y las 168 h de exposición, respectivamente, siendo la toxicidad de ambas sustancias tiempo dependiente, aumentando significativamente con el tiempo de exposición.

Simultáneamente se evaluó la toxicidad de la mezcla de ambos compuestos en diferentes proporciones sobre el desarrollo embrionario de *Rhinella arenarum.* Así, la interacción de las mezclas resultó en un patrón de adición, con algunas tendencias al sinergismo ($p<0,05$), principalmente en el periodo agudo, en las proporciones equitóxicas (1 UT Diazinón/1 UT Nonilfenol) y en aquella en la que el nonilfenol se encontraba en mayor medida que el Diazinón (1 UT Diazinón/2 UT Nonilfenol) (Tabla 5.5. y Figura 5.6.).

Tabla 5.5.: Toxicidad de mezclas binarias de Diazinón- Nonilfenol en tres proporciones diferentes (1 UT Diazinón/ 1 UT Nonilfenol; 2 UT Diazinón/ 1 UT Nonilfenol; 1 UT Diazinón/ 2 UT Nonilfenol) sobre embriones de *R. arenarum* expuestos a partir del estadio de blástula hasta finalizar su desarrollo (168h). Valor S= Índice de mezclas, sumatoria de las Unidades Tóxicas de las sustancias en la mezclas.

Tiempo de exposición (h)	**Relación de sustancias en la mezcla**	**Valor S**	**Interacción**
72	1Dz/1NP	0,86	Adición
	1Dz/2NP	0,99	Adición
	2Dz/1NP	0,91	Adición
96	1Dz/1NP	0,57	Sinergismo
	1Dz/2NP	0,74	Sinergismo
	2Dz/1NP	0,87	Adición
168	1Dz/1NP	1,14	Adición
	1Dz/1NP	0,84	Adición
	1Dz/2NP	1,01	Adición
	1Dz/2NP	0,67	Sinergismo

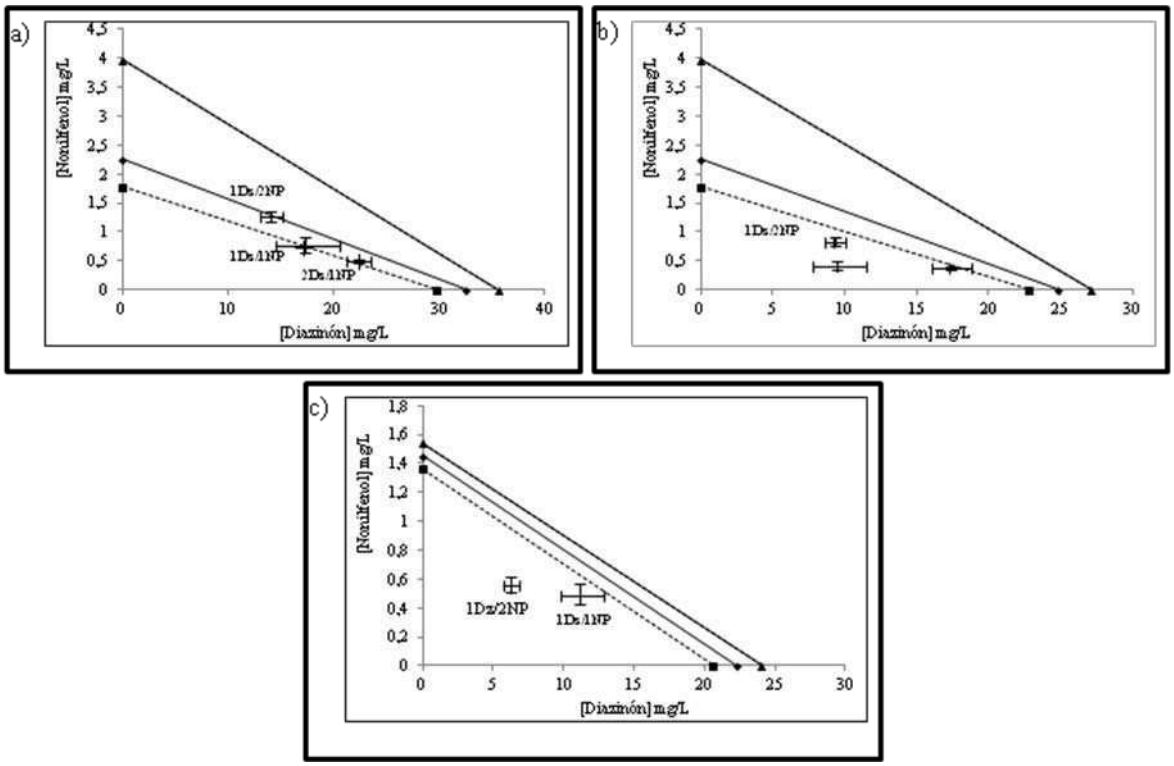


Figura 5.6.: Isobologramas para las CL50, con sus intervalos de confianza (95%), de Diazinón y Nonilfenol en forma individual, y de las mezcla binarias en tres proporciones diferentes (1 UT Diazinón/ 1 UT Nonilfenol; 2 UT Diazinón/ 1 UT Nonilfenol; 1 UT Diazinón/ 2 UT Nonilfenol) sobre embriones de *R. arenarum* tratados a partir de blástula. Exposición por (a) 72 h; (b) 96 h; (c) 168 h.

5.4.6. Determinación de la toxicidad conjunta de Diazinón y Nonilfenol sobre larvas de *Rhinella arenarum* expuestas en forma continua a partir del estadio de Opérculo completo (E.25) por 168h.

La letalidad de las larvas de *Rhinella arenarum* expuestas desde el inicio de su desarrollo (E.25) en forma continua por 168 h a una mezcla binaria de Diazinón y nonilfenol, también fue evaluada mediante el protocolo ANFITOX. La toxicidad de la mezcla está representada mediante la CL50 de los tóxicos en forma individual y en comparación con sus respectivas CL50 en la mezcla, en los correspondientes isobologramas para cada tiempo de exposición.

Comparando la toxicidad en forma individual sobre los embriones de *Rhinella arenarum* (Capítulos 3 y 4), se observó que si bien el nonilfenol fue también más tóxico que el Diazinón, esta diferencia fue menor que la observada en el del desarrollo temprano, tomando valores de 21,5 y 18 veces a las 72 h y 168 h, respectivamente.

Simultáneamente se evaluó la toxicidad de la mezcla de ambos compuestos en diferentes proporciones sobre las larvas de *Rhinella arenarum* al inicio del desarrollo larval. Así, la interacción de las diferentes mezclas mostró en forma general, una desviación significativa de la adición al sinergismo ($p<0,05$), principalmente durante el periodo agudo, de las primeras 72 h a 96 h. Sin embargo, la proporción en la que el nonilfenol se encuentra un poco por encima de la del insecticida (2 UT Diazinón/3 UT Nonilfenol), mostró ser mayoritariamente aditiva. Lo mismo se observó para las dos proporciones donde el Diazinón se encontraba en mayor relación al nonilfenol (3 UT Diazinón/ 2 UT Nonilfenol; 2 UT Diazinón/ 1 UT Nonilfenol) (Tabla 5.6 y Figura 5.7).

Tabla 5.6.: Toxicidad de las mezclas binarias de Diazinón-Nonilfenol en diferentes proporciones (1 UT Diazinón/ 1 UT Nonilfenol; 1 UT Diazinón/ 2 UT Nonilfenol; 2 UT Diazinón/ 3 UT Nonilfenol; 3 UT Diazinón/ 2 UT Nonilfenol; 2 UT Diazinón/ 1 UT Nonilfenol) sobre larvas de *R. arenarum* expuestas a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) por 168h. Valor S= Índice de mezclas, sumatoria de las Unidades Tóxicas de las sustancias en la mezclas.

Tiempo de exposición (h)	**Relación de sustancias en la mezcla**	**Valor S**	**Interacción**
72	1Dz/1NP	0,60	Sinergismo
	1Dz/2NP	0,68	Sinergismo
	2Dz/3NP	0,79	Sinergismo
	2Dz/1NP	0,81	Sinergismo
96	1Dz/1NP	0,67	Sinergismo
	1Dz/2NP	0,76	Sinergismo
	2Dz/3NP	0,90	Adición
	3Dz/2NP	0,85	Sinergismo
	2Dz/1NP	0,86	Sinergismo
120	1Dz/1NP	0,76	Sinergismo
	1Dz/2NP	0,86	Sinergismo
	2Dz/3NP	1,01	Adición
	3Dz/2NP	0,93	Adición
	2Dz/1NP	0,92	Adición
144	1Dz/1NP	0,76	Sinergismo
	1Dz/2NP	0,86	Sinergismo
	2Dz/3NP	1,01	Adición
	3Dz/2NP	0,90	Adición
168	1Dz/1NP	0,71	Sinergismo
	3Dz/2NP	0,94	Adición

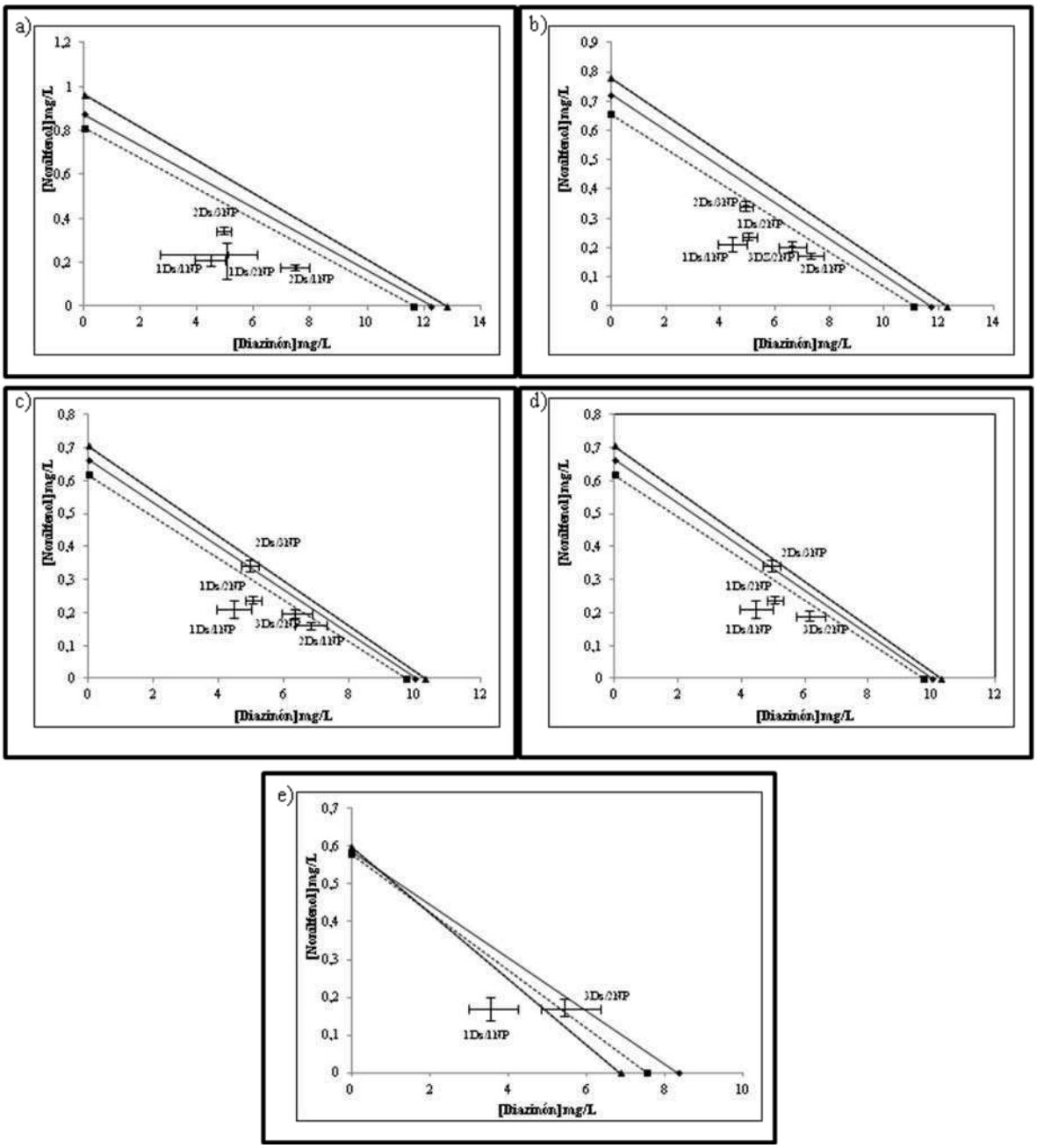


Figura 5.7.: Isobologramas para las CL50, con sus intervalos de confianza (95%), de Diazinón y Nonilfenol en forma individual, y de las mezcla binarias en diferentes proporciones (1 UT Diazinón/ 1 UT Nonilfenol; 1 UT Diazinón/ 2 UT Nonilfenol; 2 UT Diazinón/ 3 UT Nonilfenol; 3 UT Diazinón/ 2 UT Nonilfenol; 2 UT Diazinón/ 1 UT Nonilfenol) sobre larvas de *R. arenarum* expuestas a partir del estadio de Opérculo Completo (E.25) por 168h. Exposición por (a) 72 h; (b) 96 h; (c) 120 h; (d) 144 h y (e) 168 h.

5.5 Discusión.

En los últimos años ha tomado gran relevancia la observación de la fuerte declinación de las poblaciones de anfibios, y el aumento en la incidencia de las malformaciones presentes en los organismos a nivel mundial (Corn 1994; Houlahan y Findlay 2000). Se han considerado muchos factores para dilucidar el problema, la contaminación ambiental, particularmente las sustancias químicas derivadas de la agricultura, de la industria y otras actividades antrópicas han tomado considerable atención como causa potencial de dicha declinación. Asimismo, estas sustancias podrían estar actuando tanto en forma asilada como conjunta y pueden volver más vulnerables los individuos frente a otros posibles factores estresantes.

En línea con este panorama, los resultados del presente trabajo aportan una ampliación del conocimiento sobre la toxicidad y los posibles mecanismos subyacentes, de tres sustancias que en forma general intentan representar el espectro de los posibles contaminantes presentes en los cuerpos de agua: un metal, un pesticida, y un surfactante y derivado de las prácticas industriales y domésticas. Aunque generalmente se las encuentra juntas, lo cual aumenta la importancia de la evaluación de las interacciones entre ellas, también es oportuno el estudio individual de las mismas con el fin de obtener información específica de cada una de ellas.

Los anfibios, presentan distintas características como el típico ciclo de vida bifásico, el desarrollo embrio-larval en estanques, arroyos y lagunas temporales, generalmente asociados con aéreas agrícolas, donde escurren y se concentran las sustancias tóxicas liberadas al ambiente, que los ponen en íntimo contacto con el medio aumentando su susceptibilidad frente a la presencia de contaminantes (Mann *et al.* 2009; Wake y Vredenburg 2008). La mayoría de las especies se reproducen,y sus larvas se desarrollan, en primavera y verano, coincidiendo con la aplicación de pesticidas y fertilizantes. Presentan una alta permeabilidad en las branquias en algunos de los estadios del desarrollo embrionario y larval, así como la piel húmeda y la respiración cutánea que son más importantes que la respiración pulmonar en los adultos. A su vez, desde el punto de vista

metodológico, son fáciles de mantener y reproducir en el laboratorio, pudiéndose obtener un elevado número y alta homogeneidad de individuos en las puestas.

Más aún, la elección de *Rhinella arenarum* para la realización de los bioensayos, permite realizar informes ecotoxicológicos representativos de las posibles implicancias sobre los ecosistemas y las especies autóctonas de Argentina. Asimismo, la existencia de estudios morfológicos en anfibios de la parte media de Argentina, región dominada principalmente por la agricultura, que informa un alto grado de incidencia de malformaciones, especialmente en *R. arenarum* (Peltzer *et al.* 2010), nos lleva a estudiar el posible rol de la contaminación por estas sustancias químicas en este fenómeno.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la alta toxicidad del Cobre, sobre los otros dos compuestos orgánicos evaluados, asimismo, el Nonilfenol resultó más tóxico que el Diazinón sobre *Rhinella arenarum*. El cobre fue entre 820 y 1025 veces más tóxico que el insecticida entre las 72 h y 168 h de exposición, respectivamente, para la exposición durante el desarrollo embrionario; mientras que en el periodo del desarrollo larval varió entre 207 y 131 veces a las 24 h y 168 h, respectivamente. Al comparar la toxicidad del metal con el nonilfenol, la diferencia en la toxicidad fue de 37 y casi 50 veces a las 72 h y 168 h, respectivamente, durante el desarrollo embrionario, mientras que en el larval, el cobre resultó siete veces más tóxico que el nonilfenol. A su vez, el nonilfenol resultó más tóxico que el Diazinón, así la diferencia en la toxicidad fue de 23 a 21 veces a las 72 h y las 168 h, respectivamente, en la exposición desde el inicio del desarrollo larval, mientras que para la exposición durante el desarrollo larval, esta diferencia fue menor, tomando valores de 21,5 y 18 veces a las 72 h y 168 h, respectivamente.

A diferencia del Cobre, que resultó más tóxico durante el desarrollo embrionario, ambos compuestos orgánicos resultaron más tóxicos durante el período larval. Por otra parte, el metal causó mayor incidencia de malformaciones, con un Potencial Teratogénico (PT) de 2 en el periodo agudo. Mientras que para el mismo periodo, el Índice teratogénico (IT) del nonilfenol y el Diazinón fue de 1,08 y 1,52, respectivamente. El Diazinón causó importantes anomalías en el comportamiento, mientras que el nonilfenol causó además de severos efectos inespecíficos sobre la morfogénesis, la extrusión del extremo caudal del eje de la aleta fue la anomalía característica observada.

Con respecto a la toxicidad de las mezclas, en la mayoría de los estudios toxicológicos, sus efectos se predicen en base a resultados previos de las curvas concentración-respuesta de las sustancias individuales que componen la mezcla, y la potencial variación en la sensibilidad de los organismos no es considerada. Sin embargo, siempre es factible y esperable la variabilidad en la reproducibilidad entre los bioensayos si se considera la complejidad de los sistemas biológicos (Barata *et al.* 2006). A fin de tener en cuenta esta posible variación, para cada mezcla binaria, se evaluó la toxicidad de las diferentes mezclas y la de los componentes individuales simultáneamente. Así, tanto las proporciones de los tóxicos en las mezclas, como los índices fueron recalculados en función de la información obtenida en cada camada.

Los resultados de las interacciones de las mezclas obtenidos resaltan la importancia de la evaluación en relación a la predicción de las mismas. En una revisión de casi mil trabajos sobre mezclas de sustancias químicas, Ross y Wame (1997) demostraron que entre el 20 y 25% de las mezclas presentan una desviación hacia el sinergismo o antagonismo. Por otro lado, se ha planteado la alta probabilidad de encontrar desviaciones de la adición cuando los compuestos de una mezcla presentan diferentes mecanismos de toxicidad (van der Geest *et al.* 2000). Sin embargo, al utilizar la mortalidad como punto de evaluación final, los efectos de la mezcla probablemente sean el resultado de alteraciones en una gran variedad de procesos en el organismo, causadas tanto por los efectos específicos, como no específicos de los compuestos individuales (Hermens *et al.* 1985).

Los resultados obtenidos demuestran que la exposición de *Rhinella arenarum* a mezclas de cobre y Diazinón tanto desde el inicio del desarrollo embrionario como desde el inicio del desarrollo larval no solo produce efectos adversos, sino que la interacción de las sustancias resulta en una desviación de la adición hacia el antagonismo.

Esta interacción resultó independiente del tiempo y de la relación de los contaminantes para las larvas expuestas desde el inicio de su desarrollo. En el caso del desarrollo embrionario, salvo para la exposición en la que el metal duplica la relación con el insecticida únicamente desde las 72 h hasta las 120 h no se encontró una diferencia significativa con lo esperado para la adición. Sin embargo, tanto para esta proporción desde

las 144 h hasta las 168 h, como para las restantes fue claramente antagónica incluso a lo largo del tiempo de exposición.

La desviación de la adición para el caso del cobre y el Diazinón si bien no es inesperada dado que los mecanismos de toxicidad primarios de las sustancias son diferentes, no pueden ser excluidos los mecanismos de acción secundarios. Incluso, no solo los insecticidas organofosforados, como el Diazinón, son capaces de inhibir la acetilcolinesterasa, sino que también puede observarse por exposición a metales (Olson y Christensen 1980). La complejidad en los efectos de las posibles interacciones entre los metales y los insecticidas organofosforados ha demostrado que los resultados de los mismos pueden variar dependiendo del nivel de efecto evaluado (Flammarion *et al.* 1996). Sin embargo, los resultados obtenidos para la interacción de estas sustancias están en línea con otros estudios sobre la toxicidad conjunta del cobre y el Diazinón en *Ceriodaphnia Dubia* y en larvas de *Ephoron virgo*, los cuales también informan una desviación de la adición hacia el antagonismo, independientemente del nivel de efecto evaluado (Banks *et al.* 2003; van der Geest *et al.* 2000).

Respecto a la interacción en la toxicidad de la mezcla entre el cobre y el nonilfenol sobre embriones de *Rhinella arenarum*, también se encontró como patrón general una desviación de la adición hacia el antagonismo, si bien esta respuesta podría ser esperable debido a que presentan mecanismos de acción primarios diferentes, no se podría descartar la existencia de otro tipo de respuesta ya que las sustancias comparten ciertos mecanismos de toxicidad, como la disrupción endocrina (Handy 2003).

Contrariamente a lo observado para la mezcla del metal con el insecticida, la interacción del cobre y el nonilfenol durante el desarrollo embrionario resultó independiente del tiempo de exposición y de las proporciones de las dos sustancias en la mezcla. Sin embargo, para el desarrollo larval aunque la suma de las unidades tóxicas de la CL50 de la mezcla siempre fue mayor a uno, para algunas proporciones, donde el cobre se encontraba en mayor proporción al nonilfenol, esta diferencia no fue significativa para superar la adición. No se observó el mismo comportamiento para la proporción en que el metal quintuplicaba la relación con el orgánico, que resultó claramente antagónica para todos los tiempos evaluados. Hasta el momento no se registran trabajos que evalúen la

toxicidad de la mezcla binaria del cobre y del nonilfenol, si bien un estudio sobre bivalvos en mezcla ternaria de los compuestos junto con el metil mercurio, informó una respuesta mayor a la aditiva (Faria *et al.* 2010).

Es importante remarcar que el tipo de interacción puede variar en función de las diferentes proporciones de los tóxicos utilizadas en las mezclas, motivo por el cual en este trabajo se ensayaron distintas proporciones de los tóxicos, tratando de abarcar el mayor rango posible. Aunque se observaron algunas interacciones del tipo aditivas, como patrón general, ambas sustancias orgánicas ensayadas en mezclas binarias con el cobre resultaron en interacciones antagónicas.

Por otro lado, es fundamental destacar que independientemente de los efectos antagónicos de las mezclas, la toxicidad de la combinación de las sustancias siempre resultó mayor que la de los compuestos individuales.

A diferencia de lo previamente observado, las diferentes mezclas de las dos sustancias orgánicas sobre *Rhinella arenarum* presentaron principalmente un comportamiento entre aditivo y sinérgico, con una diferencia marcada entre los períodos embrionario y el larval. De esta forma, las mezclas resultaron principalmente en un patrón de adición, con algunas tendencias al sinergismo, principalmente en el periodo agudo durante el desarrollo embrionario. En el caso de la exposición larval, la interacción de las diferentes mezclas mostró en forma general, una desviación significativa de la adición al sinergismo, principalmente durante el periodo agudo.

Al igual que para las otras mezclas ensayadas, resulta impreciso aventurar un resultado de la interacción basados en los mecanismos de toxicidad de los compuestos, ya que si bien no comparten los principales mecanismos, ha sido demostrado que el nonilfenol es un disruptor endócrino, mientras que existen algunos indicios de que el Diazinón podría también inducir disrupción endocrina en mamíferos (Bevan *et al.* 2003; Sheffield 1996). Si bien no se encontraron trabajos publicados que evaluaran la interacción del insecticida Diazinón con nonilfenol, los resultados observados son de gran relevancia para la evaluación del riesgo ambiental, no solo por los niveles de ambas sustancias presentes en el ambiente sino porque el nonilfenol es comúnmente utilizado como agente humectante y

dispersante en las formulaciones de muchos plaguicidas. Asimismo, varios trabajos han informado un aumento en la toxicidad de los formulados comerciales en comparación con el ingrediente activo correspondiente, este aumento ha sido relacionado tanto con la toxicidad intrínseca del surfactante como con la posible interacción del mismo con el ingrediente activo (Aronzon *et al.* 2011a; Mann y Bidwell 2000).

Tanto el antagonismo como el sinergismo observados en las mezclas son el resultado de la interacción entre las sustancias presentes en las mismas, de forma tal que podrían alterarse las tasas de incorporación, disponibilidad y/o procesos fisiológicos como el metabolismo, transporte o excreción de las sustancias; por lo que sería necesario otro tipo de estudios para arribar a una conclusión clara al respecto.

Este trabajo destaca la importancia de evaluar la toxicidad de los agentes fisicoquímicos ambientales en diferentes etapas del desarrollo temprano del ciclo de vida de los organismos no solo en forma aislada sino también en mezclas a fin de comprender mejor su potencial impacto en los ecosistemas.

Conclusiones generales

La exposición de *Rhinella arenarum* a metales como el cobre, a sustancias orgánicas del tipo de los alquilfenoles como el Nonilfenol y a insecticidas organofosforados como el Diazinón causó importantes efectos tóxicos letales y subletales sobre las etapas tempranas de su ciclo de vida.

El cobre resultó ser altamente tóxico sobre los embriones y larvas de *Rhinella arenarum*, tanto como consecuencia de la exposición continua como por pulsos de 24 h demostrando asimismo una susceptibilidad estadio-dependiente al metal.

El valor de la CL50 de cobre para los embriones y larvas expuestos en el periodo crónico corto (168 h) fue de 19,5 µg Cu^{2+}/L y 51 µg Cu^{2+}/L, respectivamente.

Los embriones en los estadios de blástula y gástrula mostraron la más alta resistencia al cobre, mientras que los estadios organogénicos fueron los más susceptibles. El estadio de Circulación Branquial presentó la CL50 más baja con un valor de 17 µg Cu^{2+}/L. A partir del estadio de Pliegue Opercular la resistencia al metal fue aumentando gradualmente hasta alcanzar valores similares a los obtenidos para blástula y gástrula.

La toxicidad del cobre por exposición continua de larvas tempranas (E.25) alcanzó su valor máximo durante las primeras 24 h no mostrando cambios significativos por exposición crónico corta.

El cobre produjo efectos subletales muy importantes, con un Potencial Teratogénico (PT = NOEC letalidad/NOEC malformaciones) para el tratamiento continuo desde blástula, hasta el inicio del desarrollo larval, de 2, considerando que valores mayores a 1,5 implican un alto riesgo de obtener individuos malformados sin efectos letales significativos.

La evaluación de parámetros de defensa antioxidante en embriones y larvas de *Rhinella arenarum* expuestos al cobre confirmó el carácter pro-oxidante del metal. Para las larvas tempranas la vía antioxidante más importante es la inducción en la superóxido

dismutasa (SOD) y una tendencia al aumento de la actividad de la glutation-S-transferasa (GST).

En cuanto a la susceptibilidad diferencial al cobre de las larvas de *Rhinella arenarum* provenientes de sitios con distinto grado de contaminación del Río Reconquista se observó que las larvas provenientes de las zonas vecinas al canal aliviador (CA) fueron significativamente más sensibles que las larvas provenientes tanto del último tramo del Río Reconquista (RR), como del parque industrial de Tigre (PI), lo que se relacionó con la mayor carga contaminante de los últimos dos sitios.

La sensibilidad de *Rhinella arenarum* comparada con la de *Rhinella fernandezae*, ambos sapos dominantes en la Pcia. de Bs As. por exposición a cobre dependió del sitio de muestreo de las camadas. Sin embargo, la toxicidad para los embriones de *R. arenarum* se mantuvo constante desde el periodo agudo al crónico corto, para *R. fernandezae* en todos los casos se registró un aumento significativo de la susceptibilidad al extender la exposición, lo que podría sugerir una diferencia en el mecanismo de acción y/o la tasa de incorporación del metal entre ambas especies.

En comparación con otros anfibios, la susceptibilidad de *R. arenarum* resultó hasta 6 veces mayor que la especie más susceptible informada. Asimismo, el valor de riesgo ecológico obtenido en función de valores ambientales en cuerpos de agua en Argentina resultó siete veces más alto que el valor límite estipulado para considerar la existencia de un potencial riesgo.

El nonilfenol resultó la segunda sustancia más tóxica de las estudiadas. En cuanto a los efectos letales, la susceptibilidad de los organismos expuestos desde el inicio del desarrollo embrionario mostró ser tiempo-dependiente disminuyendo significativamente al extender la exposición. Así, la CL50-168h de la exposición desde el inicio del desarrollo embrionario fue de 0,96 mg Nonilfenol/L, al alcanzar las 336 h, hubo un incremento de la susceptibilidad (CL50-336h=0,17 mg nonilfenol/L), lo que podría deberse a que al aumentar el tiempo de exposición quedó comprendido el desarrollo larval, el más susceptible. El mismo patrón de respuesta se obtuvo para la exposición a octilfenol, en el que hubo un aumento en la susceptibilidad al pasar de embriones a larvas de casi 30 veces

(CL50-24h=16 mg octilfenol/L a una CL50-336h=0,58 mg octilfenol/L). Comparativamente, para los embriones de *R. arenarum*, el nonilfenol fue más tóxico que el octilfenol.

La toxicidad del nonilfenol por exposición continua desde el inicio del desarrollo larval (E.25) por 168 h resultó más sensible y tuvo un patrón diferente que el de los embriones. La toxicidad tuvo su pico en el periodo agudo (CL50-72 h=0,37 mg nonilfenol/L) no mostrando cambios significativos a lo largo de las 168 h. Sin embargo, al cronificar la exposición de las larvas por 48 días, hubo un aumento significativo en la susceptibilidad (CL50=0,11 mg nonilfenol/L), casi tres veces mayor que a las 24 h. La toxicidad del octilfenol, también fue tiempo-dependiente, aumentando hasta casi 6 veces (CL50-48 días=0,07 mg octilfenol/L). Para el caso de la exposición a partir del periodo larval no se encontraron diferencias significativas entre la toxicidad de ambas sustancias.

Comparativamente *R. arenarum* resultó mucho más sensible al nonilfenol que la mayoría de los anfibios. Así, el riesgo ecológico obtenido en función de valores ambientales resultó 14 veces más alto que el valor estipulado para considerar la existencia de un potencial riesgo.

El Diazinón, insecticida organofosforado, tuvo efectos tóxicos sobre embriones y larvas de *Rhinella arenarum*, si bien de las tres sustancias evaluadas fue la que rindió menor toxicidad.

La exposición al insecticida de embriones desde el inicio de su desarrollo resultó ser tiempo-dependiente con una CL50-168 h de 20 mg Diazinón/L. Cuando se extendió la exposición por 504 h la toxicidad siguió aumentando significativamente hasta alcanzar una CL50 de 6,84 mg Diazinón/L, entre 4 y 3 veces más sensibles que en el periodo agudo y crónico corto, respectivamente.

A su vez, se observó una diferencia importante entre las concentraciones que producen letalidad con las que causan teratogénesis. El insecticida provocó efectos subletales importantes en los embriones expuestos desde el inicio de su desarrollo, así, el índice teratogénico (IT=CL50/CE50), resultó en 1,5 y 1,7 a las 96 h y 144 h, respectivamente, mientras que el potencial teratogénico (PT) resultó mayor a 2 a las 168 h.

Los efectos subletales sobre el comportamiento fueron registrados aún a menores concentraciones que las que produjeron malformaciones. Así la relación CL10 / NOEC para alteraciones en el comportamiento, fue casi de 4 para las primeras 96 h, siendo el valor NOEC de alteraciones en el comportamiento, la concentración de exposición más baja ensayada. Esto implica un alto riesgo para los individuos de sufrir alteraciones en el comportamiento en ausencia de una letalidad significativa. Las alteraciones en el comportamiento, que coincidieron con los patrones descriptos de neurotoxicidad, a bajas concentraciones o a tiempos cortos se expresaron como hiperquinesia, o movimientos espasmódicos, pero a concentraciones mayores o tiempos prolongados de exposición, resultaron en falta de movimiento y respuesta a los estímulos.

La toxicidad del Diazinón para las larvas tratadas desde el comienzo de su desarrollo por 168 h también demostró ser tiempo-dependiente, con una CL50-168 h de 6,7 mg Diazinón/L. Cuando se extendió la exposición por 504 h la toxicidad siguió aumentando significativamente hasta alcanzar un valor máximo de toxicidad (CL50= 1,92 mg Diazinón/L), entre 4 y 3,5 veces más sensibles que en el periodo agudo y crónico corto, respectivamente. En el caso de las larvas tratadas desde E.25, también se observaron efectos subletales sobre el comportamiento, asociados al efecto neurotóxico. En cuanto a la letalidad las larvas resultaron particularmente más sensibles que los embriones, así el perfil de toxicidad mostró una susceptibilidad entre 3 a 4,4 veces superior. Esto estaría relacionado al aumento de la actividad de la acetilcolinesterasa, blanco principal del insecticida, en el desarrollo de *R. arenarum*.

La incorporación del insecticida mostró un efecto concentración-dependiente, disminuyendo al aumentar el tiempo de exposición. Por otro lado, la incorporación del Diazinón fue marcadamente estadio-dependiente entre 1 y 27 veces mayor en exposiciones tempranas desde el inicio del desarrollo embrionario que las exposiciones desde larvas tardías. Esto estaría relacionado con la lipofilicidad del Diazinón y la alta composición de lípidos del vitelo de los embriones, que se va consumiendo a medida que avanza el desarrollo.

Los Factores de Bioconcentración (FBC) del Diazinón para embriones tuvieron valores de hasta 107 a las 96 h, los que resultaron considerablemente altos si se los compara con los valores informados para otras especies.

El riesgo ecológico del Diazinón calculado a partir de un valor ambiental esperado de exposición, fue 2,73 veces más alto que el valor estipulado para considerar la existencia de un potencial riesgo.

Con respecto a los resultados obtenidos por exposición a mezclas, se observó que la toxicidad conjunta de cobre y Diazinón tanto para los embriones como para las larvas de *Rhinella arenarum* resultó en un patrón general de desviación de la adición hacia el antagonismo, independiente del tiempo de exposición y las proporciones. A pesar de los efectos antagónicos de las mezclas, la toxicidad de la combinación de las sustancias siempre resultó mayor que la de los compuestos individuales.

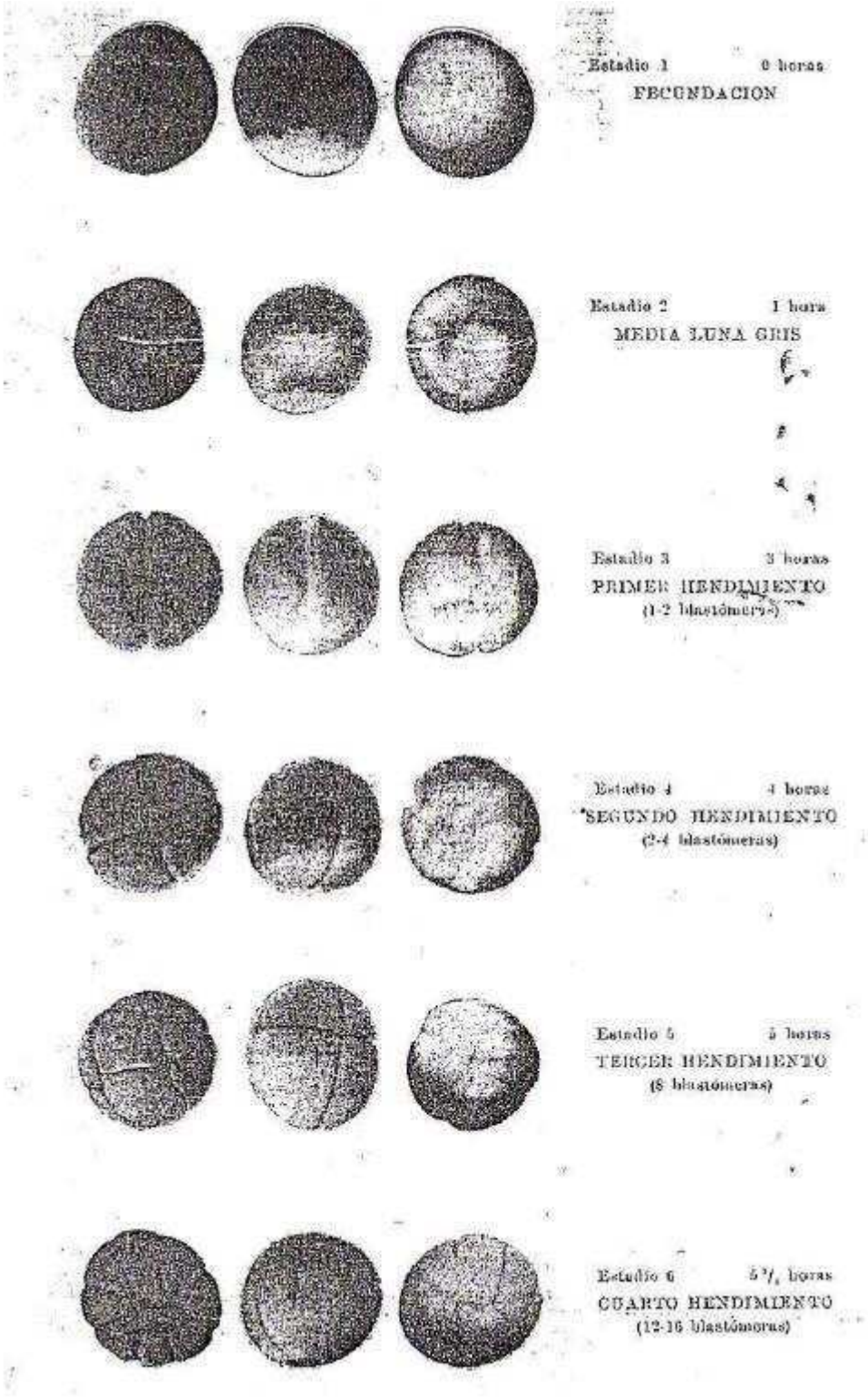
Con respecto a la interacción en la toxicidad de la mezcla entre el cobre y el nonilfenol sobre embriones de *Rhinella arenarum*, también se encontró como patrón general una desviación de la adición hacia el antagonismo. La interacción del cobre y el nonilfenol durante el desarrollo embrionario resultó independiente del tiempo de exposición y de las proporciones de las dos sustancias usadas en la mezcla. Sin embargo, para el desarrollo larval aunque la suma de las unidades tóxicas de la CL50 de la mezcla siempre fue mayor a uno, para algunas proporciones esta diferencia no fue significativa para superar la adición.

Las diferentes mezclas del Diazinón y el nonilfenol sobre *Rhinella arenarum* presentaron principalmente un comportamiento entre aditivo y sinérgico, con una diferencia marcada entre el período del desarrollo embrionario y el larval. En el desarrollo embrionario, las mezclas resultaron principalmente en un patrón de adición, con algunas tendencias al sinergismo, principalmente en el periodo agudo. En el caso de la exposición en el desarrollo larval la interacción de las diferentes mezclas mostró en forma general, una desviación significativa de la adición al sinergismo, principalmente durante el periodo agudo.

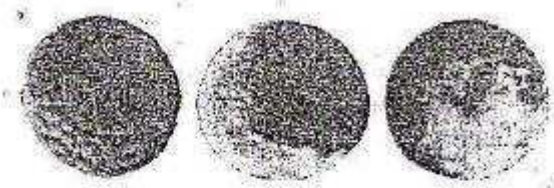
Este trabajo destaca la importancia de evaluar la toxicidad de los compuestos químicos en diferentes etapas del desarrollo, y no solo en forma aislada, sino también en mezclas a fin de comprender mejor su potencial impacto en los ecosistemas. También demuestra la importancia de evaluar los efectos subletales como parámetro de riesgo, ya que si bien estos efectos no son directos sobre la sobrevida, a lo largo del tiempo pueden expresarse en un número significativo de organismos malformados o con alteraciones en el comportamiento que ven disminuido su fitness, poniendo en riesgo la continuidad de las especies.

ANEXO

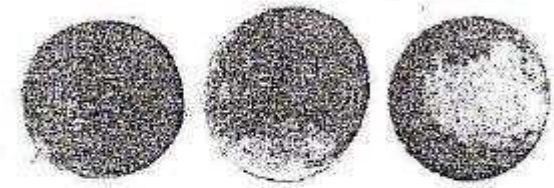
Desarrollo embrio-larval de *Rhinella [Bufo] arenarum*
A. Serie tipo de los primeros estadios embrionarios en
Bufo arenarum (Del Conte, E., Sirlin, J.L., 1951. Acta Zool. Lilloana XII, 497-501)



Estadio 7 6 ½ horas
QUINTO HENDIMIENTO
(24-32 blastómeros)

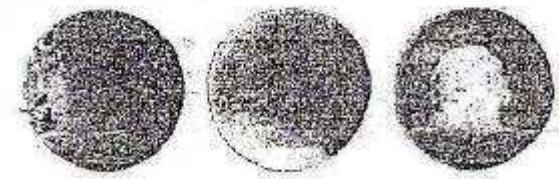


Estadio 8 12 horas
BLASTULA MEDIA

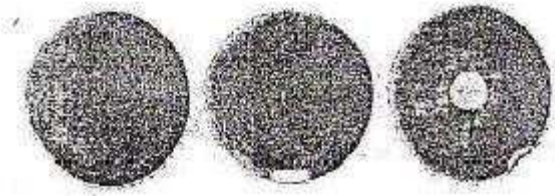


Estadio 9 18 horas
BLASTULA TARDIA

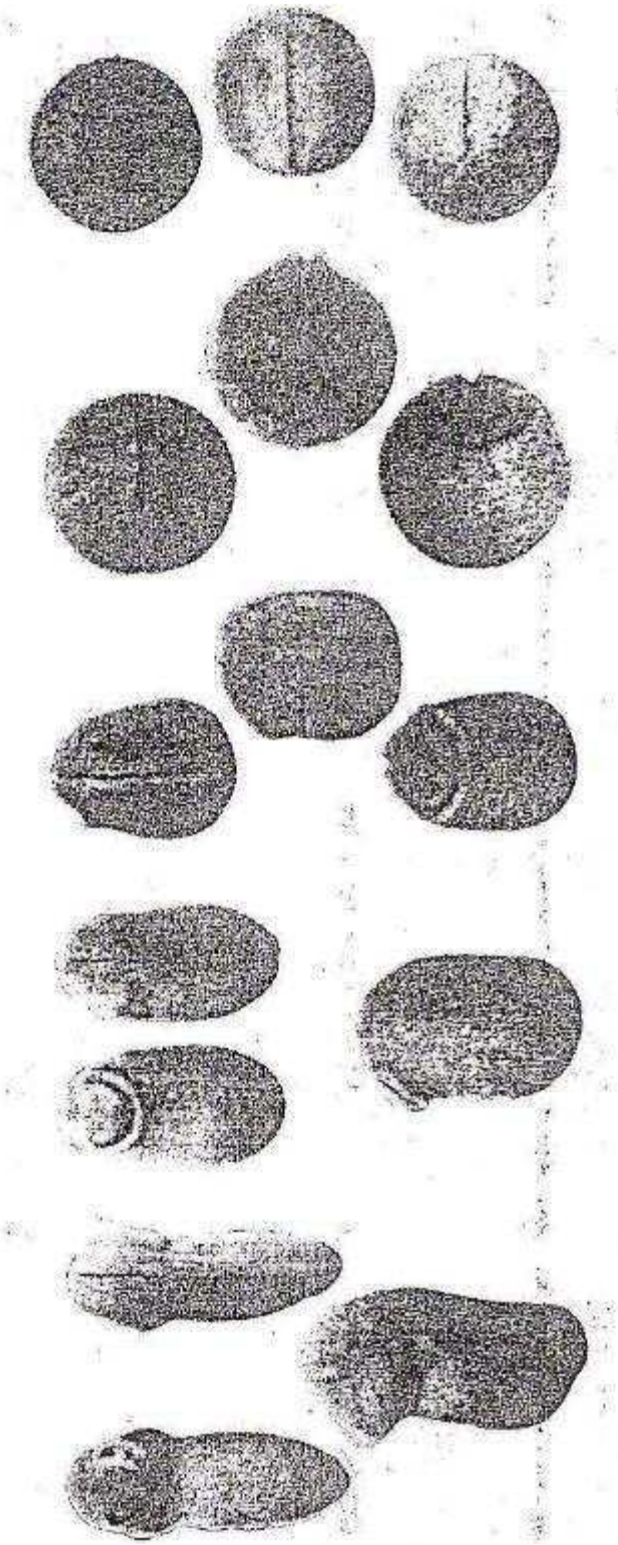
Estadio 10 22 horas
LABIO DORSAL
DEL BLASTOPORO



Estadio 11 27 horas
GASTRULA MEDIA



Estadio 12 34 horas
GASTRULA TARDIA



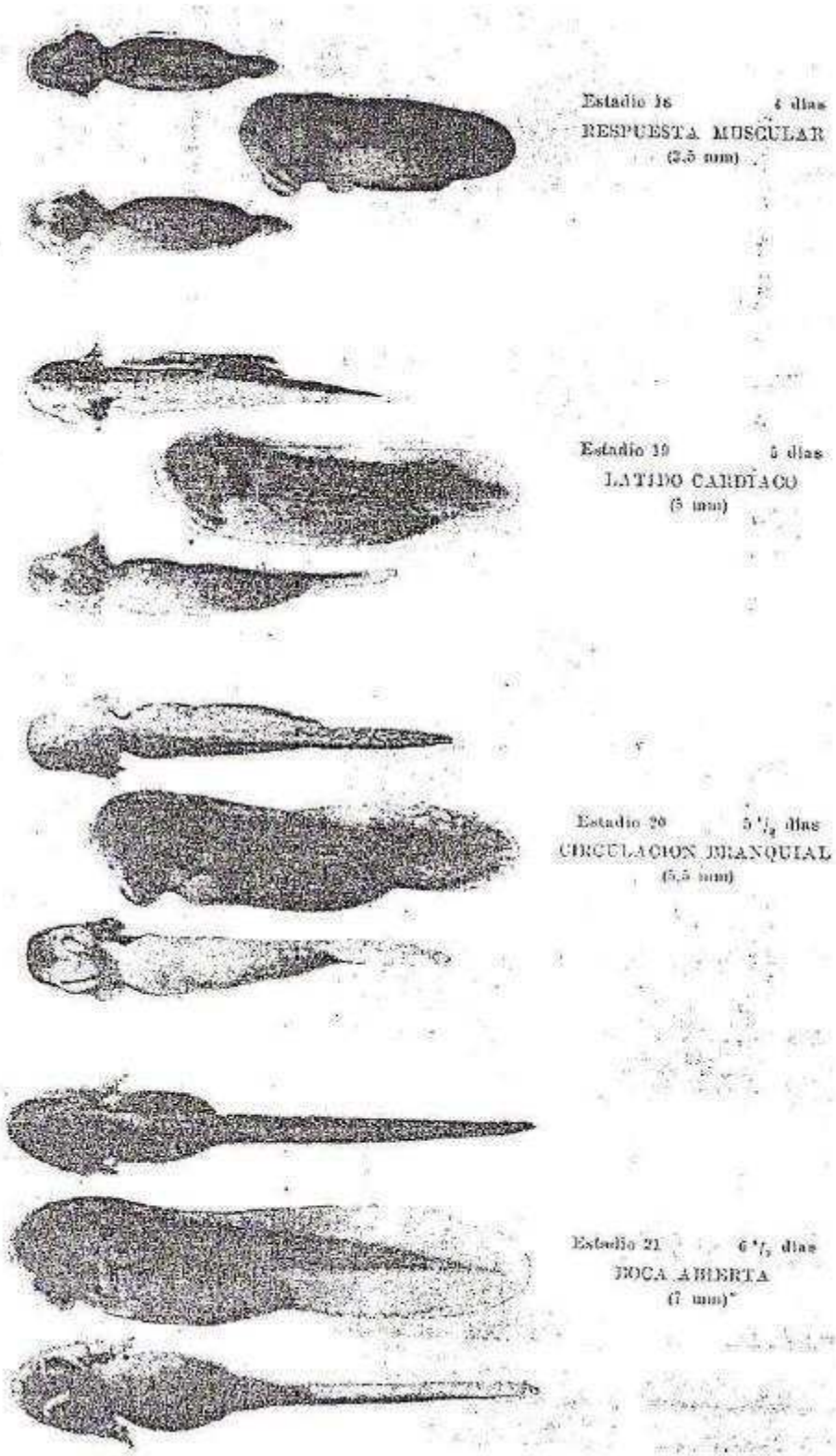
Estadio 13 44 horas
PLACA NEURAL

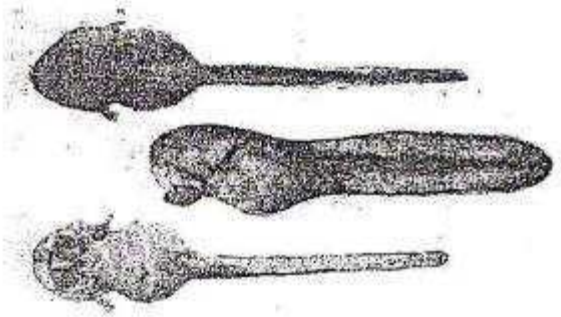
Estadio 14 54 horas
SURCO NEURAL

Estadio 15 59 horas
ROTACION

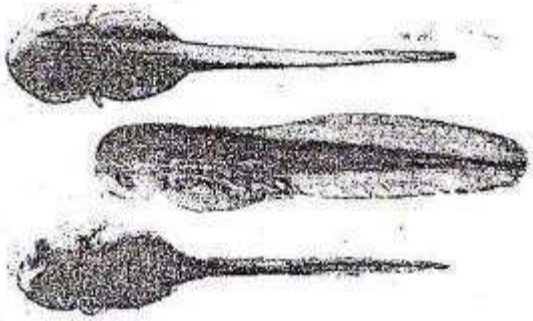
Estadio 16 64 horas
TUBO NEURAL

Estadio 17 76 horas
BROTE CAUDAL

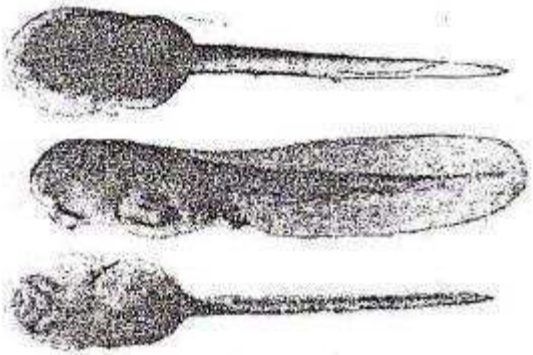

Estadio 18 4 días
RESPUESTA MUSCULAR
(2,5 mm)
Estadio 19 5 días
LATIDO CARDIACO
(5 mm)
Estadio 20 5 ½ días
CIRCULACION BRANQUIAL
(5,5 mm)
Estadio 21 6 ½ días
BOCA ABIERTA
(7 mm)



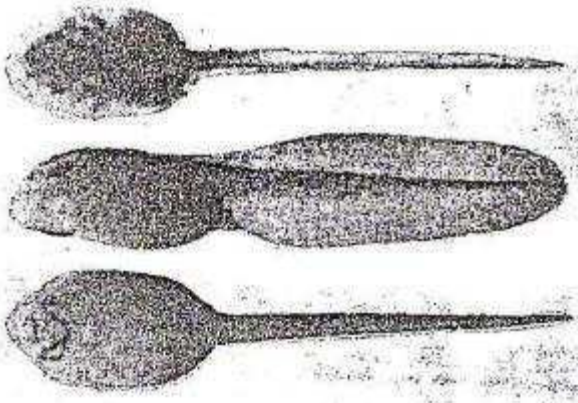
Estadio 22 7 ½ días
CIRCULACION
EN LA ALETA DE LA COLA
(7,5 mm)



Estadio 23 8 días
PLIEGUE OPERCULAR
(8 mm)



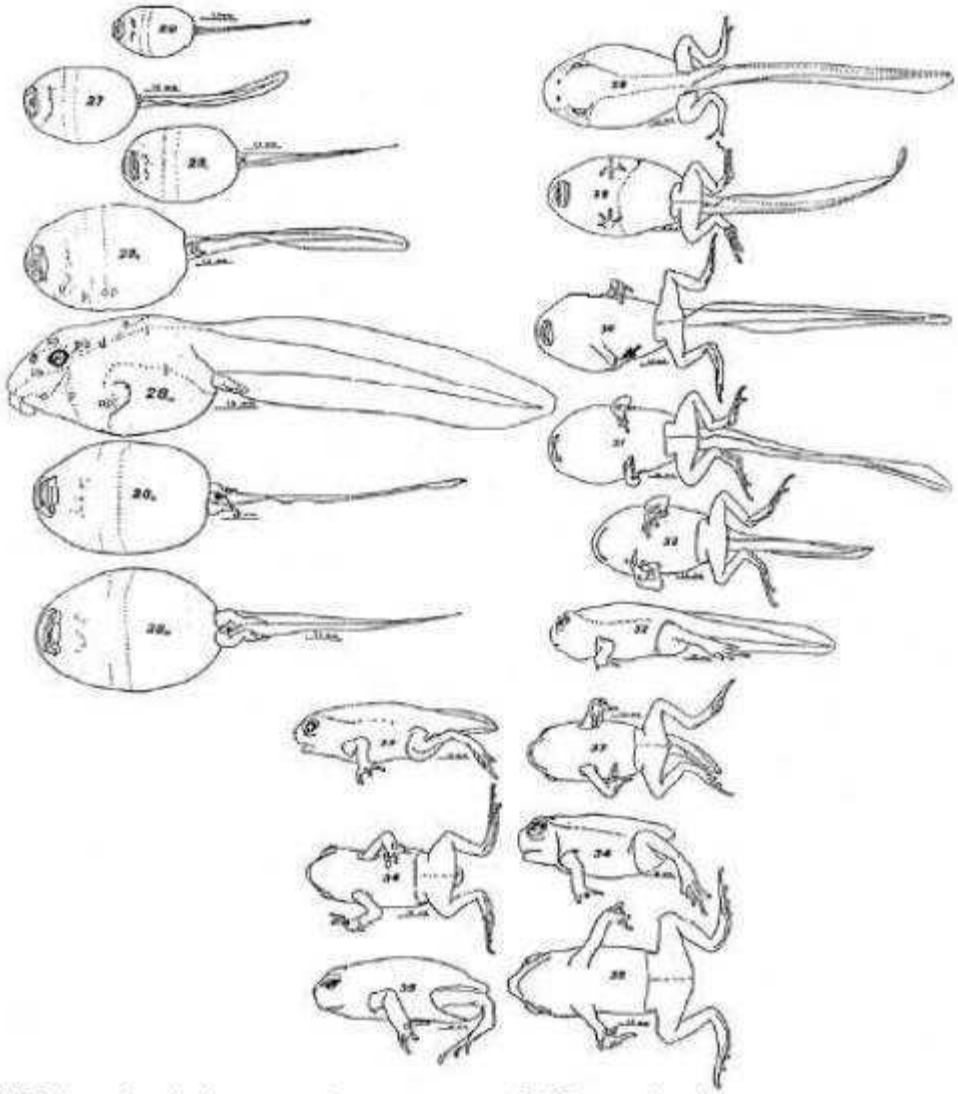
Estadio 24 9 ½ días
OPERCULO CERRADO
EN LA DERECHA
(9 mm)



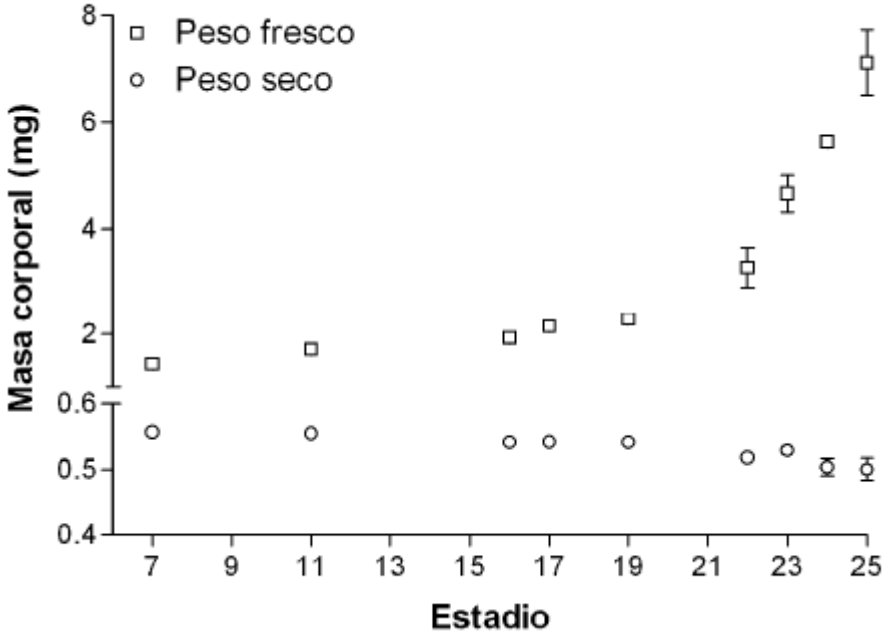
Estadio 25 11 días
OPERCULO COMPLETO
(10 mm)

Estadios de la metamorfosis en *Bufo arenarum* (Anura)

(Echeverria, D.D., Fiorito de Lopez, L.E., 1981. Physis (Bs.As.) B 40, 15-23.



26. Esbozo de miembros posteriores
27. Muñones de miembros posteriores
28. Desarrollo de miembros posteriores
29. Miembros posteriores desarrollados
30. Aparición primer miembro anterior
31. Cuarto miembro
32. Cola en reducción
33. Cola y aleta en reducción
34. Muñón caudal
35.Juvenil



Variaciones de la masa corporal (peso fresco y peso seco) a lo largo del desarrollo embrionario de *R. arenarum*. Se evidencia un aumento en el peso fresco que estaría dado por un aumento en el contenido de agua en las cavidades corporales que se desarrollan, principalmente, a partir del E.21 (estadio de boca abierta). Obtenido de "Sztrum. (2010). Susceptibilidad diferencial al Níquel en distintos estadios del desarrollo embrio-larval de *Rhinella (Bufo) arenarum.* Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental. Buenos Aires, Universidad Nacional de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. **Doctorando**."

Bibliografía

Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." Methods in Enzymology 105: 121-126.

Alam, M. K. y Maughan, O. E. (1993). "Acute toxicity of selected organophosphorus pesticides to Cyprinus carpio and Barilius vagra." J. Environ. Sci. Health B28: 81-89.

Albanis, T. A., Hela, D. G., Sakellarides, T. M. y Konstantinou, I. K. (1998). "Monitoring of pesticide residues and their metabolites in surface and underground waters of Imathia (*N. Greece*) by means of solidphase extraction disks and gas chromatography." Journal of Chromatography A 823: 59-71.

Alberts, E., Kalverboer, A. y Hopkins, B. (1983). "Mother infant dialog in the first days of life an observational study during breast-feeding." J Child Psychol Psychiatry Allied Discip 24: 145-61.

Altenburger, R., Nendza, M. y Schuurmann, G. (2003). "Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships." Environ. Tox. and Chem 22(8): 1900-1915.

AmphibiaWeb. "Information on Amphibian Biology and Conservation. http://amphibiaweb.org." 2011.

Anderson, M. E. (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods in Enzymology. M. Alton, Academic Press**:** 548-555.

Anderson, P. D. y Weber, L. J. (1975). The toxicity to aquatic populations of mixtures contaning certain heavy metals., Proceedings og International Conference on Heavy Metals in the Environment. Toronto, Canada, October 27-31, 1975. Vol2, part 2, 933-953.

Anguiano, O. L., Montagna, C. M., Chifflet de Llamas, M., Guana, L. y Pechen de D'Angelo, A. M. (1994). "Comparative toxicity of parathion in early embryos and larvae of the toad, *Bufo arenarum* Hensel." Bull. Environ.Contam. Toxicol. 52: 649-655.

APHA (1980). Standard methods for the examination of water and wastewater.15° Ed. Washington, DC, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution. Control Federation. (Pág.1134).

Argentina Mining. (2010). "El cobre en Argentina: la oportunidad dorada para la minería argentina." 2012, from http://www.argentinamining.com/es/el-cobre-en-argentina-la-oportunidad-dorada-para-la-mineria-argentina/.

Aronzon, C., Sandoval, M., Herkovits, J. y Pérez-Coll, C. (2011a). "Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*." Environ Toxicol 26(4): 373-381.

Aronzon, C. M., Sandoval, M. T., Herkovits, J. y Pérez-Coll, C. S. (2011b). "Stage-dependent susceptibility to copper in *Rhinella arenarum* embryos and larvae." Environ Tox and Chem 30 (12): 2771-2777.

Arukwe, A., Thibaut, R., Ingebrigtsen, K., Celius, T., Goksøyr, A. y Cravedi, J. P. (2000). "In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (Salmo salar)." Aquatic Toxicology 49(4): 289-304.

ASTM (1993a). Standard guide for conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX).American Society for Testing and Materials. Standards on Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. Philadelphia, PA. 11.04**:** 1199-1209.

ASTM (1993b). Standard guide for conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX).American Society for Testing and Materials. Standards on Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. Philadelphia, PA

Aydın, R. y Köprücü, K. (2005). "Acute toxicity of diazinon on the common carp (*Cyprinus carpio L*.) embryos and larvae." Pestic. Biochem. Physiol 82: 220-225.

Backhaus, T., Alterburger, R., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M. y Grimme, L. H. (2000). "Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilary acting chemicals to *vibrio fischeri*." Environ Tox and Chem 19(9): 2348-2356.

Banks, K., Wood, S., Matthews, C. y Thuesen, K. (2003). "Joint acute toxicity of diazinon and copper to *Ceriodaphnia dubia*." Environ Tox and Chem 22(7): 1562-7.

Bantle, J. A., Dumont, J. N., Finch, R. y Linder, G. (1992). Atlas of abnormalities: a guide for the performance of FETAX. O. S. P. Department Oklahoma

Barata, C., Baird, D. J., Nogueira, A. J. A., Soares, A. M. V. M. y Riva , M. C. (2006). "Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment." Aquatic Toxicology 78: 1-14.

Bavcon, M., Trebše, P. y Zupancˇicˇ-Kralj, L. (2003). "Investigations of the determination and transformations of diazinon and malathion under environmental conditions using gas chromatography coupled with a flame ionisation detector." Chemosphere 50: 595-601.

Beauchamp, C. y Fridovich, I. (1971). "Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels." Analytical Biochemistry 44(1): 276-287.

Beauvais, S. L., Jones, S. B., Brewer, S. K. y Little, E. E. (2000). "Physiological measures of neurotoxicity of Diazinon and Malathion to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their correlation with behavioral measures." Environ Tox and Chem 19(7): 1875-1880.

Bernardini, G., Prati, M. y Gornati, R. (2005). "FETAX, a versatile tool in toxicology, can be conveniently integrated with molecular biology techniques." Applied Herpetology 2 3: 287-295.

Berryman, D., Houde, F., DeBlois, C. y O'Shea, M. (2004). "Nonylphenolic compounds in drinking and surface waters downstream of treated textile and pulp and paper effluent: A survey and

preliminary assessment of their potential effects on public health and aquatic life." Chemosphere 56: 247-255.

Bevan, C. L., Porter, D. M., Prasad, A., Howard, M. J. y Henderson, L. P. (2003). "Environmental Estrogens Alter Early Development in *Xenopus laevis*." Environ.Health Perspect. 111(4): 488-496.

Birge, W. J., Black, J. A., Westerman, A. G. y Ramey, B. A. (1983). "Fish and amphibianembryos - Amodelsystem for evaluatingteratogenicity." Fundamental and Applied Toxicology 3(4): 237-242.

Blaustein, A. R. y Johnson, P. T. J. (2003). "The complexity of deformed amphibians." Frontiers in Ecology and the Environment 1(87-94).

Boedeker, W., Drescher, K., Altenburger, R., Faust, M. y Grimme, L. (1993). "Combined effects of toxicants: The need and soundness of assessment approaches in ecotoxicology." Sci Total Environ Suppl 2: 931-939.

Bonfanti, P., Colombo, A., Orsi, F., Nizzetto, I., Andrioletti, M., Bacchetta, R., Mantecca, P., Fascio, U., Vailati, G. y Vismara, C. (2004). "Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development." Aquat Toxicol 70(3): 189-200.

Boutin, C., Freemark, K. E. y Keddy, C. J. (1993). Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: nontarget plant Testing and Evaluation. T. R. S. 145 Ottawa, Service (Headquarters), Environment Canada (Pág.91p).

Boutin, C., Freemark, K. E. y Keddy, C. J. (1995). "Overview and rationale for developing regulatory guidelines for nontarget plant testing with chemical pesticides." Environ Toxicol Chem 14(9): 1465-1475.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Brady, J. A., Wallender, W. W., Werner, I., Mostafazadeh Fard, B., Zalom, F. G., Oliver, M. N., Wilson, B. W., Mata, M. M., Henderdon, J. D., Deanovic, L. A. y Upadhaya, S. (2006). "Pesticide runoff from orchard floors in Davis, California, USA: A comparative analysis of diazinon and esfenvalerate." Agric Ecosyst Environ 115: 56-68.

Bridges, C. (1997). "Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl." Arch Environ Contam Toxicol 16: 1935-1939.

Bridges, C. M. y Semlitsch, R. D. (2000). "Variation in pesticide tolerance of tadpoles among and within species of Ranidae and patterns of amphibian decline." Conservation Biology 14(5): 1490-1499.

Bridges, C. M., Dwyer, F. J., Hardesty, D. K. y Whites, D. W. (2002). "Comparative contaminant toxicity: are amphibian larvae more sensitive than fish?" Bull Environ Contam Toxicol 69(4): 562-9.

Brown, U. R. J., Conradi, M. y Depledge, M. H. (1999). "Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium volutator*_(Pallas, 1766)." Science of The Total Environment 233: 77-88.

Buege, J. A., Aust, S. D., Sidney, F. y Lester, P. (1978). " Microsomal lipid peroxidation.Methods in Enzymology." Academic Press: 302-310.

Burkhart, J. G., Helgen, J. C., Fort, D. J., Gallagher, K., Bowers, D., Propst, T. L., Gernes, M., Magner, J., Shelby, M. D. y Lucier, G. (1998). "Induction of Mortality and Malformation in *Xenopus laevis* Embryos by Water Sources Associated with Field Frog Deformities." Environ. Health Perspect 106(12): 841-848.

Butler, G. C. (1978). Principles of ecotoxicology. Chichester [Eng] New York, Wiley (Pág.350).

Calabrese, E. J. (1991). Multiple Chemical Interaction., Lewis Publishers, Chelsea, Mi., USA. p.13

Calamari, D. y Alabaster, J. S. (1980). "An approach to theoretical models in evaluating the effects of mixtures of toxicants in the aquatic environment." Chesmophere 9: 533-538.

Campbell, K. (1994). "Concentrations of heavy metals associated with urban runoff in fish living in stormwater treatment ponds." Arch Environ Contam Toxicol 27: 352-356.

Carey, C. y Bryant, C. J. (1995). "Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations." Environ Health Perspect. 103(4): 13-17.

Caswell, H. (1996). Demography Meets ecology: Untangling the Population Level Effects of Toxic Substances, in Ecotoxicology: A Hierarchical Treatment. M. C. Newman, and C.H Jagoe Boca Raton, FL, CRC/Lewis

Cedergreen, N., Kudsk, P., Mathiassen, S. K., Sorensen, H. y Streibig, J. C. (2007). "Reproducibility of binary-mixture toxicity studies." Environ. Toxicol. Chem. 26: 149-156.

Cibeira, F. (2009). Algo huele mal a orillas del Uruguay. Página 12. Buenos Aires.

Co.P.A.A.R.A. (2009). Diagnóstico Ambiental del Arroyo Morón. Primer Informe Parcial, Municipio de Morón. Consejo Profesional Analistas Ambientales de la República Argentina.

Colovíc, M., Krstíc, D., Petrovíc, S., Leskovac, A., Joksíc, G., Savíc, J., Franko, M., Trebse, P. y Vasí, V. (2010). "Toxic effects of diazinon and its photodegradation products." Toxicology Letters 193(1): 9-18.

Contronei, G. (1932). "Costituzione zoologica e trapianti. Ricerche tra Anuri e Urodeli. Considerazioni." Rend Acc Naz Lincei 15(4): 236-240.

Coppage, D. L. y Braidech, T. E. (1976). "River pollution by anticholinesterase agents." Wat. Res. 10: 19-24.

Corn, P. S. (1994). "USDA Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experimental Station, Ft. Collins, Colorado." General Tech Report 247: 59-67.

Chambers, J. E. y Carr, R. L. (1995). "Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity." Toxicology 105: 291-304.

Chaparro, J. C., Pramuk, J. B. y Gluesenkamp, A. G. (2007). "A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from cloud forest of southeastern Peru." Herpetologica 63: 203-212.

Chen, T., Gross, J. A. y Karasov, W. H. (2007). "Adverse effects of chronic copper exposure in larval northern leopard frogs (*Rana pipiens*)." Environ Toxicol Chem. 26(7): 1470-5.

Dachs, J., Van Ry, D. y Eisenreich, S. (1999). "Occurrence of Estrogenic Nonylphenols in the Urban and Costal Atmosphere of the Lower Hudson River Estuary." Environ. Sci. Technol. 33: 2676-2679.

Davis, A. P., Shokouhian, M. y Ni, S. (2001). "Loading estimates of lead, copper, cadmium, and zinc in urban runoff from specific sources." Chemosphere 44(5): 997-1009.

Dawson, D. A. y Bantle, J. A. (1987). "Development of a reconstituted water medium and preliminary validation of the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX)." J Appl Toxicol 7: 237-244.

De Jong Westman, A., Elliott, J., Cheng, K., van Aggelen, G. y Bishop, C. (2010). "Effects of environmentally relevant concentrations of endosulfan, azinphosmethyl, and diazinon on Great Basin spadefoot (*Spea intermontana*) and Pacific treefrog (*Pseudacris regilla*)." Environ Toxicol Chem 29(7): 1604-12.

De Laender, F., Janssen, R. y De Schamphelaer, K. A. C. (2009). "Non-simultaneous ecotoxicity testing of single chemicals and their mixture results in erroneous conclusions about the joint action of the mixture." Chemosphere 76: 428-432.

Defensoría del Pueblo de la Nación (2007). Informe Especial Cuenca del Río Reconquista - Primera Parte. . B. A. Defensoría del Pueblo de la Nación - Ombudsman Nacional.

Del Conte, E. y Sirlin, L. (1951). "The firts stages of *Bufo arenarum* development." Acta Zool. Lilloana 12: 495-499.

Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. y Rodríguez, H. (2002). " Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement." Free Rad. Biol. Med 32: 1102-1115.

Dodds, E. y Lawson, W. (1938). "Molecular structure in relation to estrogenic activity: compounds without a phenanthrene nucleus." Proc Royal Soc (London B(125): 222-32.

Duellman, W. E. y Trueb, L. (1986). Biology of amphibians. T. J. H. U. Press Baltimore, Maryland

Dumont, J., Schultz, T. W., M., B. y Kao, G. I. E. (1983). Frog embryo teratogenesis Assay - Xenopus (FETAX) - A short-term assay applicable to complex environmental mixtures. M. D. Waters, S. S. Sandhu, J. Lewtas*et al* Plenum, New York

Echeverria D.D. y Fiorito de Lopez L.E. (1981). "Estadios de la metamorfosis en *Bufo arenarum* (Anura)." Physis (Buenos Aires),Secc.B 40(98): 15-23.

Echeverria, D. D. (1987). Organogénsesis en *Bufo arenarum*. Desarrollo de la gónada. FCEN Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires. Tesis Doctoral.

Echeverria, D. D., Ed. (1990). La metamorfosis de los anuros, un cambio con historia. Serie de Divulgación N°4. Buenos Aires.

Ekelund, R., Bergman, Å., Granmo, Å. y Berggren, M. (1990). "Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals-- A re-evaluation." Environmental Pollution 64(2): 107-120.

Enserink, E. L., Mass-Diepeven, J. L. y Van-Leeuwen, C. J. (1991). "Combined effects of metals; an ecotoxicological evaluation." Water Research 25 5: 579-687.

Eriyamremu, G. E., Osagie, V. E., Omoregie, S. E. y Omofom, C. O. (2007). "Alterations in glutathione reductase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation of tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to Bonny Light crude oil and its fractions." Ecotoxicology and Environmental Safety.

Faria, M., López, M., Fernández-Sanjuan, M., Lacorte, S. y Barata, C. (2010). "Comparative toxicity of single and combined mixtures of selected pollutants among larval stages of the native freshwater mussels (*Unio elongatulus*) and the invasive zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)." Sci Total Environ 408(12): 2452-8.

Federal Register (1990). Testing consent order on 4-nonylphenol branched. CAS 84852-15-3. Fed Reg. 55**:** 5991–5994.

Fernández, M. P., Ikonomou, M. G. y Buchanan, I. (2007). "An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters." Science of The Total Environment 373(1): 250-269.

Ferrando, M. D., Sancho, E. y Andreu-Moliner, E. (1991). "Comparative acute toxicities of selected pesticides to *Anguilla anguilla*." J. Environ. Sci. Health B26: 491-498.

Ferrari, A., Anguiano, L., Lascano, C., Sotomayor, V., Rosenbaum, E. y Venturino, A. (2008). "Changes in the antioxidant metabolism in the embryonic development of the common South American toad *Bufo arenarum*: Differential responses to pesticide in early embryos and autonomous-feeding larvae." J. of Biochem.Mol. Toxicol. 22(4): 259-267.

Ferrari, A., Lascano, C. I., Anguiano, O. L., D'Angelo, A. M. P. d. y Venturino, A. (2009). " Antioxidant responses to azinphos methyl and carbaryl during the embryonic development of the toad *Rhinella* (*Bufo*) *arenarum* Hensel." Aquatic Toxicology 93(1): 37-44.

Ferrari, L., de la Torre, F., Demichelis, S., García, M. y Salibián, A. (2005). "Ecotoxicological assessment for receiving waters with the premetamorphic tadpoles acute assay." Chemosphere 59(4): 567-575.

Ferreira, C. M., Lombardi, J. V., Machado-Neto, J. G., Bueno-Guimarães, H. M., Soares, S. R. y Saldiva, P. H. (2004). "Effects of copper oxychloride in *Rana catesbeiana* tadpoles: toxicological and bioaccumulative aspects." Bull Environ Contam Toxicol 73(3): 465-70.

Finney, D. J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. London, Charles Griffin &Company Ltd (Pág.668).

Flammarion, P., Migeon, B. y Garric, J. (1996). "Joint Effects of Copper Sulphate and Methidathion on Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) EROD and AChE Activities." Bull Envir Contam Toxicol 56: 440-445.

Flaskos, J. (2012). "The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: A direct role for the oxon metabolites." Toxicology Letters 209: 86-93.

Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Bohling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. y Johncke, U. (1994). "The assessment of bioaccumulation." Chemosphere 29: 1501-1514.

Fries, E. y Puttmann, W. (2004). "Occurrence of 4-nonylphenol in rain and snow." Atmos Environ 38: 2013-6.

Frost, D. R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R., Haas, A., Haddad, C. F. B., de Sá, R., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S. C., Raxworthy, C., Campbell, J. A., Blotto, B. L., Moler, P., Drewes, R. C., Nussbaum, R. A., Lynch, J. D., Green, D. M. y Wheeler, W. (2006). "The amphibian tree of life." Bull Amer Museum Natural History 297: 1-370.

Fulton, M. H. y Key, P. B. (2001). "Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophodphorus insecticide exposure and effects." Environ. Toxicol. Chem. 20: 37-45.

Galloway, T. y Handy, R. (2003). "Inmunotoxicity of Organophosphorous Pesticides." Ecotoxicology 12: 345-363.

Gasser, R. (1953). "A new insecticide with wide efficacy." Z Naturforsch B8: 225-232.

Gessner, P. K. (1995). "Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility." Toxicology 105: 161- I79.

Gindi, T. y Knowland, J. (1979). "The activity of cholinesterases during the development of *Xenopus laevis*." J Embryo exp Morph 51: 209-215.

Gong, Y., Pan, X., Huang, Y., Gao, Z., Yu, H. y Han, X. (2008). "Nonylphenol kills special reproductive cells in male rats by changing the cell's outside membrane." Environmental Health News.

González, P. (2004). Riesgos químicos por el uso de plaguicidas en el medio ambiente. CCOO. Federació de serveis i administracions públiques**:** 135.

Gosner, K. L. (1960). "A simplified table for stanging Anura embryos and larvae with notes on identification." Herpetologica 16: 183-190.

Grosell, M. y Wood, C. M. (2002). " Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry." J. Exp. Biol. 205: 1179-1188.

Guenther, K., Heinke, V., Thiele, B., Kleist, E., Prast, H. y Raecker, T. (2002). "Endocrine Disrupting Nonylphenols are Ubiquitous in Food." Environ. Sci. Technol. 36(8): 1676-1680.

Haber, F. y Weiss, J. (1934). "The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts." Proc Royal Soc (London) Ser. A 147: 332-351.

Habig, W. H., Pabst, M. J. y Jakoby, W. B. (1974). "Glutathione S-Transferases." Journal of Biological Chemistry 249(22): 7130-7139.

Hamm, J. T. y Hinton, D. E. (2000). "The role of development and duration of exposure to the embryotoxicity of diazinon." Aquat Toxicol 48: 403-418.

Hamm, J. T., Wilson, B. W. y Hinton, D. E. (2001). "Increasing Uptake and Bioactivation with Development Positively Modulate Diazinon Toxicity in Early Life Stage Medaka (*Oryzias latipes*)." Toxicol Sci 61: 304-313.

Handy, R. D. (2003). "Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process?" Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 135(1): 25-38.

Harris, M. L., Bishop, C. A., Struger, J., Ripley, B. y Bogart, J. P. (1998). "The functional integrity of northern leopard frog (*Rana pipiens*) and green frog (*Rana clamitans*) population in orchard wetlands.II Efects of pesticides and eutrophic conditions on early life stage development." Environ Toxicol Chem 17(7): 1351-1363.

Herkovits, J. (1977). "Shape regulation capacity during development: recovery of embryos developing notwithstanding asymmetry until the neurula stage." Acta Embryol Exp(Palermo)(1): 3-10.

Herkovits, J., Herkovits, F. D. y Pérez-Coll, C. (1997). "Identification of aluminium toxicity and Aluminium-Zinc interaction in amphibian *Bufo arenarum* embryos." Environ Sciences 5(1): 57-64.

Herkovits, J. y Helguero, L. A. (1998). "Copper toxicity and copper-zinc interactions in amphibian embryos." Sci .Total Environ. 221: 1-10.

Herkovits, J. y Pérez-Coll, C. S. (1999). "Bioensayos para test de toxicidad con embriones de anfibio (‘‘ANFITOX’’)." Ingeniería Sanitaria y Ambiental vol. 42 (parte 1) y vol. 43 (parte 2) pp. 24-30 (parte 21) y pp. 50-55 (parte 22).

Herkovits, J. y Pérez-Coll, C. S. (2003). Symposium on multiple stressor effects in relation to declining amphibian populations.AMPHITOX: A customized set of toxicity tests employing amphibian embryos. Multiple Stressor Effects in Relation to Declining Amphibian Populations.ASTM International STP 1443. G. L. Linder, Krest, S, Sparling, D. and Little, E.E. USA**:** 46-60.

Hermens, J., Broekhuyzen, E., Canton, H. y Wegman, R. (1985). "Quantitative structure activity relationships and mixture toxicity studies of alcohols and chlorohydrocarbons: Effects on growth of *Daphnia magna*." Aquat Toxicol 6: 209-217.

Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen biology and biochemistry: Role of free radicals. Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. K. B. Storey.

Hickman, P. C. (1967). Principios de zoologia. S. A. Ediciones de la Universidad de Chile. Ediciones Ariel Barcelona, España

Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton, G. A. J. y Cairns, J. J., Eds. (2003). Handbook of Ecotoxicology. Second edition. Boca Raton London New York Washington, D.C., LEWIS PUBLISHERS.A CRC Press Company.

Houlahan, J. E. y Findlay, C. S. (2000). "Quantitative evidence for global amphibian population declines." Nature 404: 752-755.

Hutler Wolkowicz, I. R., Herkovits, J. y Pérez Coll, C. S. (2011). "Stage-dependent toxicity of bisphenol-a on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) embryos and larvae." Environ Toxicol.

IPCS (1998a). "Environmental Health Criteria 200: Copper." Geneva, WHO, International Programme on Chemical Safety.

IPCS (1998b). Environmental Health Criteria 198: Diazinon. International Programme on Chemical Safety.World Health Organization, Geneva (Pág.140).

IPCS (1998c). Environmental Health Criteria 200: Copper. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva (Pág.360).

Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J., Matthiessen, P. y Sumpter, J. (1996). "Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. ." Environ Toxicol Chem 15: 194-202.

Jones, D. P. (2006). "Redefining Oxidative Stress." Antioxidants and redox signaling 8(9-10): 1865-1879.

Kambara, S. (1953). "Role of jelly envelopes of toad eggs in fertilization." Annot Zool Jpn 26: 78-84.

Kanazawa, J. (1975). "Uptake and excretion of organophosphorus and carbamate insecticides by fresh water fish, motsugo, *Pseudorasbora parva*." Bull Environ Contam Toxicol 14(3): 346-52.

Karpouzas, D. G. y Singh, B. K. (2006). "Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: metabolic pathways and molecular basis." Adv. Microb. Physiol 51: 119-185.

Katagiri, C. (1973). "Chemical analysis of toad egg-jelly in relation to its sperm-capacitating activity." Dev Growth Differentiation 15: 81-92.

Keizer, J., D'Agostino, G. y Vittozzi, L. (1991). "The importance of biotransformation in the toxicity of xenobiotics to fish. I. Toxicity and bioaccumulation of diazinon in guppy (*Poecilia reticulata*) and zebra fish (*Brachydanio rerio*) " Aquat Toxicol 21(3-4): 239-254.

Kendal, R. J. y Akerman, J. (1992). "Terrestrial wildlife exposed to agrochemicals: an ecological risk assessment perspective." Environ. Tox. and Chem 11: 1727-1749.

Kinnberg, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. y Jespersen, A. (2000). "Effects of nonylphenol and 17 beta-estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus*." J Exp Biol 203: 171-81.

Kohen, R. y Nyska, A. (2002). "Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification." Toxicologic Pathology 230(6): 620-650.

Landis, W. G. y Yu, M. H. (1998). Environmental Toxicology. L. Publishers Boca Raton, Florida

Lavilla, E. O., Ponssa, M. L., Baldo, D., Basso, N., Bosso, A., Céspedez, J., Chebez, J. C., Faivovich, J., Ferrari, L., Lajmanovich, R., Langone, J. A., Peltzer, P., Úbeda, C., Vaira, M. y Vera Candiotti, F. (2000). Categorización de los anfibios de Argentina. En: Categorización de los anfibios y reptiles de la República Argentina. E. O. Lavilla, E. Richard and G. J. Scrocchi San Miguel de Tucumán, Lavilla, E.O.; Richard, E. & Scrocchi, G.J. Asociación Herpetológica Argentina

Lee, H., Chattopadhyay, S., Gong, E., Ahn, R. y Lee, K. (2003). "Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor." Toxicol Sci 75: 40-6.

Lee, P. y Lee, W. (1996). " In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats." Bull Environ Contam Toxicol. 57: 341-8.

Leonard, J. P. y Salpeter, M. M. (1979). "Agonist-induced myopathy at the neuromuscular junction is mediated by calcium." J Cell Biol 82: 811-819.

Lesser, M. P. (2006). "Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology." Annu Rev Physiol 68: 253-78.

Li, M. H. (2008). "Effects of nonylphenol on cholinesterase and carboxylesterase activities in male guppies (*Poecilia reticulata*)." Ecotoxicol Environ Saf 71 781- 786.

Lombardi, J., Perpétuo, T., Ferreira, C., Machado-Neto, J. y Marques, H. (2002). "Acute toxicity of the fungicide copper oxychloride to tadpoles of the bullfrog *Rana catesbeiana*." Bull Environ Contam Toxicol. 69(3): 415-20.

Luck, H. (1963). Catalase. Methods of Enzymatic Analysis. H. U. Bergmeyer. New York, Academic Press**:** 885-886.

Mann, R. M. y Bidwell, J. R. (2000). "Application of the FETAX protocol to assess the developmental toxicity of nonylphenol ethoxylate to *Xenopus laevis* and two Australian frogs." Aquat Toxicol 51(1): 19-29.

Mann, R. M. (2005). "Methodological approaches in amphibian toxicology." Applied Herpetology 2 3: 223-230.

Mann, R. M., Hyne, R. V., Choung, C. B. y Wilson, S. P. (2009). "Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment." Environ Pollut 157(11): 2903-2927.

Marking, L. L. (1977). Method for assesing additive toxicity of chemical mixtures.Aquatic toxicology and hazard evaluation (ASTM) American Society for Testing and Materials. F. L. y. H. Mayer, J.L.

Marking, L. L. (1985). Toxicity of chemical mixtures. Fundamentals of aquatic toxicology., Rand G.M.-Petrocelli S.R. (Eds). Hemisphere Publishing, Washington D.C., USA.pp164-176

Mason, C. F. (1992). "Biology of Freshwater Pollution." 2nd ed, Longman Scientific and Technical: 351.

Matson, C. W., Lambert, M. M., McDonald, T. J., Autenrieth, R. L., Donnelly, K. C., Islamzadeh, A., Politov, D. I. y Bickham, J. W. (2006). "Evolutionary toxicology: population-level effects of chronic contaminant exposure on the marsh frogs (*Rana ridibunda*) of Azerbaijan." Environ Health Perspect 114(4): 547-52.

Maxwell, L. y Dutta, H. (2005). "Diazinon-induced endocrine disruption in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*." Ecotoxicol Environ Saf 60(1): 21-7.

Meister, A. y Anderson, M. E. (1983). "Glutathione." Annual Review of Biochemistry 52(1): 711-760.

Meister, A. (1988). "Glutathione metabolism and its selective modification." Journal of Biological Chemistry 263(33): 17205-17208.

Menkes, J., Alter, M., Steigleder, G., Keakley, D. y Sung, A. (1962). "Sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebelar degeneration." Pediatrics 29: 764-779.

Menon, J. y Rozman, R. (2007). "Oxidative stress, tissue remodeling and regression during amphibian metamorphosis." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 145(4): 625-31.

Ming-Ho, Y. (2005). Environmental Toxicology. Biological and health effects of pollutants. Second edition. Boca Raton, Florida., CRC Press (Pág.366).

Ministerio de Salud y Acción Social (2007). "CAPITULO XII: BEBIDAS HIDRICAS, AGUA Y AGUA GASIFICADA AGUA POTABLE." Artículo 982(Res MSyAS N° 494 del 7.07.94).

Modra, H., Vrskova, D., Macova, S., Kohoutkova, J., Hajslova, J., Haluzova, I. y Svobodova, Z. (2011). "Comparison of diazinon toxicity to embryos of *Xenopus laevis* and *Danio rerio*; degradation of diazinon in water." Bull Environ Contam Toxicol 86(6): 601-4.

Mosconi, G., Carnevali, O., Franzoni, M. F., Cottone, E., Lutz, I., Kloas, W., Yamamoto, K., Kikuyama, S. y Polzonetti-Magni, A. M. (2002). "Environmental Estrogens and Reproductive Biology in Amphibians." General and Comparative Endocrinology 126(2): 125-129.

Mussi, M. y Calcaterra, N. (2010). "Paraquat-induced oxidative stress response during amphibian early embryonic development." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 151(2): 240-7.

Natale, G. S. (2006). "Análisis ecotoxicológico de una comunidad de anuros de la Región Pampeana - Efecto del Cr(VI) sobre embriones y larvas de distintas especies de una taxocomunidad." Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, p. 312.

Naylor, G. C. (1995). "Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates." Textile Chem. Color. 27: 29–33.

Newman, M. C. (1998). Fundamentals of Ecotoxicology. Boca Raton, Florida, Lewis Publisher (Pág.402).

Nieuwkoop, P. D. (1973). "The "organisation Center" of the amphibian embryo: Its origin, spatial organization and morphogenetic action " Adv. Morphogenet. 10: 310.

O´Dell, L. (1990). Copper M. Brown Washington, DC. (Pág.261-267).

Olson, D. y Christensen, G. (1980). "Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (in vitro)." Environ Res 49: 77-85.

Osterauer, R. y Köhler, H.-R. (2008). "Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*)." Aquat Toxicol 86 485-494.

Otitoloju, A. A. (2003). "Relevance of joint action toxicity evaluations in setting realistic environmental safe limits of heavy metals." J Environl Manag 67: 121-128.

Pachura, S., Cambon, J., Blaise, C. y Vasseur, P. (2005). "4-Nonylphenol-induced toxicity and apoptosis in *Hydra attenuata*." Environ. Tox. and Chem 24(12): 3085-3091.

Papadimitriou, E. y Loumbourdis, N. (2002). "Exposure of the frog *Rana ridibunda* to copper: impact on two biomarkers, lipid peroxidation, and glutathione." Bull Environ Contam Toxicol. 69(6): 885-891.

Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Sanchez , L. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Bionda, C. L., Martino, A. L. y Bassó, A. (2010). "Morphological abnormalities in amphibian populations from the mid-eastern region of Argentina." Herpetological Conservation and Biology 6(3): 432-442.

Pérez-Coll, C. S. y Herkovits, J. (1990). "Stage Dependent Susceptibility to Lead in *Bufo arenarum* Embryos." Environ Pollut 63: 239245.

Pérez-Coll, C. S. y Herkovits, J. (1996). "Stage-Dependent Uptake of Cadmium by *Bufo arenarum* Embryos." Bull Envir Contam Toxicol 56: 663-669.

Pérez-Coll, C. S. y Herkovits, J. (2004). "Lethal and teratogenic effects of naringenin evaluated by means of an amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX)." Food and Chemical Toxicology 42(2): 299-306.

Petrovic, M., Barcelo, D., Diaz, A. y Ventura, F. (2003). "Low nanogram per liter determination of halogenated nonylphenols, nonylphenol carboxylates, and their non-halogenated precursors in water and sludge by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry." J Am Soc Mass Spectrom 14: 516-27.

Piazza, Y. G. (2006). "Desarrollo gonadal y direfenciación sexual en *Bufo arenarum* (Amphibia, Anura). Efecto de la exposición al xenoestrógeno octilfenol". Biodiversidad y Biologia experimental. Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Tesis Licenciatura.

Pisanó, A. (1956). "Efficienza funzionale e structura dell´ ipofisi di anfibio." Arch. Zool. Ital. 42: 221-227.

Pisanó, A. (1977). Topicos de embriología. Buenos Aires, CONICET (Pág.330).

Rand, G. M. (1995). Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate, and risk assessment. T. Francis, Taylor & Francis Group (Pág.1125).

Redick, M. S. y La Point, T. W. (2004). "Effects of sublethal copper exposure on behavior and growth of *Rana pipiens* tadpoles." Bull Environ Contam Toxicol. 72(4): 706-10.

Relyea, R. A. (2004). "Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides." Environ Tox and Chem 23: 1737-1742.

Rizzo, A. M., Adorni, L., Montorfano, G., Rossi, F. y Berra, B. (2007). "Antioxidant metabolism of *Xenopus laevis* embryos during the first days of development." Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 146: 94-100.

Rodríguez, E. M. y Amín, O. A. (1991). "Acute toxicity of parathion and 2,4-D to larval and juvenile stage of *Chasmagnatuthus granulata* (Decapoda, Brachyura)." Bull.Envir.Contam.Toxicol. 47: 634-640.

Ross, H. L. B. y Wame, M. S. J. (1997). Most chemical mixtures have additive aquatic toxicity. Proceedings of the Third Annual Conference of the Australasian Society for Ecotoxicology. Brisbane**:** 30.

Rossi, A. (1959). "Tavole cronologique dello sviluppo embrionele e larvae del *Bufo Bufo*." Monit Zoo Ital 66: 139-147.

Sakr, S. A. y Gabr, S. A. (1992). "Ultrastructural changes induced by diazinon and neopybuthrin in skeletal muscles of *Tilapia nilotica*." Bull. Environ. Contam. Toxicol. 48: 467-473.

Santore, R. C., Di Toro, D. M., Paquin, P. R., Allen, H. E. y Meyer, J. S. (2001). "Biotic ligand model on the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*. ." Environ Toxicol Chem(20): 2397-2402.

Saxen, L. (1976). "Mechanism of teratogenesis." J Embryol Exp Morph 36(1): 1-12.

Scheunert, I., Mansour, M., Dörfler, U. y Schroll, R. (1993). "Fate of pendimethalin, carbofuran and diazinon under abiotic and biotic conditions." Sci. Total Environ 132: 361-369.

Schroder, H. (2001). "Tracing of surfactants in the biological wastewater treatment process and the identification of their metabolites by flow injection-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry and-tandem mass spectrometry." J Chromatogr A 926: 127-50.

Schwarenbach, R., Escher, B. J., Fenner, K., Hoffstetter, T. B., Johnson, C. A., vonGunten, U. y et. al. (2006). "The challenge ofmicropollutantsinaquaticsystems." Science 313: 1072-1077.

Shackelford, W. M., Cline, D. M., Faas, L. y Kurth, G. (1983). Evaluation of automated spectrum matching for survey identification of wastewater components by gas chromatography-mass spectrometry. . National Technical Information Service. PB83-182931. Springfield, VA.

Shang, D., Macdonald, R. y Ikonomou, M. (1999). "Persistence of nonylphenol ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the strait of Georgia, British Columbia, Canada." Environ Sci Technol A 33: 1366-72.

Sheffield, S. R. (1996). Effects of Field Exposure to Diazinon on Small Mammals Inhabiting a Semi-Enclosed Prairie Grassland Ecosystem, I. Ecological and reproductive Effects, II. Sublethal Effects, Oklahoma State University.

Slotkin, T. A. y Seidler, F. J. (2012). "Developmental neurotoxicity of organophosphates targets cell cycle and apoptosis, revealed by transcriptional profiles in vivo and in vitro." Neurotoxicology and Teratology 34: 232-241.

Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell , E. y Lester, J. N. (2008). "Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters." Environment International 34 1033-1049.

Soto, A., Justicia, H., Wray, J. y Sonnenschein, C. (1991). "*P*-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene." Environ Health Perspect 92: 167-73.

Sparling, D. W., Bishop, C. A. y Linder, G. (2000). The current status of amphibian and reptile ecotoxicolocal research. In: Ecotoxicology of amphibians and reptiles. L. G. B. C. A. Sparling D.W. SETAC. Pensacola (Pág.1-13).

Sparling, D. W. y Fellers, G. (2007). "Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylii*." Environ Pollut 147: 535-539.

Sprague, J. B. (1970). "Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilizing and applaying bioassays results. ." Water Res 4: 3-32.

Staples, C. A., Williams, J. B., Blessing, R. L. y Varineau, P. T. (1999). "Measuring the biodegradability of nonylphenol, ether carboxylates, octylphenol, ether carboxylates, and nonylphenol." Chemosphere 38: 2029-2039.

Stern, B. R., Solioz, M., Krewski, D., Aggett, P., Aw, T.-C., Baker, S., Crump, K., Dourson, M., Haber, L., Hertzberg, R., Keen, C., Meek, B., Rudenko, L., Schoeny, R., Slob, W. y Starr, T.

(2007). "Copper and human health: Biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships." J Toxic Environ Health. Part B 10: 157-222.

Stohs, S. y Bagchi, D. (1995). "Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions." Free Radic Biol Med 18(2): 321-36.

Suárez, F. y Lombardo, R. J. (2004). "Pitting the polluted against the flooded: water resource management in Tigre, Buenos Aires." Environment & Urbanization 16(2): 185-194.

Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación, R. A. (2003). Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente Diazinón**:** 7.

Sumanadasa, D. M., Wijesinghe, M. R. y Ratnasooriya, W. D. (2008). "Effects of diazinon on larvae of the Asian common toad (*Bufo melanostictus*, Schneider 1799)." Environ Toxicol Chem. 27(11): 2320-5.

Sundaram, K. M. S. y Szeto, S. (1981). "The dissipation of nonylphenol in stream and pond water under simulated field conditions." J. Environ. Sci. Health (Part B) B16(6): 767-776.

Svartz, G. V., Herkovits, J. y Pérez-Coll, C. S. (2012). "Sublethal effects of atrazine on embryo-larval development of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae)." Ecotoxicology 21(4): 1251-9.

Sztrum, A. A. (2010). Susceptibilidad diferencial al Níquel en distintos estadios del desarrolllo embrio-larval de *Rhinella (Bufo) arenarum*. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental. Buenos Aires, Universidad Nacional de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Tesis Doctoral.

Sztrum, A. A., D'Eramo, J. L. y Herkovits, J. (2011). "Nickel toxicity in embryos and larvae of the South American toad: Effects on cell differentiation, morphogenesis, and oxygen consumption." Environ Toxicol Chem 30(5): 1146-52.

Tabata, A., Kashiwada, S., Ohnishi, Y., Ishikawa, H., Miyamoto, N., Itoh, M. y Magara, Y. (2001). "Estrogenic influences of estradiol-17 beta, p-nonylphenol and bis-phenol-A on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations." Water Sci Technol 43: 109-16.

Takimoto, Y., Hagino, S., Yamada, H. y Miyamoto, J. (1984). "The acute toxicity of fenitrothion to killifish (*Oryzias latipes*) at twelve different stages of its life history." J. Pesticide Sci.(9): 463-470.

Tomlin, C. (2003). "The Pesticide Manual, 13th ed. British Crop Protection Council, UK."

Truhaut, R. (1977). "Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives." Ecotoxicology and Environmental Safety 1(2): 151-173.

Tsuda, T., Aoki, S., Inoue, T. y Kojima, M. (1995). "Accumulation and excretion of Diazinon, Fenithion and Fenitrothion by killfish: Comparison of individual and mixed pesticides." War Res Vol 29(2): 455--458.

Tsuda, T., Kojima, M., Harada, H., Nakajima, A. y Aoki, S. (1997). "Acute toxicity, accumulation and excretion of organophosphorous insecticides and their oxidation products in killifish." Chemosphere 35(5): 939-49.

US EPA (1988). Users guide for a computer program for PROBIT analisis of data from acute and short-term chronic toxicity test with aquatic organisms. Biological Methods, Environmental Monitoring and Support Lab., United States Environmental Protection Agency.

US EPA (1994). Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. SW 846.

US EPA. (1998). "Guidelines for ecological risk assessment. Ecological Risk Assessment Step 2." United States Environmental Protection Agency, 17 November 2011.

US EPA, Ed. (2005). Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria B Nonylphenol. Washington, DC U.S. Environmental Protection Agency. Office of Water. Office of Science and Technology. EPA-822-R-05-005. December, 2005.

Valavanidisa, A., Vlahogiannia, T., Dassenakisb, M. y Scoullos, M. (2006). "Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants." Ecotox Envrion Safe 64: 178-189.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncola, J., Izakovic, M. y Mazura, M. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chemico-Biological Interactions 160 1-40.

van der Geest, H. G., Greve, G. D., Boivin, M.-E., Kraak, M. H. S. y van Gestel, C. A. M. (2000). "Mixture toxicity of copper and diazinon to larvae of the mayfly (*Ephoron virgo*) judging additivity at different effect levels." Environ Tox and Chem 19(12): 2900-2905.

van der Oost, R., Beyer, J. y Vermeulen, N. P. E. (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review." Environ Toxicol Pharm 13: 57-149.

Van Ry, D., Dachs, J., Gigliotti, C., Brunciak, P., Nelson, E. y Eisenreich, S. (2000). "Atmospheric Seasonal Trends and Environmental Fate of Alkylphenols in the Lower Hudson River Estuary." Environ. Sci. Technol. 34: 2410-2417.

Vieira, L. R., Gravato, C., Soares, A. M. V. M., Morgado, F. y Guilhermino, L. (2009). "Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour " Chemosphere 76 1416-1427.

Wake, D. B. y Vredenburg, V. T. (2008). "Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians." Proceedings of the National Academy of Sciences 105(Supplement 1): 11466-11473.

Weis, J. S. y Weis, P. (1989). "Effects of environmental pollutants on early fish development." Rev. Aquat. Sci. 1: 45-73.

Wheeler, W. (2002). "Role of research and regulation in 50 years of pest management in agriculture." J. Agric. Food Chem 50: 4151-4155.

Ying, G.-G., Williams, B. y Kookana, R. (2002). "Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review." Environment International 28(3): 215-226.