

EFFECTO TOXICOLÓGICO DE UNA PRESENTACIÓN COMERCIAL DE GLIFOSATO (ROUNDUP ACTIVO®) EN PIEL DE RANA SABANERA (*Dendropsophus molitor*)



Trabajo de Grado para optar por el título de Bióloga Aplicada

CATALINA LÓPEZ FLÓREZ

**Grupo de Ecotoxicología, Evolución, Medio Ambiente y Conservación ($E=mc^2$).
Laboratorio de Embriología. Programa de Biología Aplicada, Facultad de Ciencias
Básicas y Aplicadas
Universidad Militar Nueva Granada
2021**

**EFFECTO TOXICOLÓGICO DE UNA PRESENTACIÓN COMERCIAL DE GLIFOSATO
(ROUNDUP ACTIVO®) EN PIEL DE RANA SABANERA (*Dendropsophus molitor*)**

CATALINA LÓPEZ FLÓREZ
COD. 0500869

Trabajo de grado presentado para optar por el título de Bióloga Aplicada

DIRECTOR

Edwin Gómez Ramírez MSC.
Docente Investigador
Universidad Militar Nueva Granada

CO-DIRECTORA

Mónica Andrea Ortiz Ruíz
Asistente de Investigación
Universidad Militar Nueva Granada

Bogotá, Colombia
2021

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios por la guía, las bendiciones recibidas y la sabiduría que me brindó para afrontar cada reto que se presentó durante mi carrera; a mis padres Enadis del Socorro Flórez Lara y Rafael César López Pérez por su amor infinito y apoyo económico, de quienes aprendí la tenacidad de asumir las situaciones de la vida y los valores y principios que hoy me determinan como persona; a mi hermano Cesar Joaquín López Flórez por su constante compañía, a mis abuelas Rosa Lara y Ana Pérez quienes me enseñan a vivir con alegría y siempre agradecida con Dios; a mi abuelo Joaquín Flórez Flórez una mención especial por haber inculcado en mi familia un camino académico y de principios intachables y a mi tía universal Yamilet del Carmen Flórez Lara a quien considero como una segunda madre y fue pieza fundamental para culminar esta maravillosa carrera.

Agradecer a mi Director Edwin Gómez Ramírez por la calidez con la que me enseña y con la que me recibió en su grupo de investigación, a quien no sólo considero un profesor sino un gran amigo y a mi Co-Directora Mónica Ortiz por su amistad, colaboración y seguimiento durante la realización de este trabajo.

Quiero extender un sincero agradecimiento a los profesores miembros de la Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas del programa de Biología Aplicada quienes con su paciencia, disponibilidad de tiempo y generosidad compartieron de manera grata su experiencia y amplio conocimiento.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Importación de plaguicidas químicos de uso agrícola por tipo de control ingrediente activo y país de origen año 2016. **Tomado de:** (Serrano, 2016).

Tabla 2. CL50 para diferentes especies expuestas a GP, a diferentes formulaciones comerciales de GP, a surfactantes y metabolito principal de GP. **Tomada de:** (Nescovik *et al.*, 1996; Monheit, 2003; Sandrini *et al.*, 2013).

Tabla 3. Desarrollo embrionario de la rana sabanera *D. molitor* a una temperatura de 29° C **Tomada de:** (Sarria-Rendón, 2010).

Tabla 4. Estadios de Gosner identificados desde la fecha inicial hasta la fecha final de intoxicación con diferentes concentraciones de Roundup® Activo.

Figura 5. Eventos importantes a partir del estadio 42 hasta la 46, individuos metamorfos. **Tomado de:** (Gosner, 1960).

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA:

Ecotoxicología de anfibios (Anura) en el Neotrópico, una revisión

Figura 1. Porcentaje de especies de anfibios amenazadas según distintos factores. **Tomado de:** (IUCN, 2013).

Figura 2. Estructura de la epidermis y su división por estratos. **Tomado de:** (Velásquez *et al*, 2008).

Figura 3. Variación en el patrón de coloración en *D. molitor*. **Tomado de:** (Guarnizo *et al.*, 2014).

Figura 4. Eventos importantes a partir del estadio 25 hasta la etapa 41 (etapa final larva). **Tomado de:** (Gosner, 1960).

Figura 5. Eventos importantes a partir del estadio 42 hasta la 46, individuos metamorfos. **Tomado de:** (Gosner, 1960).

CAPÍTULO II. ESCRITO TRABAJO DE GRADO:

Efecto toxicológico de una presentación comercial de glifosato (Roundup® Activo) en piel de rana Sabanera (*Dendropsophus molitor*)

Figura 1. Secciones de tejido tegumentario evaluadas en *D. molitor*. **A.** Sección dorso-craneal **B.** Sección cola perfil lateral.

Figura 2. Tejido tegumentario de *D. molitor* correspondientes al tratamiento 1 (T1: 0 mg/L). Se observa epidermis (Ep), capa córnea (Cc), estrato basal (Eb), dermis (D), estrato laxo (El), estrato compacto (Ec), hipodermis-tejido muscular (H-Tm), células multinucleadas (cm), melanóforos (ml), cúmulos de melanina (m), glándulas mucosas (Gm), cuello glandular (cg), tejido conectivo (Tc). Tinción azul de toluidina.

Figura 3. Tejido tegumentario de *D. molitor* correspondientes al tratamiento 2 (T2: 1.4 mg/L). Se observa epidermis (Ep), dermis (D), hipodermis-tejido muscular (H-Tm), células multinucleadas (cm), melanóforos (ml), cúmulos de melanina (m), glándulas mucosas (Gm), glándulas serosas (Gs). Tinción azul de toluidina.

Figura 4. Tejido tegumentario de *D. molitor* correspondientes al tratamiento 3 (T3: 3.6 mg/L). Se observa epidermis (Ep), dermis (D), hipodermis-tejido muscular (H-Tm), melanóforos (ml), cúmulos de melanina (m), tejido conectivo (Tc), glándulas mucosas (Gm). Tinción azul de toluidina.

Figura 5. Tejido tegumentario de *D. molitor* correspondientes al tratamiento 4 (T4: 5.6 mg/L)). Se observa epidermis (Ep), dermis (D) hipodermis-tejido muscular (H-Tm), melanóforos (ml), cúmulos de melanina (m), tejido conectivo (Tc), glándulas mucosas (Gm). Tinción azul de toluidina.

Figura 6. A. Tejido tegumentario de la sección dorso-craneal de *D. molitor* expuesto a diferentes concentraciones de Roundup Activo®. (Figura 6A., $F_{3,76}=4.855$, $P=0.00383$;

Figura 6A., $F_{3,76}=3.742$, $P=0.0145$; **Figura 6A.**, $F_{3,76}=4.304$, $P=0.00737$, respectivamente). **B.** Tejido tegumentario de la sección de cola perfil lateral de *D. molitor* expuesto a diferentes concentraciones de Roundup Activo®. (**Figura 6B.**, $F_{3,76}=4.154$, $P=0.00882$).

Figura 6B., $F_{3,76}=23.36$ $P=8.12e-11$ y **Figura 6B.**, $F_{3,76}=13.9$, $P=2.58e-07$, respectivamente). Cada valor representa la media $\pm$ error estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p > 0.05$).

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Ácido aminometilfosfónico	(AMPA)
Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos	(EPA)
Alanina aminotransferasa	(ALT)
Aldehído metanodicarboxílico	(MDA)
Aminoácidos aromáticos	(AAA)
Aminoácidos de cadena ramificada	(BCAA)
Aspartato aminotransferasa	(AST)
Batrachochytrium dendrobatidis	(Bd)
Buffer fosfato	(BF)
Carga Energética de Adenilatos	(CEA)
Creatinina	(CRE)
Especies reactivas de oxígeno	(ROS)
Glifosato- flurocloridona	(GLY-FLC)
Glifosato	(GP)
Glifosato-dicamba	(GLY-DIC)
Glutación peroxidasa	(GSH-Px)
Glutación reductasa	(GR)
Lactato deshidrogenasa	(LDH)
Microscopía electrónica de barrido	(MEB)
Microscopía óptica de alta resolución	(MOAR)
N-fosfonometilglicina	(PMG)
Nitrógeno ureico en sangre	(BUN)
Polioxietileno amina	(POEA)
Resonancia magnética nuclear	(RMN)
Sistema Nervioso Central	(SNC)
Superóxido dismutasa	(SOD)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA.

Ecotoxicología de anfibios (Anura), una revisión

Introducción

1.1 Desarrollo de la revisión bibliográfica

- 1.1.1 Agroquímicos
- 1.1.2 Glifosato y composición química
- 1.1.3 Efecto de glifosato en organismos acuáticos
- 1.1.4 Los anfibios como bioindicadores de contaminación ambiental y como modelos de estudio en ecotoxicología
- 1.1.5 Impacto de agroquímicos en Anfibios
- 1.1.6 Alteraciones histopatológicas en anfibios por exposición a herbicidas
- 1.1.7 Tejido Epitelial en Vertebrados (anfibios)
- 1.1.8 Generalidades y biología de la Rana Sabanera (*D. molitor*)
- 1.1.9 Tablas de desarrollo embrionario de *D. molitor*

1.2 Metodología para la revisión

1.3 Discusión

1.4 Conclusiones

1.5 Bibliografía

CAPÍTULO II. ESCRITO TRABAJO DE GRADO

Efecto toxicológico de una presentación comercial de glifosato (Roundup Activo®) en piel de rana Sabanera (*Dendropsophus molitor*)

2.1 Resumen

Palabras Clave

2.2 Abstract

Key Words

2.3 Introducción

2.4 Materiales y Métodos

2.4.1 Área de estudio y material biológico

2.4.2 Diseño experimental

2.4.3 Procesamiento para Microscopía Óptica de alta resolución (MOAR)

2.4.4 Análisis estadístico

2.5 Resultados

2.6 Discusión

2.7 Conclusiones

2.8 Recomendaciones

2.9 Bibliografía

CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA.

Ecotoxicología de anfibios (Anura), una revisión

INTRODUCCIÓN

1.1 Desarrollo de la revisión bibliográfica

Esta revisión pretende aportar elementos teóricos y estudios específicos para tratar de esclarecer los efectos de los pesticidas con principio activo de glifosato, sobre diferentes organismos vertebrados de ecosistemas acuáticos, haciendo especial énfasis en los anfibios; este aporte se realice como precedente a tener en cuenta para las políticas y regulación del GP en el país.

1.1.1 Agroquímicos

El uso de compuestos químicos para el control de diferentes plagas data desde 1930 y se intensificó en 1960 con la 'Revolución verde' ya que se buscaba combatir la crisis alimentaria global aumentando la producción de los cultivos (Berny, 2007). Los agroquímicos son definidos como sustancias químicas sintéticas que son aplicadas a sistemas agrícolas con el fin de inhibir el desarrollo de especies nocivas y aumentar la productividad de los cultivos (Serrano, 2017).

Los agroquímicos han alcanzado un papel vital en el sector agrícola debido al uso de estos productos (pesticidas y fertilizantes) no sólo han brindado solución a las pérdidas causadas por las plagas en la producción agrícola, sino que además han incrementado la producción de cultivos haciéndole frente a los problemas de seguridad alimentaria que se vive en diferentes partes del mundo (Popp *et al.*, 2013; Villacrés, 2014; Devendar y Yang, 2019).

Se ha evidenciado que el uso de pesticidas y fertilizantes proporcionan múltiples beneficios al sector agrícola por lo que se considera que los agroquímicos son una herramienta valiosa para mantener y mejorar el rendimiento en los agroecosistemas (Popp *et al.*, 2013; Devendar y Yang, 2019), sin embargo, los beneficios se ven empañados por los efectos negativos de los pesticidas reportados en la salud humana y en el medio ambiente (National Research Council, 2000).

Los sectores que más contribuyen al crecimiento económico de Colombia son la ganadería, la minería y el sector agropecuario (Bonilla *et al.*, 2000). Este último por la producción de alimentos, materias primas y generación de empleos desempeña un papel importante en la actividad económica, por tal razón el uso de plaguicidas ha tomado fuerza ya que constituyen un elemento fundamental en el desarrollo de la agricultura (Bermeo-López, 2014) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Importación de plaguicidas químicos de uso agrícola por tipo de control ingrediente activo y país de origen año 2016. **Tomado de:** (Serrano, 2016)

TIPO DE CONTROL	INGREDIENTE ACTIVO	PAIS DE ORIGEN	Kg					
			INGREDIENTE ACTIVO	MATERIA PRIMA	PRODUCTO TERMINADO	INGREDIENTE ACTIVO	MATERIA PRIMA	PRODUCTO TERMINADO
HERBICIDA	Total FLUMETRALINA							3.156
	FLUMIOXAZIN	ESTADOS UNIDOS						
	Total FLUMIOXAZIN							
	FLUROXYPIR + PICLORAM	ALEMANIA						
		CHINA						920
	Total FLUROXYPIR + PICLORAM							920
	FLUROXYPIR METYL	CHINA		3.000				
		ESTADOS UNIDOS						
		FRANCIA					23.040	
		ISRAEL					20.800	
	Total FLUROXYPIR METYL			3.000			43.840	
	FOMESAFEN	ALEMANIA					9.600	
		BULGARIA						6.304
		PANAMA						23.800
	Total FOMESAFEN						9.600	30.104
	GLIFOSATO	BRASIL					3.825.500	
		CHINA	24.000	1.254.000	172.320		678.600	1.787.300
		ESTADOS UNIDOS						
		PANAMA						6.200
		VARIOS		1.320.000				
	Total GLIFOSATO		24.000	2.574.000	172.320		4.504.100	1.793.500
	GLUFOSINATO DE AMONIO	ALEMANIA	98.400					
		CHINA		12.000				45.204
		INDIA						35.605
	Total GLUFOSINATO DE AMONIO		98.400	12.000				80.809
	HEXAMETILENDIAMINA	RUSSIA					211.000	
	Total HEXAMETILENDIAMINA						211.000	
	HEXAZINONA	VARIOS			1.647			
	Total HEXAZINONA				1.647			
	HEXAZINONA + DIURON	BRASIL						

1.1.2 Glifosato y composición química

El glifosato (GP), (N-fosfonometil glicina), es un herbicida sistémico, no selectivo de amplio espectro, el cual se ha usado para el control de plantas anuales y perennes, ejerce su acción mediante la inhibición de la síntesis de aminoácidos aromáticos tales como el triptófano, fenilalanina y tirosina en las plantas por lo tanto suprime la enzima de la vía del shikimato inhibiendo el crecimiento de estos organismos, esta vía (ácido shikímico) está ausente en mamíferos, peces, aves, reptiles, anfibios e insectos por lo que se esperaba que el glifosato no afectara a estos organismos, sin embargo, hay estudios que evidencian alteraciones en varios organismos que no eran la especie objetivo (WHO, 1994; Kaczewer, 2002; Williams *et al.*, 2000; Haney *et al.*, 2002). Las plantas acumulan estas sustancias en los tejidos de la raíz y al liberarlas a la rizosfera pueden descomponerse y ser absorbidas por otra planta provocando daños en el desarrollo y crecimiento de individuos cercanos (Martínez *et al.*, 2018).

El GP se considera un pesticida organofosforado tóxico y persistente en el ambiente, el glifosato extendiéndose a ecosistemas y organismos terrestres y acuáticos y afecta diversos organismos porque modifica la estructura y funcionalidad de los ecosistemas (Salazar y Madrid, 2011). El GP es una sal ácida de clase II de toxicidad, según la clasificación de la EPA, lo que quiere decir que es moderadamente tóxico y aun así su uso ha aumentado y de manera irresponsable (Duarte *et al.*, 2003).

Las presentaciones comerciales de GP son una mezcla del ingrediente activo (GP) y POEA, un surfactante que aumenta la eficiencia de este pesticida en campo (Mañas, 2010). El surfactante comúnmente utilizado a nivel global es polioxietilenamina (POEA) en concentraciones que varían entre un 6-18% ya que se le atribuye que mejora la solubilidad de GP y además facilita la difusión de este ingrediente activo a través de la superficie de la planta (Eslava-Mocha *et al.*, 2007; Mañas, 2010; Rondón-Barragán *et al.*, 2012).

La metabolización del GP según Mañas (2010), se debe principalmente a los microorganismos que se encuentran en el suelo, dando origen a aproximadamente seis productos de degradación, entre estos productos el de mayor importancia es el AMPA, considerado el principal metabolito ambiental del GP.

En trabajos expuestos por Servizi *et al.* (1987), se determinó que el efecto combinado de GP con alguno de sus surfactantes como POEA o Cosmo-flux 411F, es mucho más tóxico que el GP mismo (Duarte *et al.*, 2003; Eslava-Mocha *et al.*, 2007).

En Colombia, el GP se utiliza ampliamente en la agricultura para control de arvenses y erradicación de la coca y la amapola (Solomon *et al.*, 2007). Sin embargo entre el 10 al 14% se utiliza para el programa de erradicación y entre el 76 al 90% se destina para usos agrícolas (Nivia y Sánchez, 2001; Solomon, 2005).

1.1.3 Efecto del glifosato en organismos acuáticos

Las presentaciones comerciales de GP que contienen como surfactante POEA han demostrado ser más tóxicos en los organismos acuáticos que en los terrestres (Prosser *et al.*, 2017; Vilca *et al.*, 2018).

En estudios adelantados por Zhang *et al.* (2017), determinaron que el GP puro a una concentración de 0,01 mg/L afectó las neuronas motoras primarias del pez cebra (*Danio rerio*) lo que se evidenció en movimientos anormales como nado en reversa; además Roy *et al.*, (2016) concluyeron que a concentraciones de (50 mg/L) de una formulación clásica de Roundup®, habían alteraciones significativas en el desarrollo del cerebro anterior, el mesencéfalo y daño ocular.

Otro caso de estudio realizado por Kreutz *et al.*, (2011), evaluaron los parámetros hematológicos y naturales del tejido conectivo de alevinos del silúrido (*Rhamdia quelen*) que han sido expuestos a concentraciones subletales (10% de la CL 50-96 h) de glifosato (N-phosphonomethyl glycine, 360 mg/L), este estudio demostró había una reducción significativa en eritrocitos, trombocitos, leucocitos y linfocitos totales en contraste con un aumento significativo en el número de células circulantes inmaduras por lo que llegaron a la conclusión de que el agua contaminada por GP contribuye a alterar los parámetros de las células sanguíneas y a reducir la actividad de los componentes del sistema inmune naturales importantes para mediar la resistencia de los peces a los microorganismos u otros agentes infecciosos.

Ensayos realizados por Sandrini *et al.*, (2013), se homogeneizaron y preincubaron muestras de tejido (cerebro y músculo) de pez cebra (*D. rerio*) y branquias y músculo de mejillón marrón (*Perna perna*) que han sido expuestos a diferentes concentraciones de GP para determinar la actividad de la colinesterasa, los resultados de este estudio señalaron que las concentraciones de GP que inhiben el 50% de la actividad de la colinesterasa (CL 50) varió de 0.62 Mm para músculo de *P. perna* a 8.43Mm para cerebro de *D. rerio* concluyendo así que el GP inhibe la actividad de esta enzima y que además la colinesterasa del mejillón parece ser más sensible a la exposición al GP que la de los peces *D. rerio*. Los pesticidas lo

cual da origen a la acumulación de acetilcolina en la hendidura sináptica y estimula excesivamente el Sistema Nervioso Central (SNC), siendo este mecanismo el responsable de la toxicidad aguda en organismos acuáticos, el alto grado de toxicidad de los compuestos organofosforados se debe a la fosforilación irreversible del GP seguido de la inhibición de la enzima acetil-colinesterasa (Carmona, 2003; Toro-Osorio *et al.*, 2017)

Otro estudio realizado por Li *et al.*, (2017), evaluó la toxicidad de un herbicida a base de GP (Nongtेशhi®), en peces ornamentales (*Carassius auratus*) después de una exposición de 90 días, ellos recolectaron tejidos de cerebro, riñón e hígado y los sometieron a análisis metabólico basados en RMN e inspección histopatológica, además recogieron plasma y midieron los índices bioquímicos en sangre de AST, ALT, BUN, CRE, LDH, SOD, GSH-Px, GR y MDA; obteniendo como resultado que existen perturbaciones significativas en el estrés oxidativo, el metabolismo energético, el metabolismo de los aminoácidos y el metabolismo de los nucleósidos en estos peces, se evidenció que la exposición al GP interfería en el metabolismo de los Aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) y Aminoácidos aromáticos (AAA), desencadenaba la sobreproducción de especies reactivas de Oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo y produciendo así un daño en el metabolismo de los nucleósidos.

Un estudio realizado por Spósito y Molledo (2016), evaluó el efecto tóxico agudo y crónico *in vitro* de GP de amonio (TryGlif) sobre especies que ocupan diferentes niveles tróficos y ambientes físicos, entre ellos zooplancónicos como la pulga de agua (*Daphnia magna*) y se concluyó que esta especie presentó valor de CL50 de 9.59 mg/L lo que implicó variación en importantes procesos en el desarrollo de esta especie.

Un estudio realizado por Menéndez-Helman (2013), evaluó los impactos del GP en dos especies no blanco (peces): madrecita de agua (*Cnesterodon decemmaculatus*) y pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). Los resultados arrojaron que el PMG (N-fosfonometilglicina) no presenta un nivel significativo de toxicidad letal aguda (CL50-96h > 100 mg/L) para *C. decemmaculatus*, pero se obtuvo que la toxicidad de un formulado de PMG es significativamente mayor (CL50-96h = 29 mg/L); esta toxicidad provocó un aumento en la actividad de catalasa e inhibición de la actividad de acetilcolinesterasa, por otro lado, en *O. bonariensis* disminuyó significativamente la Carga Energética de Adenilatos (CEA) en hígado y músculo, las branquias de ambas especies, fueron examinadas por microscopia electrónica de barrido (MEB) encontrando alteraciones ultraestructurales como hipertrofia celular.

Algunas formulaciones pueden ser más tóxicas para peces y otras especies acuáticas como anfibios debido a diferencias en cuanto a toxicidad entre sales y ácidos o a surfactantes utilizados en la formulación (Duarte *et al.*, 2003), por lo tanto se presentan los siguientes datos:

Tabla 2. CL50 para diferentes especies expuestas a GP, a diferentes formulaciones comerciales de GP, a surfactantes y metabolito principal de GP. **Tomada de:** (Nescovik *et al.*, 1996; Monheit, 2003; Sandrini *et al.*, 2013).

Compuesto	Especie	CL50 (concentración letal 50) (mg/L)
Roundup®	Peces	5-26*
	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	8.2 – 27 (NOEL δ = 6.4)**
	Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	15-26***
	Invertebrados	45-37 ppm*
Rodeo®	Peces	=1.000 ppm*
	Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	600-1400 ppm***
	Pulga de agua (<i>Daphnia magna</i>)	930 ppm*
Accord®	Peces	=1.000 ppm*
	Pulga de agua (<i>Daphnia magna</i>)	930 ppm*
Glifosato	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	140 – 240**
AMPA	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	520**
POEA ϕ	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	0.65 – 7.4**

Los anfibios presentan gran interés para la realización de trabajos de investigación en toxicología por sus notables características anatómicas, fisiológicas, reproductivas y ecológicas que ofrecen múltiples posibilidades de estudio en diferentes disciplinas.

La palabra ‘anfibio’ significa ‘vida doble’ lo que hace referencia a su ciclo de vida que incluye una parte acuática y otra terrestre y es esta característica la que clasifica a los anfibios como organismos más vulnerables a diferentes perturbaciones (Mattoon, 2000) y por lo tanto, son excelentes modelos de estudio.

1.1.4 Los anfibios como bioindicadores de contaminación ambiental y modelos de estudio en ecotoxicología

Los bioindicadores están definidos como organismos que brindan información acerca de las condiciones de calidad del ambiente y son estratégicos para determinar con mayor claridad los efectos de los contaminantes que pueden llegar a afectar algún de la cadena trófica (Campbell y Campbell, 2002; Alkorta *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2006).

Los anfibios son tomados como bioindicadores de contaminación ambiental debido a las numerosas características que poseen, este grupo entre esas características se conoce que estos organismos poseen una dependencia muy alta al medio donde viven por lo tanto sus migraciones (si se presentan) son de poca distancia o no se conocen, la permeabilidad cutánea que es más evidente en la parte ventral, huevos sin cascara. Los anfibios presentan un ciclo de vida bifásico, es decir, son organismos dependientes del medio acuático y

terrestre (Blaustein *et al.*, 2003).

Los anfibios son un grupo amenazado y con tasa de extinción alta de especies, por factores entre los que se destacan: la pérdida de hábitat, contaminación ambiental, cambio climático, incremento en la radiación UV-B, aumento de uso de fertilizantes, metales pesados y contaminantes químicos como plaguicidas (Brodeur *et al.*, 2014; Svartz, 2014) siendo la actividad agrícola y la acuicultura son los factores de riesgo principales para los anfibios según la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), (2013) (Figura 1).

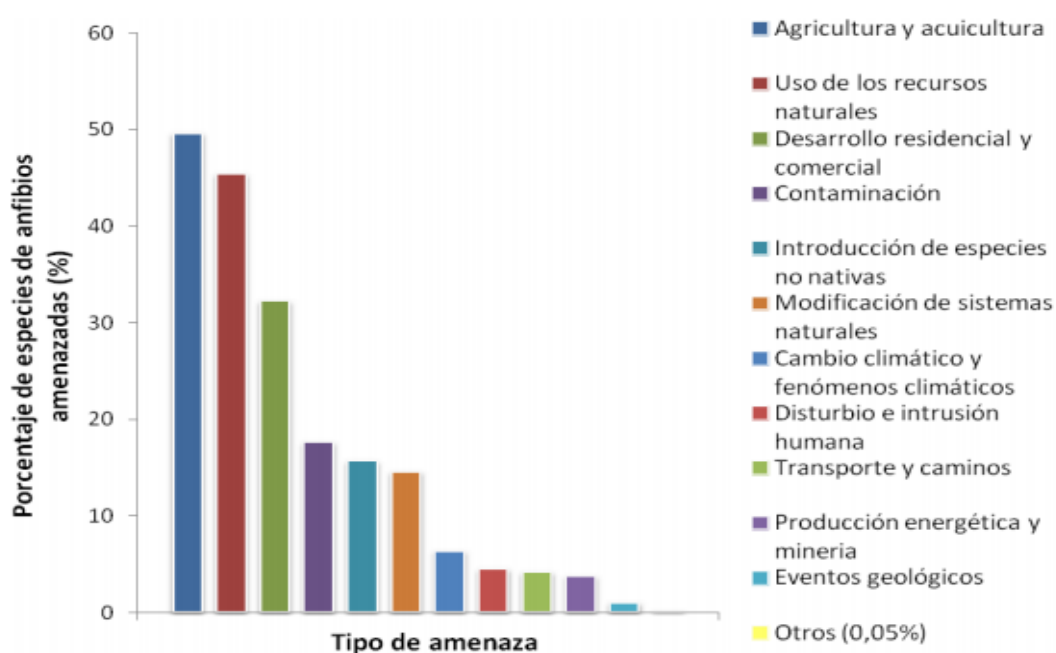


Figura 1. Porcentaje de especies de anfibios amenazadas según distintos factores. **Tomada de:** (IUCN, 2013).

Este grupo se caracteriza por actuar como controlador biológico en diversos ecosistemas desempeñando un papel fundamental en control de plagas de diferentes cultivos lo cual, involucra su permanencia en áreas con constante riego de Agroquímicos y los hace excelentes modelos de estudio para los efectos postexposición (Peltzer *et al.*, 2010).

En cuanto a los anfibios como modelos de estudio en toxicología, hay experimentos bajo condiciones de laboratorio donde se han evaluado el efecto del glifosato en condiciones naturales controladas de Roundup® Activo en diferentes familias de anfibios (Bufonidae: *Rhinella marina*, *R. Humboldti*; Hylidae: *Hypsiboas crepitans*; Leptodactylidae: *Engystomops pustulosus*) donde los resultados exponen que la mortalidad de estos individuos es mayor cuando están expuestos a herbicidas en condiciones de laboratorio (Henao-Muñoz *et al.*, 2013) esta diferencia de efecto se debe a que la capa vegetal ayuda en el proceso de degradación del Roundup® (Henao-Muñoz *et al.*, 2015).

Los autores anteriormente mencionados encuentran que en condiciones de laboratorio y natural, la especie más tolerante es *Engystomops pustulosus* y la más sensible es *Rhinella marina*, con cambios en el tamaño corporal y retraso en el desarrollo de los individuos, estos resultados permiten suponer que el efecto del glifosato en otras especies será más evidente ya que las especies evaluadas de la familia Bufonidae, es decir, los que presentan la piel más gruesa, que se supondría hace los especímenes menos susceptibles (Henao-Muñoz *et al.*, 2013).

En un trabajo realizado con larvas de ranas australianas (*Crinia insignifera*, *Heleioporus eyrei*, *Limnodynastes dorsalis*, y *Litoria moorei*), los autores evaluaron el efecto del glifosato en forma de sal ácida de isopropilamina en larvas y adultos de ranas encontrando variación a través de las especies, siendo la especie de *L. moorei* la más afectada, ellos también proponen que el estado larval es más sensible al glifosato que los estadios adultos (Mann *et al.*, 2009). Luego, al estudiar las larvas de *Scinax nasicus* expuestas a Roundup® se hallaron malformaciones externas como deformidades de cráneo, boca, ojos, cola y alteraciones en el esqueleto hiobranquial de las larvas (Lajmanovich *et al.*, 2003).

Se han hecho estudios del efecto del glifosato en las larvas y adultos de anfibios de diferentes familias, sin embargo, los trabajos son escasos o presentan resultados de mortalidad sin determinar alteraciones histopatológicas (Bustos, 2012).

1.1.5 Impacto de agroquímicos en Anfibios

Se ha reportado que los pesticidas afectan de manera negativa diferentes organismos desde microorganismos hasta vertebrados superiores (de Arcaute *et al.*, 2020). Estas sustancias afectan el medio ambiente debido a que los residuos quedan en el suelo y por escorrentía pueden llegar a ecosistemas acuáticos (Martínez y Cruz, 2009) afectando a los anuros por ser un taxón que posee diferentes etapas de vida, es decir, en su fase acuática (huevos embriones, renacuajos) y de adultos, los cuales pueden verse afectados frente a otras problemáticas por una exposición crónica causando impactos negativos en la salud de la población (Greulich y Pflugmacher, 2003; Larramendy, 2017).

Actualmente hay diferentes trabajos que exponen consecuencias del uso de agroquímicos (pesticidas y fertilizantes) en el medio ambiente, sin embargo, sin embargo, se desconoce si la exposición y la sensibilidad de los anfibios terrestres son comparables a la exposición y la sensibilidad de mamíferos y aves (Brühl *et al.*, 2011).

La disminución global de anfibios se ha atribuido especialmente al hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) que causa la enfermedad Quitridiomycosis (Daszak *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2004) sin embargo, diferentes autores exponen otras causas que promueven el declive poblacional de anfibios (Brodeur *et al.*, 2014; Svartz, 2014).

La exposición a pesticidas tiene consecuencias negativas para los anfibios en sus etapas embrionarias acuáticas, larvales, durante y después de la metamorfosis (Van Meter *et al.*, 2019). Se ha demostrado que el efecto de la constante exposición de pesticidas en anfibios generan deformidades, desarrollo lento o nulo, perturbación endocrina e inmune, aumento de la susceptibilidad y la muerte (Baker *et al.*, 2013).

Estudios *in vitro* de Brühl *et al.*, (2011) demostraron que en anfibios existe una significativa absorción cutánea de productos químicos además el paso percutáneo es mayor en anfibios que en mamíferos que causa la inhibición de la producción de colinesterasa, generando movimientos erráticos, cambios drásticos del peso corporal, por una baja o nula alimentación y finalmente pueden ocasionar la muerte como consecuencias a exposición de pesticidas en anfibios juveniles y adultos (Brühl *et al.*, 2011).

Se ha registrado que tan solo una aplicación de pesticida influye en la migración de individuos por especie coincidentes (1 al 87%) y causa variaciones en las densidades poblacionales y reproducción (Lenhardt *et al.*, 2015; Van Meter *et al.*, 2019) es importante resaltar que existen especies con bajas tasas de migración lo que las hace especies susceptibles con una mayor vulnerabilidad.

Un estudio de campo de Allran y Karasov, (2000) demostró que el herbicida Atrazina permitió la abundancia de trematodos en estadios larvarios en *Lithobates pipiens*, estos trematodos con debilitantes cutáneos en anfibios incrementando entre un 51 y 74% la abundancia de estos parásitos porque permite huéspedes intermedios como algas y caracoles y al mismo tiempo provoca una inmunosupresión en renacuajos y adultos de *L. pipiens*.

1.1.6 Alteraciones histopatológicas en anfibios por exposición a herbicidas

Un estudio realizado en Argentina por Bach *et al.* (2018) comparó histológicamente efectos subletales de la formulación de glifosato Roundup Ultramax® y el ingrediente activo de glifosato en hígado de renacuajos de *Leptodactylus latrans* comúnmente conocidos como rana criolla o rana sapo llanera, las concentraciones evaluadas fueron (0.37 mg a.e./L) y de glifosato (3 mg/L), encontrando que la exposición a Roundup Ultramax® incrementó de manera significativa el número de células melanomacrófágicas y centros melanomacrófágicos, las lesiones histológicas fueron descritas como lipídisis y congestión hepática.

Otro estudio expuesto por Pérez-Iglesias *et al.*, (2016) demuestra que al exponer individuos de *Leptodactylus latinasus* a concentraciones de glifosato puro de 100, 1000, y 10,000 µg g⁻¹ el hígado incrementa el área de melanina desde la concentración más baja, cambia la ocurrencia de pigmentos de catabolismo hepático en melanomacrófagos, hay hipervascularización hepática, vacuolización del citoplasma de hepatocitos y se promueven las anomalías nucleares de los eritrocitos desde la concentración más baja. El glifosato altera la respuesta de los diferentes pigmentos hepáticos (melanina, hemosiderina y lipofusina) y esto se puede asociar con la respuesta de melanomacrófagos con los cambios ambientales y las características fisiológicas de cada especie (Pérez-Iglesias *et al.*, 2016), este aumento en los pigmentos de melanomacrófagos se ha evidenciado en peces y anuros y se vinculan a una función protectora y de detoxificación contra el glifosato (Pascoli *et al.*, 2011).

En Norte América Fuentes *et al.*, (2011), han evaluado la toxicidad de dos formulaciones de glifosato (Roundup® 1.80 a 4.22 mg de equivalente de ácido (a.e) / L y Roundup® WeatherMAX1 1.96 a 3.26 mg de a.e / L, en seis especies de anuros; rana toro (*Rana catesbeiana*), rana verde, (*R. clamitans*), rana leopardo del sur (*R. sphenocephala*), rana leopardo del norte (*R. pipiens*), sapo de Fowler (*Bufo fowleri*), y la rana arbórea gris de Cope (*Hyla chrysoscelis*), estas especies fueron seleccionadas debido a la coincidencia de su

época reproductiva en estaciones con aplicaciones de herbicidas, los valores de LC_{50} determinaron que las especies más sensibles a exposiciones de Roundup® WeatherMAX fueron *H. chrysoscelis* y *R. clamitans*, mientras que *R. catesbeiana* y *B. fowleri* fueron más sensibles a la formulación original (Roundup®).

En Colombia se combina el Roundup® Activo con Cosmo-Flux®411F para aumentar la penetración y la actividad del herbicida y así facilitar la erradicación de cultivos ilícitos (Solomon *et al.*, 2005). Henao *et al.*, (2015) evaluaron los efectos tóxicos y subletales agudos en el desarrollo embrionario, tamaño y rendimiento natatorio en renacuajos de especies Colombianas: *Rhinella humboldti*, *Engystomops pustulosus*, *Hypsiboas crepitans* y *Rhinella marina*. En este estudio se determinó que los embriones y los renacuajos de *E. pustulosus* eran los más resistentes a la aplicación de la mezcla de Roundup ® Activo y Cosmo-Flux ® 411F (CL_{50} = 3.904 µg a.e / L; CL_{50} = 2.799 µg a.e / L) mientras que los embriones y los renacuajos de *H. crepitans* mostraron la mayor sensibilidad (LC_{50} = 2.203 µg a.e / L; LC_{50} = 1.424 µg a.e / L, respectivamente), sin embargo, al evaluar efectos en microcosmos no se encontró toxicidad ni se observaron respuestas subletales en los embriones y renacuajos de las especies evaluadas.

Los estadios tempranos de anfibios presentan branquias que se ven afectas por los tensioactivos como lo evidenciado en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), porque formulaciones de glifosato y sus tensioactivos causan lisis en las células epiteliales branquiales y afectan la capacidad de las branquias para mantener el equilibrio osmótico en diferentes organismos acuáticos (Edginton *et al.*, 2004; Henao *et al.*, 2015).

En el año (2020) Arcaute *et al.*, evaluaron efectos tóxicos agudos e interacciones predominantes de diferentes presentaciones de glifosato o (100.0, 820.0 y 2.0 mg/L) de GLY, DIC (glifosato-dicamba) y GLY-FLC (glifosato- flurocloridona) contenidos en Credit®, Banvel® y Gold® en renacuajos de *Rhinella arenarum*, encontrando que las combinaciones de GLY-DIC (glifosato-dicamba) y GLY-FLC (glifosato- flurocloridona) tienen efectos letales en estos organismos y señalan que es necesario análisis adicionales que incluyan efectos reales de mezclas de GP, efectos genotóxicos y bioquímicos.

1.1.7 Tejido Epitelial en Vertebrados (anfibios)

El tejido epitelial o piel recubre la superficie del cuerpo, reviste cavidades corporales y forma glándulas; el epitelio se puede describir como simple, estratificado, plano o escamoso, cubico y cilíndrico (Ross y Pawlina, 2013). Este tejido está conformado por tres capas: la epidermis, dermis e hipodermis, siendo la epidermis (Fig. 2) la capa más superficial cubierta por diferentes estratos (Velásquez *et al.*, 2008).

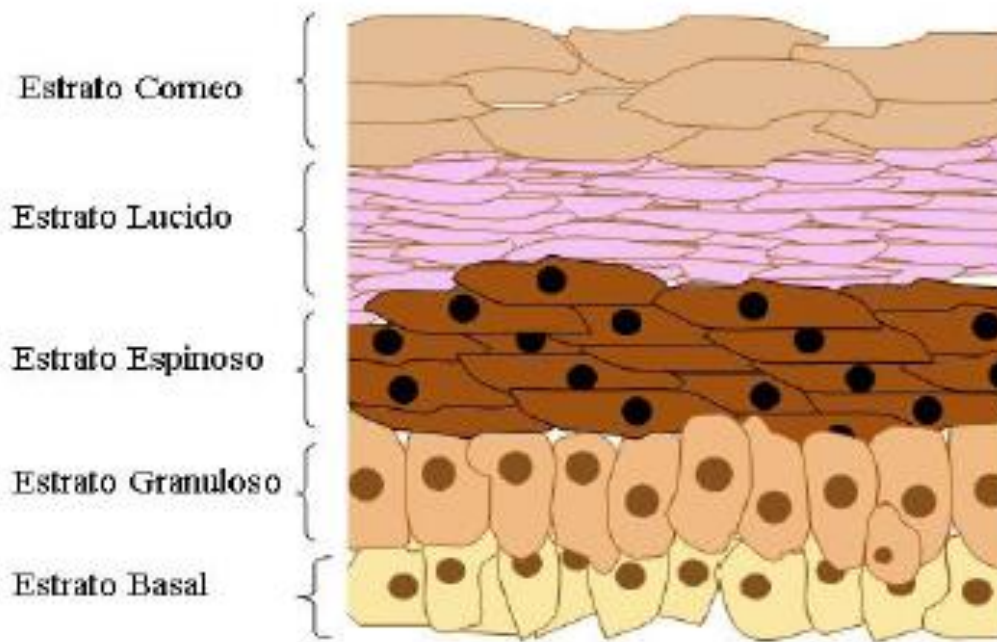


Figura 2. Estructura de la epidermis y su división por estratos. **Tomado de:** (Velásquez *et al*, 2008).

La dermis está formada por tejido conjuntivo que se adhiere a la epidermis y contienen células glandulares (mucosas y serosas) y células pigmentarias (Ross y Pawlina, 2013). En anfibios, la dermis es la capa que le confiere características únicas a estos organismos y puede estar influenciada por el período estacional, factores ambientales, oferta de alimento o por presencia de células pigmentarias que se encuentre en la región dérmica compacta (Felsemburg y De Brito-Gitirana, 2008).

Finalmente la capa hipodermis que se caracteriza por ser la capa más profunda del tejido tegumentario con tipos celulares como fibroblastos, células adiposas y macrófagos (Ross y Pawlina, 2013).

1.1.8 Generalidades y biología de la Rana Sabanera (*D. molitor*)

Esta especie es reconocida como la rana altoandina neotropical ya que es endémica de los Andes Orientales de Colombia y es posible obtener registros de abundancia (Guarnizo *et al.*, 2014) en cuerpos de agua permanentes y lénticos (Pinto-Erazo *et al.*, 2016), habita en la Cordillera Oriental de Colombia y Cordillera de Mérida en Venezuela. *D. molitor* se ha registrado en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, es decir, entre 2000 y 3600 m.s.n.m. Esta especie cuenta con una amplia variación de tamaño corporal llegando a tener desde 29 a 55 mm de longitud dorso-cloacal, su coloración puede ir desde marrón, marrón con manchas verdes, verdes con líneas oscuras o manchas negras (Figura 3) (Amézquita, 1999), también presentan dimorfismo sexual donde las hembras son más grandes que los machos, su reproducción se lleva a cabo en cuerpos de agua lénticos rodeados por pastizales y arbustos (Guarnizo *et al.*, 2012).

Esta especie mantiene una estrecha asociación con áreas altamente perturbadas antropogénicamente y se distribuye a lo largo de un amplio gradiente altitudinal (1950 a 3600

msnm), sin embargo, se ha visto amenazada por las constantes aplicaciones de pesticidas (Relyea, 2005). *D. molitor* es un modelo ideal para estudiar el nicho futuro relacionados a cambio climático global y actividad antropogénica siempre y cuando se considere que su presencia está condicionada por la existencia de lagunas o charcas (naturales y artificiales), y estos cuerpos de agua estén libres de contaminantes (Guarnizo *et al.*, 2009; Guarnizo *et al.*, 2014).



Figura 3. Variación en el patrón de coloración en *D. molitor*. **Tomado de:** (Guarnizo *et al.*, 2014)

Los renacuajos están presentes durante todo el año debido a sus factores fisiológicos especializados para temperaturas bajas y fluctuantes (Navas, 2006), esta especialización hace de *D. molitor* un modelo de estudio adecuado para la caracterización histomorfológica completa en las condiciones actuales y así permitir reconocer cambios histomorfométricos relacionados al uso de la tierra y contaminantes (Pinto-Erazo *et al.*, 2016).

Esta especie en principio fue registrada como uno de los representantes del Género *Hyla* y su nombre ha cambiado a lo largo del tiempo de la siguiente manera:

- *Hyla molitor* (Schmidt, 1857)
- *Hyla labialis* (Peters, 1863)
- *Hyla molitor marmorata* (Schmidt, 1857)
- *Hyla molitor* (Nieden, 1923)
- *Hyla molitor* (Savage y Heyer, 1969)
- *Hyla molitor* (Duellman, 1970)
- *Hyla molitor molitor* (Cochran y Goin, 1970)
- *Hyla labialis* (Duellman, 1977)
- *Hyla molitor* (Duellman, 1977)
- *Hyla labialis* (Ruiz-Carranza *et al.*, 1996)
- *Hyla molitor* (Duellman, 2001)
- *Dendropsophus labialis* (Faivovich *et al.*, 2005)
- *Dendropsophus labialis* (Guarnizo *et al.*, 2012)

- *Dendropsophus luddeckei* (Guarnizo et al., 2012)

Actualmente la taxonomía según Jungfer, (2017) de esta especie es **Reino:** Animalia, **Filo:** Chordata, **Clase:** Amphibia, **Orden:** Anura, **Familia:** Hylidae, **Genero:** *Dendropsophus*, **Especie:** *Dendropsophus molitor* (Schmidt, 1857).

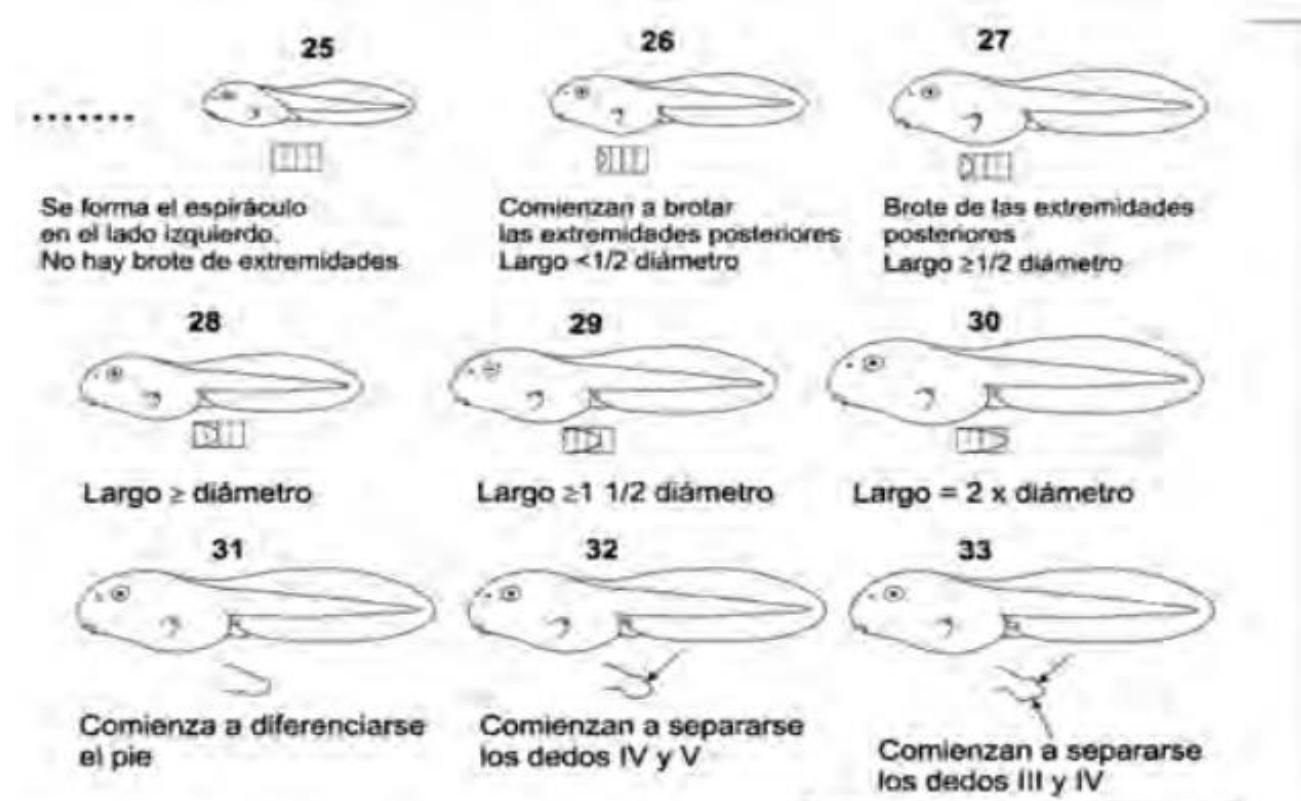
1.1.9 Tablas de desarrollo embrionario de anfibios/*D. molitor*

Las tablas de desarrollo embrionario son especialmente necesarias para aquellas especies de animales que se emplean con mayor frecuencia en investigación como los anfibios (Sarria-Rendón, 2010) porque permiten establecer diferentes etapas de desarrollo indicando el grado de madurez del embrión (Balinsky, 1983).

Tabla 3. Desarrollo embrionario de la rana sabanera *D. molitor* a una temperatura de 29° C
Tomada de: (Sarria-Rendón, 2010).

Numero del estadio	Nombre del estadio	Tiempo entre cada estadio	Edad total en horas	Tamaño promedio del embrión. mm
1	Oocito sin fertilizar		0.00'	1.32
2	Oocito fertilizado	0.4'	0.4'	1.44
8	Blástula media	4.03'	4.07'	1.68
9	Blástula tardía	2.17'	6.20'	1.72
10	Gástrula temprana	4.00'	10.20'	1.9
11	Gástrula media	6.10'	16.30'	1.94
12	Gástrula tardía	7.07'	23.37'	1.98
13	Placa neural	1.33'	25.10'	2.02
14	Pliegue neural	1.55'	27.05'	2.04
15	Tubo neural	1.15'	28.20'	2.6
16	Botón caudal	3.00'	31.20'	3.34
17	Contracción muscular	11.00'	42.20'	5
18	Latido cardiaco	6.25'	48.45'	5.1
19	Circulación branquial	6.35'	55.20'	5.24
20	Apertura de boca	17.45'	73.05'	5.9
21	Circulación caudal	19.55'	93.00'	6.92
22	Pliegue opercular	9.30'	102.30'	6.96
23	Cierre del opérculo derecho	13.50'	116.20'	8.2
24	Cierre del opérculo completo	15.40'	132.00'	9.3

Según Gosner (1960), existen 46 estadios que comprenden todo el desarrollo embrionario de anfibios desde el oocito sin fertilizar hasta el estadio metamorfo completamente maduro, a continuación (Figura 3 y 4) se presentan los estadios y sus eventos principales.



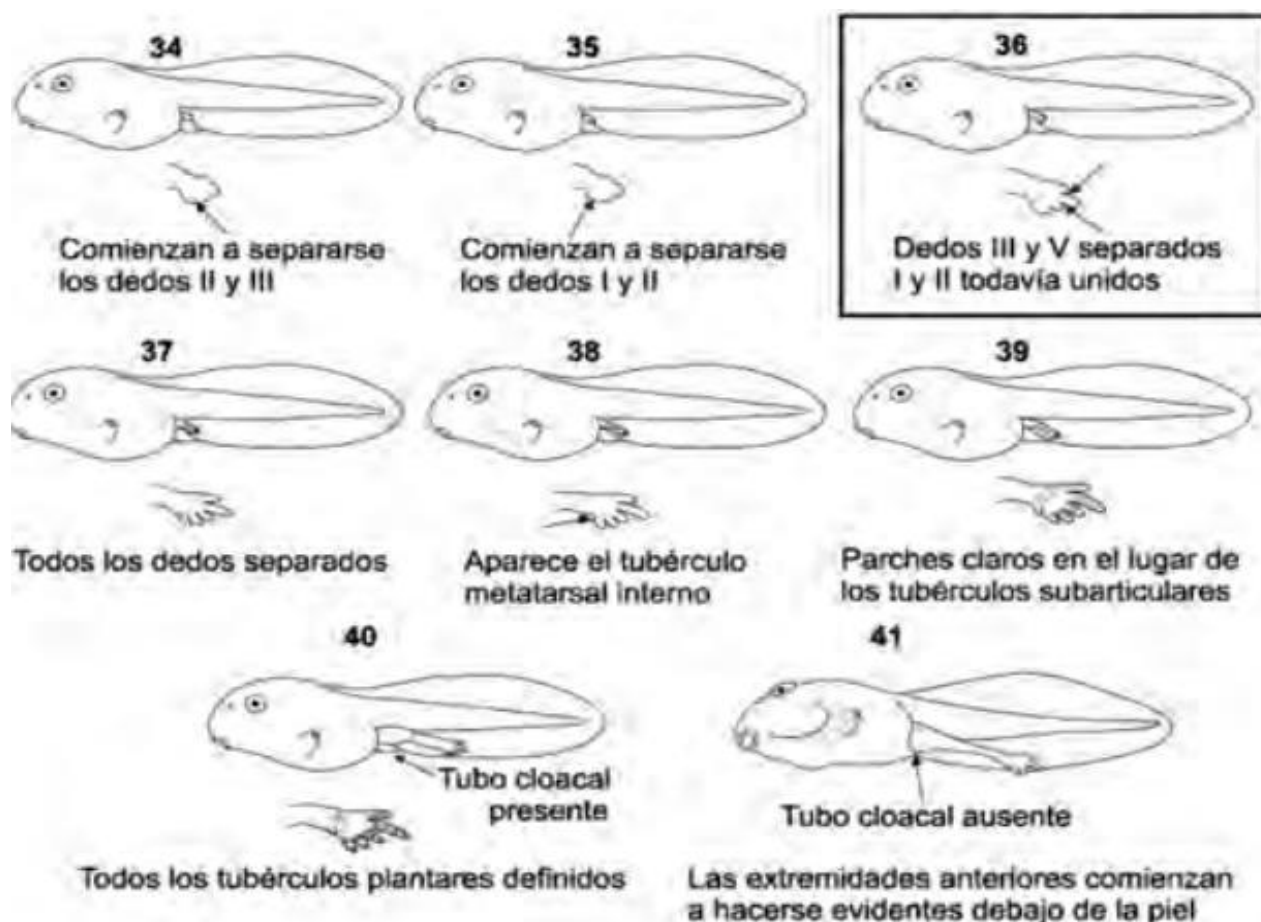


Figura 4. Eventos importantes a partir del estadio 25 hasta el estadio 41 (etapa final larva). Tomado de: (Gosner, 1960).

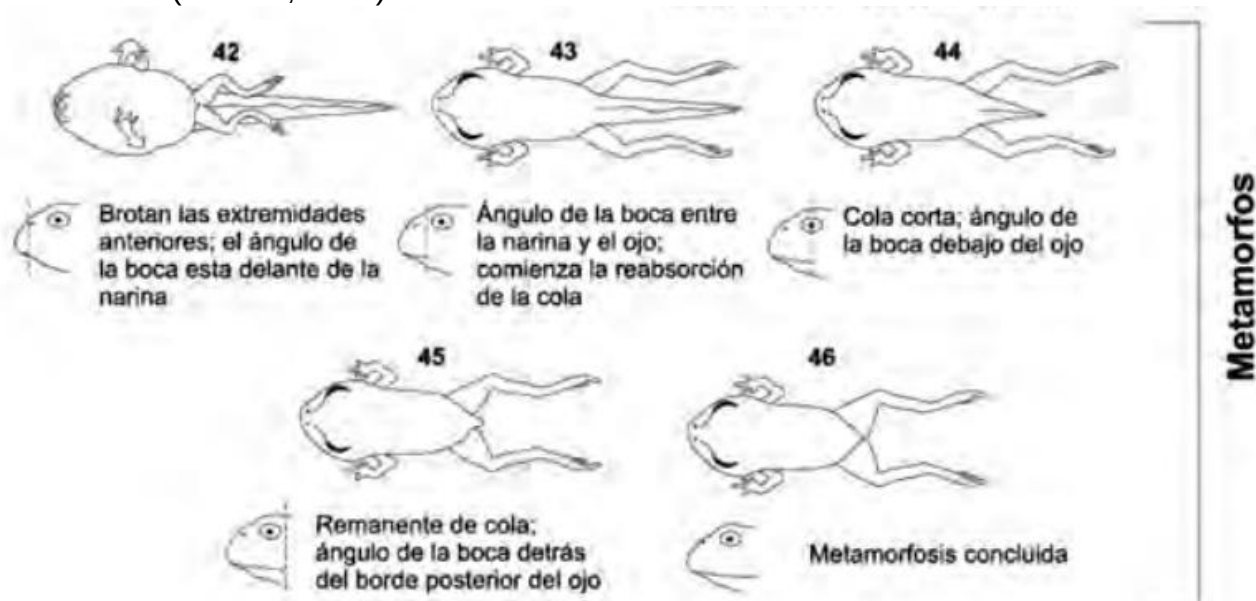


Figura 5. Eventos importantes a partir del estadio 42 hasta la 46, individuos metamorfos. Tomado de: (Gosner, 1960).

1.2 Metodología para la revisión

Para responder interrogantes que se derivan de las temáticas propuestas para esta revisión se hizo un mapeo de diversos artículos científicos relacionados con ecotoxicología reconociendo los diferentes enfoques de estudio. Las bases de datos usadas fueron SCOPUS, Scielo, ScienceDirect y Springer. Esta búsqueda se hizo entre marzo 2020 y octubre de 2020.

1.3 Discusión

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), (2000), expone que cada persona alcanza una ingesta diaria aproximada de 2700 kcal, esta situación hace que el acceso a los alimentos se convierta en una gran problemática y por ello, la agricultura se convierte en el eje central de la economía mundial (Bustos, 2012).

En los últimos años la actividad agrícola se ha dedicado a incrementar el rendimiento de los cultivos lo que ha permitido una producción masiva y uso de sustancias químicas con el fin de combatir diferentes enfermedades (Reyes *et al.*, 2003). Esto no solo representa un problema por la constante adición de sustancias químicas al ambiente, sino también a que esta actividad solo es posible en grandes extensiones de tierras para satisfacer la demanda del consumo humano lo que ocasiona pérdida y fragmentación de hábitat para especies terrestres y acuáticas (Brodeur *et al.*, 2014).

Los productos utilizados para erradicar o inhibir la actividad de un organismo son los plaguicidas. Martínez y Cruz (2009), exponen que los plaguicidas no solo representan un problema en la Salud Pública mundial debido a que las intoxicaciones relacionadas con estos productos son más frecuentes en países en desarrollo, sino que también afectan al ambiente porque los residuos quedan en el suelo y por escorrentía llegan a ecosistemas acuáticos por lo que los organismos presentes en estos son susceptibles a exposiciones de plaguicidas (Yáñez *et al.*, 2002; Dung *et al.*, 2012; Solomon, 2005).

Uno de estos pesticidas y específicamente el herbicida de glifosato, explica Sicard (2005), tiene una persistencia mayor en tierra que en cuerpos de agua, sin embargo, mezclas como Roundup (que contienen glifosato y surfactante), es decir, se le suma otro aditivo tóxico como (POEA), resultan ser más peligrosas que el principio activo (Murtaza y Stallings, 2001), se ha demostrado que la POEA que se encuentra en el Roundup® Activo interfiere con la respiración cutánea de las ranas y la respiración branquial en renacuajos (Henao *et al.*, 2015). Además, la toxicidad de esta mezcla es más peligrosa en ecosistemas acuáticos y no solo está limitada a anfibios sino también a insectos, peces e invertebrados (Georgieva *et al.*, 2018).

Existen estudios de anfibios en estadios larvales ya que son más sensibles a algún cambio en las condiciones del medio en que habitan (Hayes *et al.*, 2010), sin embargo, estos estudios no muestran alteraciones histopatológicas en órganos de interés toxicológico como la piel (Mann *et al.*, 2009).

Los anfibios que se reproducen en campos agrícolas están expuestos a niveles altos de fitosanitarios y pueden sufrir consecuencias a nivel poblacional, además, poseen una piel

altamente permeable que los hace más susceptibles que otros vertebrados a las variaciones ambientales (Carabio, 2017).

Actualmente se conocen diferentes estudios y posturas sobre los efectos del glifosato y sus productos formulados sobre organismos acuáticos, además de variadas revisiones en diferentes partes del mundo sobre el destino ambiental del mismo (Veiga *et al.*, 2001; Battaglin *et al.*, 2005; Sorensen *et al.*, 2006), sin embargo, son necesario estudios que evalúen los efectos histopatológicos en organismos expuestos a este herbicida. Estudios de persistencia de glifosato en suelo Pérez-Iglesias *et al.*, (2016) exponen la necesidad de ampliar conocimiento a nivel histológico en anuros, la mayoría de estudios se enfocan en concentraciones letales y pocos de ellos en concentraciones subletales sin tener claro conocimiento de efectos sistémicos del glifosato.

En recientes estudios se ha encontrado que los anfibios son organismos apropiados para la realización de ensayos de toxicidad por su papel en las cadenas tróficas y porque están directamente afectados por los contaminantes que se puedan llegar a encontrar en cuerpos de agua (Boyer y Grue, 1995; Svartz *et al.*, 2012). Linder *et al.*, (2003) exponen que los anfibios son fisiológicamente únicos y ecológicamente importantes, pero en la actualidad ninguna agencia regulatoria exige datos de toxicidad en los mismos, por lo cual la determinación de los efectos directos e indirectos de los agroquímicos en estos organismos se considera una necesidad general de investigación.

Se hace esta propuesta porque en la actualidad se conoce poco respecto a la toxicidad y el efecto de los pesticidas, como el Glifosato y sus formulaciones sobre este grupo de organismos (Mann *et al.*, 2009; Hayes *et al.*, 2010; Brodeur, 2011). Aunque se ha reportado que la toxicidad en los anfibios de algunos productos formulados de glifosato es mayor que la del ingrediente activo (Brodeur, 2011).

Diversos estudios han demostrado que el glifosato y sus presentaciones comerciales es adsorbido por los componentes del suelo, como arcillas, óxidos de hierro y ácidos húmicos, pero en Colombia solo hay un estudio de glifosato y su permanencia en el suelo y como resultado se ha obtenido que la persistencia del mismo en suelos de bosque y cultivos puede llegar hasta los 11000 días, esto sin considerar algún efecto negativo en organismos dependientes de estos ecosistemas (Cuervo y Fuentes, 2014).

1.4 Conclusiones

De esta revisión se concluye que hay diversos trabajos que atribuyen efectos negativos en diferentes organismos especialmente en anfibios al usar pesticidas cuyo producto activo sea glifosato y sus diferentes presentaciones comerciales a las cuales se les adicionan compuestos más tóxicos como los surfactantes; lo anterior demuestra que persiste la necesidad de profundizar diferentes estudios toxicológicos para determinar con claridad efectos ecológicos, bioquímicos, genéticos, fisiológicos e histopatológicos, especialmente en especies nativas, que continuamente están interactuando con estos xenobióticos.

1.5 Bibliografía

1. Alkorta, I., Aizpurua, A., Riga, P., Albizu, I., Amezaga, I., Garbisu, C. (2003). Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. *Environmental Health*, 18(1), pp. 65-73.
2. Allran, J. W., and Karasov, W. H. (2000). Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in the laboratory from posthatch through metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(11), 2850-2855.
3. Amézquita, A. (1999). Color pattern, elevation and body size in the high Andean frog *Hyla labialis*. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 23: 231-238.
4. Bach, N. C., Marino, D. J., Natale, G. S., and Somoza, G. M. (2018). Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 202, 289-297.
5. Balinsky, B. 1983. *Introducción a la Embriología. Animales Pluricelulares*. Editorial Omega. Quinta edición. Barcelona. España. Pag 727.
6. Baker NJ, BA Bancroft, TS Garcia. (2013). A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. *Sci Tot Environ* 449:150-156.
7. Battaglin, W. A.; Kolpin, D. W.; Scribner, E. A.; Kuivila, K. M.; Sandtrom, M. W. (2002). Glyphosate, other herbicides, and transformation products in Midwestern streams. *Journal of the American Water Resources Association*, v.41, n.2, p.323-332, 2005.
8. Bermeo-López, J. A. (2014). Repercusiones jurídicas de las fumigaciones con glifosato a los cultivos ilícitos en Colombia y el impacto ambiental en la frontera colombo ecuatoriana
9. Berny, P. (2007). Pesticides and the intoxication of wild animals. *J. Vet. Pharmacol Therap.*(30), 93-100.
10. Blaustein, A. R., Romansic, J. M. and Kiesecker, J. M. (2003). Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, 9:123-140.
11. Brodeur, J. C., Poliserpi, M. B., D'Andrea, M. F., and Sánchez, M. (2014). Synergy between glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American toad *Rhinella arenarum*.
12. Brühl, C. A., Pieper, S., & Weber, B. (2011). Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(11), 2465-2472.

13. Boyer R, Grue CE. (1995). The need for water quality criteria for frogs. *Environ Health Perspect.* 103:352-355.
14. Bustos, M. (2012). Destino ambiental del glifosato en una zona arrocerá del Tolima, Colombia. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Agronomía, Escuela de Posgrados Bogotá, DC, Colombia.
15. Campbell, K., Campbell, T. (2002). A logical starting for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: A review of available data. *Environmental Toxicology and chemistry*, 21(5), p.894-901.
16. Carabio Foti, M. M. (2017). Mapa predictivo de fuentes de contaminación difusa de fitosanitarios y caracterización del impacto sobre las comunidades de anfibios, en una microcuenca del río Santa Lucía.
17. Carmona J. (2003). Valores de referencia de colinesterasa plasmática con los métodos de Michel, EQM y Monotest en población laboral activa del departamento de Antioquia, Colombia. *Biomédica*; 23(4): 437-455.
18. Cochran, D. M. and C. J. Goin (1970). *Frogs of Colombia*. United States National Museum Bulletin, 288: 1–655.
19. Cuervo, J. L., y Fuentes, C. L. (2014). Mineralización y adsorción del ¹⁴C-glifosato en muestras de tres tipos de suelo provenientes de El Espinal, Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38(148), 287-297.
20. Daszak, P., Cunningham, A. A. and Hyatt, A. D. (2003). Infectious disease and amphibian population declines. *Divers. Distrib.* 9, 141–150.
21. De Arcaute, C. R., Brodeur, J. C., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2020). Toxicity to *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura, Bufonidae) of herbicide mixtures commonly used to treat fallow containing resistant weeds: glyphosate–dicamba and glyphosate–flurochloridone. *Chemosphere*, 245, 125623.
22. Devendar, P., and Yang, G. F. (2019). Sulfur-containing agrochemicals. In *Sulfur Chemistry* (pp. 35-78). Springer, Cham.
23. Duarte, W. R., Barragán, I. R., y Mocha, P. E. (2003). Efectos del glifosato (GP) con énfasis en organismos acuáticos (Revisión de Literatura). *Orinoquia*, 7(1-2), 70-100.
24. Duellman, W. E. (1970). *Hylid frogs of Middle America*. Monographs of the Museum of Natural History, University of Kansas, 1: 1–753.

25. Duellman, W. E. (1977). Das Tierreich. Liste der rezenten Amphibien und Reptilien. Hylidae, Centrolenidae, Pseudidae, 95:1–225. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
26. Duellman, W. E. (2001). Hylid frogs of Middle America. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ithaca, 1159 pp.
27. Dung, T. P., Connell, D., Miller, G., Rutherford, S., and Chu, C. (2012). Pesticide regulations and farm worker safety: The need to improve pesticide regulations in Viet Nam. Bulletin of the World Health Organization, 90(6), 468-473.
28. Edginton, A., Sheridan, P., Stephenson, G., Thompson, D. y Boermans, H. (2004). Efectos comparativos del herbicida pH y Visión en dos etapas de la vida de cuatro especies de anfibios anuros. Toxicología ambiental y química, 23, 815-822.
29. Eslava Mocha, P. R., Ramírez Duarte, W. F., y Rondón-Barragán, I. S. (2007). Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: Impacto sobre peces nativos. Universidad de los Llanos. Colombia.
30. Faivovich, J., C. F. B. Haddad, P. C. A. Garcia, D. R. Frost, J. A. Campbell and W. C. Wheeler (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. – Bulletin of the American Museum of Natural History, 294: 1–240.
31. Felsemburgh, F. A. y De Brito-Gitirana, L. (2008). Avaliação morfológica do tegumento de fêmeas de *Proceratophrys boiei*. Espaço e Geografia 11 (1): 59-72.
32. Fuentes, L., Moore, L. J., Rodgers Jr, J. H., Bowerman, W. W., Yarrow, G. K., & Chao, W. Y. (2011). Comparative toxicity of two glyphosate formulations (original formulation of Roundup® and Roundup WeatherMAX®) to six North American larval anurans. Environmental Toxicology and Chemistry, 30(12), 2756-2761.
33. Georgieva, E., Yancheva, V., Velcheva, I., Mollov, I., Todorova, K., Tomov, S., Stoyanova, S. (2018). Glyphosate-based herbicide alters the histological structure of gills of two economically important cyprinid species (common carp, *Cyprinus carpio* and bighead carp, *Aristichthys nobilis*). Applied Ecology & Environmental Research, 16(3), 2295-2305.
34. Gosner, K. L., and Rossman, D. A. (1960). Eggs and larval development of the treefrogs *Hyla crucifer* and *Hyla ocularis*. Herpetologica, 16(4), 225-232.
35. Greulich, K., and Pflugmacher, S. (2003). Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. Aquatic Toxicology, 65(3), 329-336.

36. Guarnizo, C.E.; Amézquita, A. and Bermingham, E. 2009. The relative roles of vicariance versus elevational gradients in the genetic differentiation of the high Andean tree frog *Dendropsophus labialis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 84-92.
37. Guarnizo, C. E., C. Escallón, D. Cannatella and A. Amézquita (2012). Congruence between acoustic traits and genealogical history reveals a new species of *Dendropsophus* (Anura: Hylidae) in the high Andes of Colombia. *Herpetologica*, 68: 523–540.
38. Guarnizo, C.E.; Armesto, O. y Acevedo, A. (2014). *Dendropsophus labialis* Peters, 1863. *Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia* 2: 56-61.
39. Haney R., Senseman S., Hons F. (2002). Effect of Roundup Ultra on microbial Activity and biomass from selected soils. *J Environ Qual.* 31(3): 730-735.
40. Hayes, T.B., Falso, P., Gallipeau, S., Stice, M. (2010). The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's Perspective. *J. Exp. Biol.* 213: 921-933.
41. Henao Muñoz, L. M., Montes Rojas, C. M., and Bernal Bautista, M. H. (2015). Acute toxicity and sublethal effects of the mixture glyphosate (Roundup® Active) and Cosmo-Flux® 411F to anuran embryos and tadpoles of four Colombian species. *Revista de biología tropical*, 63(1), 223-233.
42. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2016). Estadísticas de comercialización de plaguicidas químicos de uso agrícola 2010. Bogotá DC, Boletín Técnico No. 00.02, 78
43. IUCN (2013). IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2013.2. www.iucnredlist.org
44. Jungfer, K. H. (2017). On Warszewicz's trail: the identity of *Hyla molitor* O. Schmidt, 1857. *Salamandra*, 53(1), 18-24.
45. Kaczewer J. (2002). Toxicología del glifosato: Riesgos para la salud humana. Universidad Nacional de Buenos Aires.
46. Kreutz, L. C., Barcellos, L. J. G., de Faria Valle, S., de Oliveira Silva, T., Anziliero, D., dos Santos, E. D., and Zanatta, R. (2011). Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish & shellfish immunology*, 30(1), 51-57.
47. Lajmanovich, R. C., Sandoval, M. T., and Peltzer, P. M. (2003). Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 70(3), 0612-0618.

48. Larramendy, M. L. (2017). *Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Terrestrial Models* (Vol. 32). Royal Society of Chemistry.
49. Lenhardt, P. P., Brühl, C. A., and Berger, G. (2015). Temporal coincidence of amphibian migration and pesticide applications on arable fields in spring. *Basic and Applied Ecology*, 16(1), 54-63.
50. Li, M. H., Ruan, L. Y., Zhou, J. W., Fu, Y. H., Jiang, L., Zhao, H., and Wang, J. S. (2017). Metabolic profiling of goldfish (*Carassius auratus*) after long-term glyphosate-based herbicide exposure. *Aquatic Toxicology*, 188, 159-169.
51. Linder, G., Krest, S. K., and Sparling, D. W. (2003). *Amphibian Decline: An Integrated Analysis of Multiple Stressor Effects*, Pensacola, FL, USA: Society of Environmental Toxicology and Chemistry.
52. Mann, R.M., Hyne, R.V., Choung, C.B., Wilson, S.P. (2009). Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environ. Pollut.* 157: 2903-2927.
53. Mañas, F. (2010). Genotoxicidad de glifosato y su principal metabolito AMPA. Cuantificado por los ensayos de aberraciones cromosómicas, micronúcleos y cometa.
54. Martínez, I. M., y R., M. Cruz. (2009). El uso de Químicos veterinarios Y Agrícolas en la zona ganadera de México, centro de Veracruz, México Y el posible impacto ambiental. *Acta Zoológica Mexicana*, 25(3), 673-681.
55. Martinez, D., Loening, U., y Graham, M. (2018). Impacts of glyphosate-based herbicides on disease resistance and health of crops: A review. *Environmental Sciences Europe*, 30(1), 1-14.
56. Mattoon, A. (2000). El declive de los anfibios. *Worldwatch Institute*, 23, 11-21.
57. Menéndez-Helman, R. J. (2013). Efectos del glifosato en peces dulceacuícolas. Biomarcadores de estrés ambiental (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
58. Monheit, S. (2003). Glyphosate-based Aquatic herbicides. An overview of risk. California Department of Food & Agriculture, Integrated Pest Control. *Noxious Times*, 5-9.
59. Moreno, J., Fonseca, N., Ramírez, H. (2006). La importancia del uso de los Indicadores Biológicos en los Estudios de Impacto Ambiental. Tesis de Especialización. Universidad Industrial de Santander. Colombia-Santander.

60. National Research Council. (2000). The future role of pesticides in US agriculture. National Academies Press. Washington, DC.
61. Navas, C.A. 2006. Patterns of distribution of anurans in high Andean tropical elevations: Insights from integrating biogeography and evolutionary physiology. *Integrative and Comparative Biology* 46: 82-91.
62. Nešković, N. K., Poleksić, V., Elezović, I., Karan, V., and Budimir, M. (1996). Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(2), 295-302.
63. Nieden, F. (1923). *Das Tierreich. Anura I.* 46: 1–584. Walter de Gruyter, Berlin and Leipzig.
64. Nivia E., Sánchez L. (2001). Cultivos ilícitos. ¿Sustitución o erradicación? Notas aclaratorias sobre el uso del Roundup en Colombia. Rapalmira. Pan: Pesticide Action Network.
65. Pascoli, F., Negrato, E., Di Giancamillo, A., Bertotto, D., Domeneghini, C., Simontacchi, C., and Radaelli, G. (2011). Evaluation of oxidative stress biomarkers in *Zosterisessor ophiocephalus* from the Venice Lagoon, Italy. *Aquatic toxicology*, 101(3-4), 512-520.
66. Peltzer, P. M.; Attademo, A. M.; Lajmanovich, R. C.; Junges, C. M.; Beltzer, A. H. y Sanchez, L. C. (2010). Trophic dynamics of three sympatric anuran species in a soybean agroecosystem from Santa Fe Province, Argentina. *Herpetological Journal* 20: 261-269.
67. Pérez-Iglesias, J. M., Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., de Oliveira, C., and Natale, G. S. (2016). Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10), 9852-9861.
68. Peters, W. (1863). Fernere Mittheilungen über neue Batrachier. *Monatsberichte der Königlichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin*, 1863: 445–470
69. Pinto-Erazo, M. A., Goldberg, F. J., and Jerez, A. (2016). Gonadal development in the Neotropical high Andean frog *Dendropsophus labialis* (Amphibia: Hylidae).
70. Popp, J., Pető, K., and Nagy, J. (2013). Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for sustainable development*, 33(1), 243-255.
71. Prosser, R., Rodriguez-Gil, J., Solomon, K., Sibley, P., and Poirier, D. (2017). Effects of the herbicide surfactant MON 0818 on oviposition and viability of eggs of the ramshorn snail (*Planorbella pilsbryi*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(2), 522–531.

72. Relyea, R., 2005. The lethal impact of roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecol. Appl.* 19 (1). 276-276.
73. Reyes, M. E. A., Hondal, O. C., Hernández, J. T., y Alemán, M. A. T. (2003). Toxicidad aguda del herbicida químico glifosato en larvas de la rana cubana: *Osteopilus septentrionalis*.
74. Rondón-Barragán, S., Marin-Mendez, G., Chacón-Novoa, Naranjo-Suarez, L., Pardo-Hernández, D., Eslava-Mocha, P.R., (2012). El glifosato (Roundup®) y Cosmoflux® 411F inducen estrés oxidativo en cachama blanca (*Piaractus brachipomus*). *Orinoquia* 16 (2), 162–166.
75. Ross, M. H., y Pawlina, W. (2013). *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular* / Michael H. Ross y Wojciech Pawlina (6a. ed.).
76. Roy, N. M., Carneiro, B., and Ochs, J. (2016). Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42, 45–54. Doi:10.1016/J.ETAP.2016.01.003.
77. Ruiz-Carranza, P. M., M. C. Ardila-Robayo and J. D. Lynch (1996). Lista actualizada de la fauna de Amphibia de Colombia. – *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 20: 365–415.
78. Salazar, N., y Madrid, M. (2011). Herbicida Glifosato: Usos, toxicidad y regulación. *Biotécnia*, 13(2), 23-28.
79. Sandrini, J. Z., Rola, R. C., Lopes, F. M., Buffon, H. F., Freitas, M. M., Martins, C. D. M. G., and da Rosa, C. E. (2013). Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: in vitro studies. *Aquatic toxicology*, 130, 171-173.
80. Sarria-Rendón, F. A. (2010). Tabla de desarrollo embrionario de la rana sabanera *Dendropsophus labialis*: Hylidae en cautiverio (Laboratorio Biología de Desarrollo PUJ).
81. Savage, J. M. and W. R. Heyer (1969). The tree-frogs (family Hylidae) of Costa Rica: diagnosis and definition. – *Revista de Biología Tropical*, 16: 1–127.
82. Schmidt, O. (1857). Diagnosen neuer Frösche des zoologischen Cabinets zu Krakau. – *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften Wien, Mathematisch-naturwissenschaftliche Classe*, 24: 10–15.
83. Serrano, E. L. (2017). Efecto del uso de agroquímicos en vertebrados silvestres. In *Conference Proceedings Vol. 1, No. 1*.

84. Servizi, J., Gordon, R., and Martens, D. (1987). Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, *Daphnia*, and trout. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 39(1), 15-22.
85. Solomon, R., Anadón, A., Cerdeira, A., L., Marshall, J. y Sanin, H (2005). Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD).
86. Solomon, K. R., Anadón, A., Carrasquilla, G., Cerdeira, A. L., Marshall, E. J. P., and Sanin, L. H. (2007). Coca and poppy eradication in Colombia: Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 43-125). Springer, New York, NY
87. Sorensen, S.R., A. Schultz, O.S. Jacobsen and J. Aamand. (2006). Sorption, desorption and mineralization of the herbicides glyphosate and MCPA in samples from two Danish soil and subsurface profiles. *Environmental Pollution* 141: 184-194
88. Spósito, M., y Molledo, J. C. E. (2016). Evaluación in vitro del efecto tóxico de una formulación comercial de glifosato de amonio sobre cinco especies representantes de diferentes hábitats y niveles tróficos. *Innotec*, (12 ago-dic), 48-53.
89. Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L., and Waller, R. W. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306(5702), 1783-1786.
90. Svartz, G. V. (2014). Evaluación de la toxicidad del endosulfán, la cipermetrina y un fungicida de uso comercial, solos y en mezclas sobre el desarrollo temprano de *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
91. Toro-Osorio, B. M., Rojas-Rodríguez, A. E., & Díaz-Zapata, J. A. (2017). Niveles de colinesterasa sérica en caficultores del Departamento de Caldas, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 19, 318-324.
92. Williams G., Kroes R., Munro L. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, Glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31:117 – 165.
93. World Health Organization (WHO). (1994). United Nations Environment Programme, The international labour organization. 1994. Glyphosate. Environmental Health Criteria #159. Geneva, Switzerland.

94. Van Meter, R. J., Adelizzi, R., Glinski, D. A., & Henderson, W. M. (2019). Agrochemical Mixtures and Amphibians: The Combined Effects of Pesticides and Fertilizer on Stress, Acetylcholinesterase Activity, and Bioaccumulation in a Terrestrial Environment. *Environmental toxicology and chemistry*, 38(5), 1052-1061.
95. Velásquez Puerta, D. A., Pineda Molina, C., Cardona Cano, M. E., Gómez Suarez, N. E., Gartz Moises, G. J., Úsuga Gómez, I. C y Londoño Peláez, C. (2008). Soluciones terapéuticas para la reconstrucción de la dermis y la epidermis. Oportunidades en el medio antioqueño. *Revista Ingeniería Biomédica*, 2(3), 77-83.
96. Veiga F.; Zapatta, J. M.; Marcos, F.; Alvarez, E. (2001). Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *The Science of the Total Environment*, v. 271, n.1-3, p.135-144, 2001.
97. Vilca, F. Z., Angeles, W. G., Quiróz, C. N. C., and Cuba, W. A. Z. (2018). Glifosato en cuerpos hídricos: Problema ambiental. *Revista Investigaciones Altoandinas*, 20(3), 325-332.
98. Villacrés, N. (2014). El uso de plaguicidas químicos en el cultivo de papa (*solanumtuberosum*) su relación con el medio ambiente y la salud. Tungurahua: Universidad Técnica de Ambato.
99. Yáñez L., Ortiz D., Calderón J, Batres L., Carrizales L., Mejía J. (2002). Overview of human health and chemical mixtures: problems facing developing countries. *Environ Health Perspect.* 110:901–9.
100. Zhang, S., Xu, J., Kuang, X., Li, S., Li, X., Chen, D., Feng, X. (2017). Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 181, 270–280.

CAPÍTULO II. ESCRITO TRABAJO DE GRADO

Efecto toxicológico de una presentación comercial de glifosato (Roundup Activo®) en piel de rana Sabanera (*Dendropsophus molitor*)

2.1 RESUMEN:

Colombia ha aumentado el rendimiento de los cultivos incrementando el uso de herbicidas como el Glifosato (GP) y sus formulaciones comerciales como Roundup Activo®, con el fin de controlar diferentes arvenses. Este uso ha afectado ecosistemas terrestres y acuáticos, causando malformaciones en anfibios. La rana Sabanera (*D. molitor*) habita en la Cordillera Oriental de Colombia, donde se hace uso de GP para el rendimiento de los cultivos hortícolas. Se realizó un estudio histopatológico y morfométrico por MOAR del efecto de concentraciones subletales de Roundup Activo® en el tejido tegumentario de la rana neotropical *D. molitor*. Se evaluaron cuatro concentraciones (0, 1.4, 3.6 y 5.6 a.e mg / L) con dos repeticiones por tratamiento. Se encontraron alteraciones histopatológicas y morfométricas en la piel de *D. molitor* concentración dependiente, siendo mayor los daños en las concentraciones más altas y presentando hipertrofia e hiperplasia en dermis, melanóforos y cúmulos de melanina y aumento en el número de glándulas mucosas. Se concluye que a pesar de usar concentraciones, renacuajos de *D. molitor* presentan alteraciones histopatológicas que podrían afectar el adecuado desarrollo de los mismos.

Palabras claves: Herbicida, alteraciones histopatológicas, cúmulos melanina, MOAR.

2.2 ABSTRACT:

Colombia has increased crop yield by increasing the use of herbicides such as Glyphosate (GP) and its commercial formulations such as Roundup Activo®, in order to control different weeds. This use has affected terrestrial and aquatic ecosystems, causing malformations in amphibians. The Sabanera frog (*D. molitor*) lives in the Eastern Cordillera of Colombia, where GP is used for the performance of horticultural crops. A histopathological and morphometric study was performed by MOAR of the effect of sublethal concentrations of Roundup Activo® in the integumentary tissue of the Neotropical frog *D. molitor*. Four concentrations (0, 1.4, 3.6 and 5.6 a.e mg / L) were evaluated with two repetitions per treatment. Histopathological and morphometric alterations were found in the skin of *D. molitor* concentration dependent, the damage being greater in the higher concentrations and presenting hypertrophy and hyperplasia in the dermis, melanophores and melanin clusters and an increase in the number of mucous glands. It is concluded that despite using concentrations, *D. molitor* tadpoles present histopathological alterations that could affect their proper development.

Key Words: Herbicide, histopathological alterations, melanin clusters, MOAR.

2.3 Introducción

En los últimos años la actividad agropecuaria se ha dedicado al rendimiento de los cultivos lo que ha permitido el incremento de la producción y uso de sustancias químicas con el fin de combatir diferentes plagas (Reyes *et al.*, 2003). Esto no solo representa un problema en cuanto a la constante adición de sustancias químicas al medio ambiente sino también a que esta actividad solo es posible con proporciones grandes de tierras para satisfacer la demanda del consumo humano lo que ocasiona una pérdida de hábitat para especies terrestres y acuáticas y por lo tanto una disminución de su diversidad y abundancia (Brodeur *et al.*, 2014).

El glifosato (N-fosfonometil glicina, GP) es un herbicida sistémico, no selectivo de amplio espectro que se usa para el control de plantas anuales y perennes y ejerce su acción mediante la inhibición de la síntesis de aminoácidos aromáticos tales como el triptófano, fenilalanina y tirosina al suprimir la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de la vía del shikimato afectando el desarrollo de las plantas; esta vía (ácido shikímico) está ausente en mamíferos, peces, aves, reptiles, anfibios e insectos (WHO, 1994; Williams *et al.*, 2000; Haney *et al.*, 2002; Kaczewer, 2002;)

En Colombia, el glifosato se utiliza ampliamente en la agricultura y para la erradicación de la coca y la amapola (Solomon *et al.*, 2007). Solomon (2005) expone que del 10% al 14% es el uso total para el programa de erradicación y entre el 76% al 90% es destinado para aspersión de cultivos agrícolas, la desecación de granos y madurante de la caña de azúcar (Nivia y Sánchez, 2001).

Los pesticidas representan un problema de salud pública especialmente en países en desarrollo, alterando también el ambiente, puesto que los residuos quedan en el suelo y por escorrentía o infiltración contaminan ecosistemas acuáticos, afectando los organismos presentes en los mismos (Yáñez *et al.*, 2002; Martínez y Cruz, 2009; Di Fiori *et al.*, 2012; Dung *et al.*, 2012; Solomon, 2005, Martínez *et al.*, 2018).

La persistencia de glifosato, es mayor en los suelos (de 60 hasta 360 días) (EPA, 2003) dependiendo de las propiedades moleculares del herbicida y las características superficiales adsorbentes del suelo (Calvet *et al.*, 2005), mientras que en el agua presenta un tiempo de persistencia 12 a 60 días (Cox, 1995). El herbicida con mayor espectro y por lo tanto, el más usado en Colombia y el mundo es el Roundup® que contiene (glifosato y surfactante) (Kolpin *et al.*, 2006), es decir se le suma otro aditivo tóxico como la Polioxietilamina (POEA), la cual es más tóxica que el principio activo (Murtaza y Stallings, 2001). Se ha demostrado que los surfactantes que se encuentran en las presentaciones comerciales de glifosato resultan ser más tóxico en anfibios (Georgieva *et al.*, 2018), peces (Eslava-Mocha *et al.*, 2007), reptiles (Menéndez, 2017) y mamíferos (Krüger *et al.*, 2013; Ackermann *et al.*, 2015). Los surfactantes interfieren con la respiración cutánea de las ranas y la respiración branquial en renacuajos y peces (Eslava-Mocha *et al.*, 2007). Además, la toxicidad de esta mezcla es más peligrosa en ecosistemas acuáticos y no solo está limitada a anfibios sino también a insectos, peces e invertebrados (Sicard, 2005; Rosas-Castillo, 2012; Georgieva *et al.*, 2018).

Los anfibios son un grupo amenazado y presentan las mayores tasas de extinción de especies, no sólo por la pérdida de hábitat sino también por la contaminación ambiental, el cambio climático, incremento en la radiación UV-B, uso excesivo de fertilizantes y pesticidas

(actividad agrícola y acuicultura), metales pesados y enfermedades (IUCN, 2013; Brodeur *et al.*, 2014; Svartz, 2014).

Este grupo se caracteriza desempeña un papel fundamental en el control de plagas de diferentes cultivos como: soja, maíz, arroz, plátano, etc; por lo que están continuamente expuestos a agroquímicos convirtiéndolos en excelentes modelos de estudio para los efectos postexposición de diferentes xenobióticos (Peltzer *et al.*, 2010; Svartz *et al.*, 2012).

La Rana Sabanera (*Dendropsophus molitor*) habita en la Cordillera Oriental de Colombia y Cordillera de Mérida en Venezuela, entre los 2000 y 3600 m.s.n.m. Presenta una amplia variación de tamaño corporal (29 a 55 mm de longitud dorso-cloacal), su coloración varía desde marrón, marrón con manchas verdes, verdes con líneas oscuras o manchas negras (Amézquita, 1999), *D. molitor* exhibe un dimorfismo sexual donde las hembras son más grandes que los machos y su reproducción se lleva a cabo en cuerpos de agua lénticos rodeados por pastizales y arbustos (Guarnizo *et al.*, 2012).

Al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de glifosato en el producto Roundup Activo® y Cosmo-Flux®411F bajo condiciones naturales y de laboratorio en diferentes familias de anfibios: Bufonidae (*Rhinella marina*, *Rhinella Humboldti*), Hylidae (*Hypsiboas crepitans*) y Leptodactylidae (*Engystomops pustulosus*), se encontró una mayor mortalidad en condiciones de laboratorio que en microcosmos, siendo la especie más susceptible *R. marina*, presentando una disminución del tamaño corporal y retraso en el desarrollo, esta diferencia de efecto se debe a que la capa vegetal ayuda en el proceso de degradación del Roundup® (Henao-Muñoz *et al.*, 2013). Pérez-Iglesias *et al.*, (2016), demuestran que al exponer individuos de *Leptodactylus latinasus* a concentraciones de glifosato puro de 100, 1000, y 10,000 µg g⁻¹ el hígado incrementa el área de melanina desde la concentración más baja, cambia la ocurrencia de pigmentos de catabolismo hepático en melanomacrófagos, hay hipervascularización hepática, vacuolización del citoplasma de hepatocitos y se promueven las anomalías nucleares de los eritrocitos. Estudios experimentales realizados en peces como *Piaractus brachipomus* (Cachama Blanca) indican que, la exposición a diferentes dosis de agroquímicos provocan alteraciones tegumentarias como hiperplasia e hipertrofia de células planas de la epidermis, alteraciones en las células mucosas, infiltración leucocitaria epidermal y acumulación subepidermal de pigmentos (Ramírez *et al.*, 2009), este trabajo expone que estas alteraciones en epidermis de *P. brachipomus* también pueden presentarse en otros organismo acuáticos, no obstante en anfibios no se hallaron resultados de investigaciones similares ni análisis estructurales con microscopía óptica de alta resolución (MOAR) en tegumento expuesto a diferentes concentraciones de glifosato.

La piel representa el límite entre las condiciones externas y la protección del organismo, así como la interacción con el medio ambiente (Maldonado, 2017). La piel de los anfibios es única dentro de los vertebrados porque su permeabilidad es mayor por sus propiedades estructurales como la presencia de glándulas mucosas, glándulas serosas y la vascularización variable de la dermis (Kaufmann y Dohmen, 2016), es importante señalar que la respiración cutánea es una de las funciones fundamentales del tegumento en los anfibios porque garantiza protección ante infecciones, evita la desecación y por lo tanto es órgano de gran interés toxicológico porque está en contacto directo con el ambiente acuático y es un blanco primario de xenobióticos irritantes como presentaciones comerciales de

glifosato (Duellman y Trueb, 1994). El tegumento está formado por la epidermis (compuesta por tres estratos: córneo, granuloso y germinativo), dermis que está constituida por una capa esponjosa (donde se sitúan las glándulas exocrinas) y otra capa compacta (compuesta principalmente por fibras de colágeno) y una tercera capa hipodermis que varía en morfología y localización según estadios de los organismos y la especie (Azevedo *et al.*, 2005) García *et al.*, 2011; Mangione *et al.*, 2011;)

Los estadios larvales en anfibios son más sensibles al glifosato que los estadios adultos (Mann y Bidwell, 1999), sin embargo, hay pocos estudios en estadios larvales donde se conocen alteraciones histopatológicas en diferentes órganos, por lo general se conocen resultados de mortalidad y retraso en el desarrollo de los organismos (Bustos, 2012).

Este es el primer trabajo que evalúa el efecto del Roundup Activo® en la piel de una rana neotropical en estadios larvales y con concentraciones subletales. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es determinar las alteraciones histopatológicas y morfométricas en tejido tegumentario de renacuajos de *D. molitor*, expuestos a diferentes concentraciones de Roundup Activo®.

2.4 Materiales y Métodos

2.4.1 Área de estudio y material biológico

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Animal y Embriología, sede Cajicá, Colombia, de la Universidad Militar Nueva Granada, (4 ° 56 ' 37 " N - 74 ° 00 ' 35 " W, 2560 msnm) con una temperatura promedio anual entre 12 y 19°C y humedad relativa del 88%.

Se capturaron 80 renacuajos de *D. molitor* de los reservorios de la Universidad Militar Nueva Granada con el permiso Res N° 1198 otorgado por el Ministerio de Ambiente de Colombia a la institución mencionada. Los especímenes fueron aclimatados durante una semana de acuerdo a estudios en otros anfibios neotropicales (Pérez-Iglesias *et al.*, 2016; Riaño *et al.*, 2020). Los renacuajos se encontraban en la etapa de desarrollo 24 de Gosner (Gosner, 1960) y se alimentaron con tetra color type® (47.5% de proteína) ajustado al 2% de la biomasa. Se mantuvieron parámetros físico-químicos controlados (pH 7.2, temperatura 16 °C, nitrógeno amoniacal total (TAN) <0.5 mg/L, nitrito <0.5 mg/L y oxígeno disuelto (OD) >5mg/L.

2.4.2 Diseño Experimental

Se evaluaron los efectos del glifosato en tejido tegumentario de *D. molitor* en cuatro tratamientos con dos repeticiones, las concentraciones subletales de glifosato usadas fueron (0, 1.4, 3.6 y 5.6 mg/L) ácido equivalente (a.e)/L presentes en la presentación comercial Roundup Activo® (Bayer Cropscience). La composición de esta formulación comercial es 363 g/L de glifosato ácido equivalente a 446 g/L de sal de potasio de N-fosfonometil-glicina y un tensioactivo que no es especificado por la multinacional.

Un total de 10 individuos fueron analizados por tratamiento (N=80). Los organismos se mantuvieron en sistemas semiestáticos con un volumen total de 4L de agua de grifo por unidad experimental durante 40 días. La calidad del agua (temperatura, pH, oxígeno disuelto, nitrito, nitrógeno amoniacal total se controló diariamente con un medidor de calidad de agua multiparamétrico® Hanna y el kit de prueba Merck Spectroquant®. Los renacuajos se anestesiaron y sacrificaron con benzocaína al 0.5%, siguiendo los protocolos de Bioética y experimentación en animales expuestos por AVMA (2013). Posteriormente se tomaron las secciones de tejido tegumentario dorso-craneal y en la cola en perfil lateral (500µm) (Fig. 1) de cada individuo sacrificado, llevando el adecuado registro y rotulación de las muestras biológicas. Estas secciones se seleccionaron por la importancia fisiológica y ecológica que desempeñan en el organismo, la sección dorso-craneal con estructuras como el tejido tegumentario que protege el cerebro, órgano vital y la sección cola perfil lateral porque permite una respuesta de escape ante depredadores y contaminantes, búsqueda de alimento o pareja.

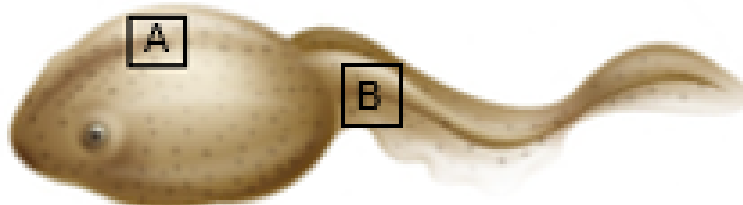


Figura 1. Secciones de tejido tegumentario evaluadas en *D. molitor*. **A.** Sección dorso-craneal **B.** Sección cola perfil lateral.

2.4.3 Procesamiento para MOAR

Los tejidos se fijaron en glutaraldehído al 2,5% a 4°C durante dos días, luego se lavaron con solución salina tampón fosfato y posteriormente se fijaron con tetraóxido de osmio al 2% (Riaño *et al.*, 2020). Los procesos de deshidratación se realizaron con concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 90% y 100%) usando baños de 10 minutos, luego se hizo cambio de alcohol acetona y acetona pura con baños de 15 minutos y finalmente la impregnación se hizo con cuatro lavados de 1 hora en mezclas homogéneas de resina Poly/Bed 812® y acetona en proporciones: 1:2, 1:1, 2:1 respectivamente; se realizó la imbibición en resina pura por una 1 hora y 30 minutos, seguido de la inclusión y polimerización por 24 horas en estufa a 70°C (Piloni *et al.*, 2016).

Se realizaron cortes transversales de 1 µm de espesor con un micrótopo de rotación Slee Cut 4060® para cada corte se usó la tinción azul de toluidina. Las secciones fueron observadas y fotografiadas con un microscopio óptico (ZEISS®) equipado con una cámara digital Axiocam (ZEISS®). Alteraciones histopatológicas en el tejido tegumentario de *D. molitor* se describieron como cambio de espesor de las capas del tejido tegumentario (epidermis, dermis y capa hipodérmica-muscular) (Brühl *et al.*, 2011; Bernal *et al.*, 2013; Henao *et al.*, 2015). Por individuo se procesaron 6 láminas con cortes separados 50µm entre

sí, se procedió al montaje permanente de láminas por tratamiento con laminillas y Entellan®. Por cada imagen se obtuvieron medidas del área de cada capa del tejido tegumentario mediante el software Image J 1.48v (<http://imagej.nih.gov/ij/>, 2013) (Gómez, 2013).

2.4.4 Análisis estadístico

A todas las variables respuesta del espesor de las capas del tejido tegumentario (epidermis, dermis e hipodermis) se les evaluó el supuesto de normalidad por medio de la prueba (Shapiro-Wilk) y se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía y la prueba de Tukey-Kramer ($P \leq 0.05$ error tipo I). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Software R 3.5.0 (R Core Team, 2018) (Zar, 2010).

2.5 Resultados

El tejido tegumentario de *D. molitor* se caracterizó por presentar epidermis, dermis, hipodermis y tejido muscular (Fig. 2-5). La epidermis está constituida por tejido epitelial plano estratificado, esta capa a su vez se compone de diferentes estratos de los cuales se identificaron el estrato corneo formado por células planas y anucleadas y el estrato basal que está formado por una capa de células cubicas en diferenciación por lo que fue habitual observar dos nucléolos (Fig. 2).

La dermis estaba subdividida en dos estratos, el laxo o esponjoso y el compacto (Fig. 2). En el primero se observó tejido conectivo laxo y glándulas exocrinas multicelulares compuestas por células mucosas, serosas y un estrato compacto que está conformado por tejido conectivo denso donde se encuentran distribuidas células pigmentarias como melanóforos (Fig. 2-5). En la dermis de *D. molitor* se identificaron los tipos glandulares anteriormente mencionados en todos los individuos evaluados con mayor número de glándulas mucosas que serosas (Fig. 3). Se observó una hiperplasia e hipertrofia de las células glandulares especialmente en los tratamientos T2 y T3 (Fig. 3 y 4). En los tratamientos T3 y T4 se evidenció un aumento de cúmulos de melanina y melanóforos los cuales estaban ubicados en los estratos de la dermis.

La hipodermis se caracterizó por ser la capa más profunda del tejido tegumentario y ser la más delgada por lo que estaba estrechamente relacionada al tejido muscular esquelético.

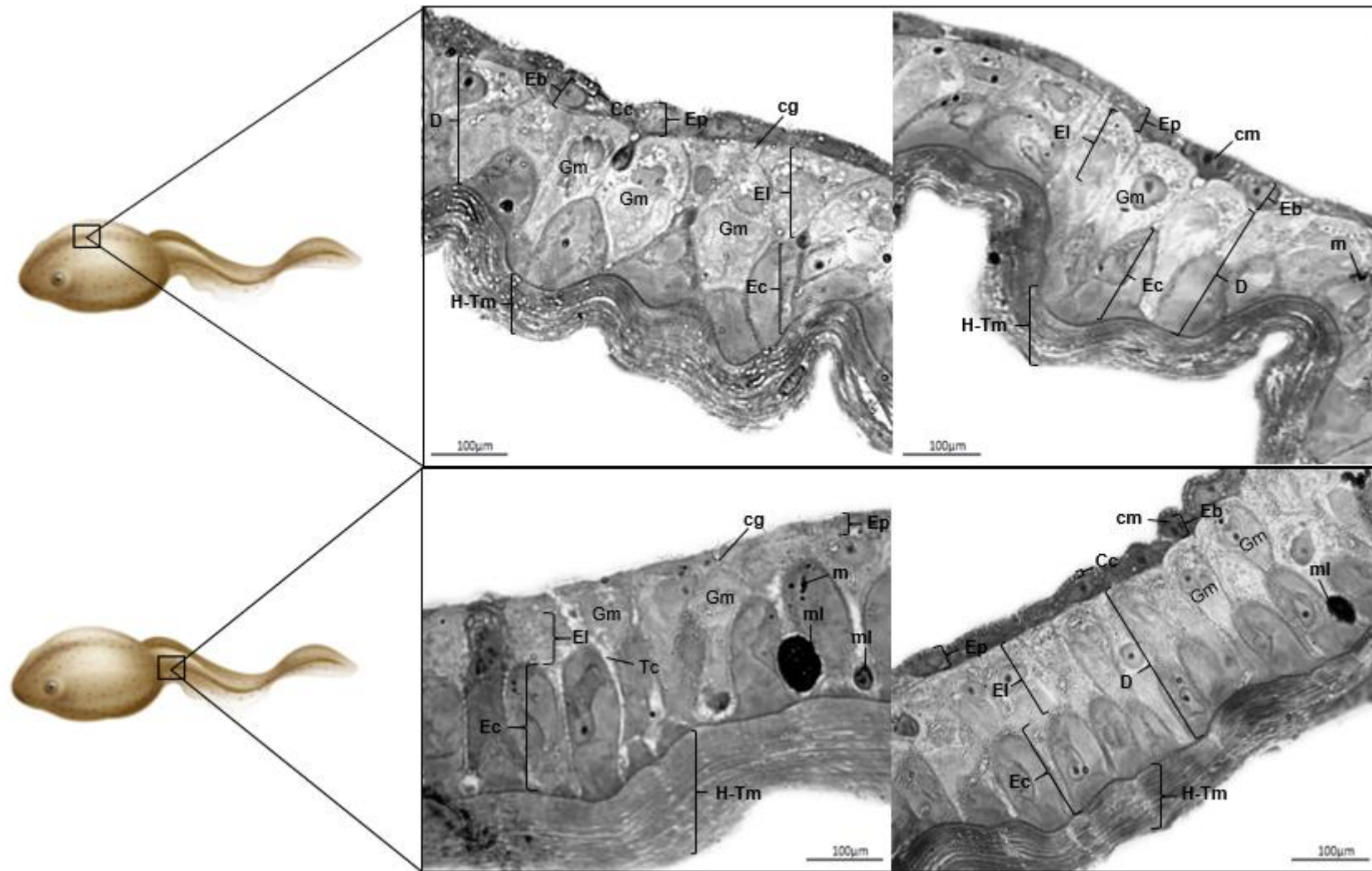


Figura 2. Tejido tegumentario de *D. molitor* correspondientes al tratamiento 1 (T1: 0 mg/L). Se observa epidermis (Ep), capa córnea (Cc), estrato basal (Eb), dermis (D), estrato laxo (EI), estrato compacto (Ec), hipodermis-tejido muscular (H-Tm), células multinucleadas (cm), melanóforos (ml), cúmulos de melanina (m), glándulas mucosas (Gm), cuello glandular (cg), tejido conectivo (Tc). Tinción azul de toluidina.

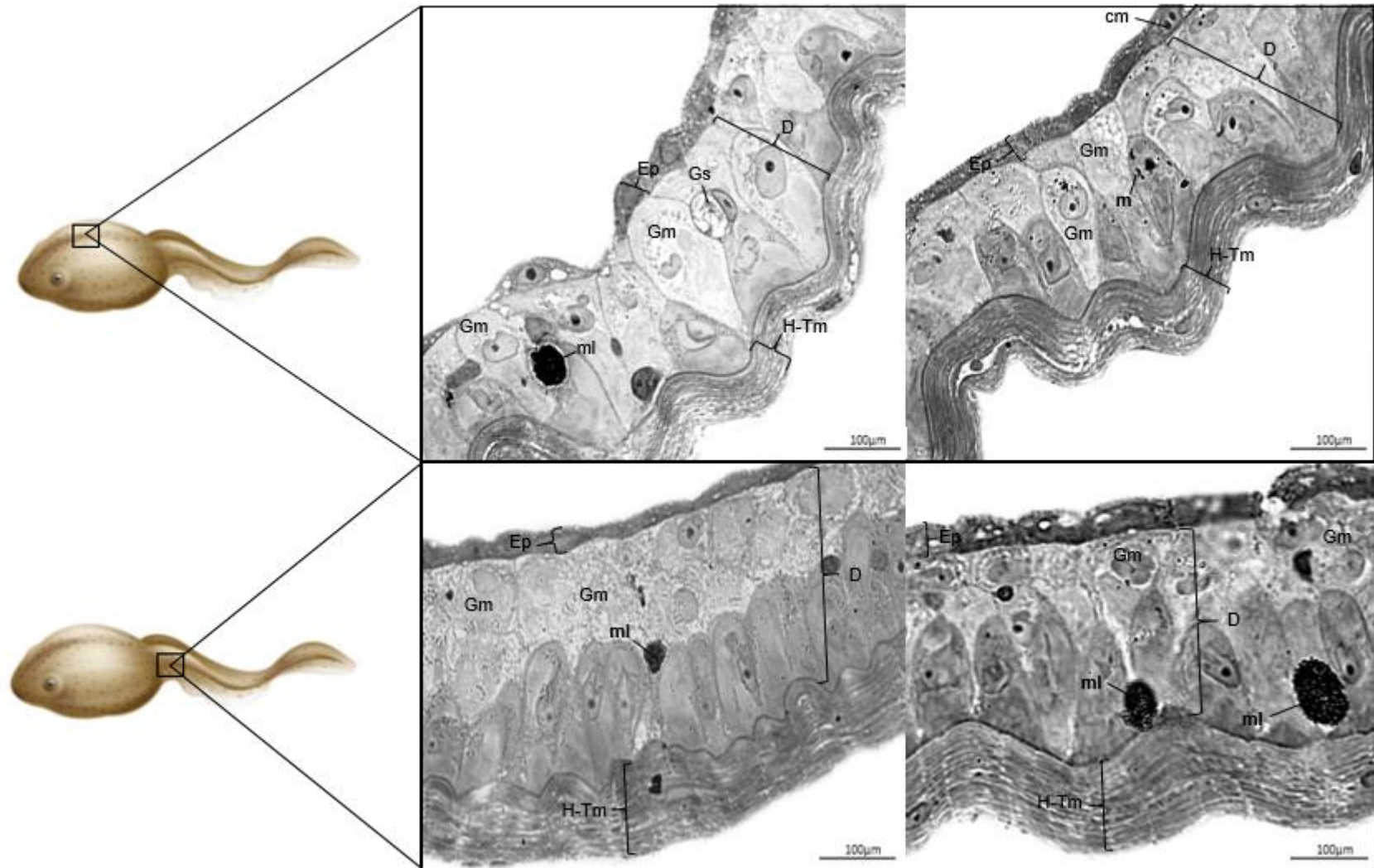


Figura 3. Tejido tegumentario de *D. molitor* correspondientes al tratamiento 2 (T2: 1.4 mg/L). Se observa epidermis (Ep), dermis (D), hipodermis-tejido muscular (H-Tm), células multinucleadas (cm), melanóforos (ml), cúmulos de melanina (m), glándulas mucosas (Gm), glándulas serosas (Gs). Tinción azul de toluidina.

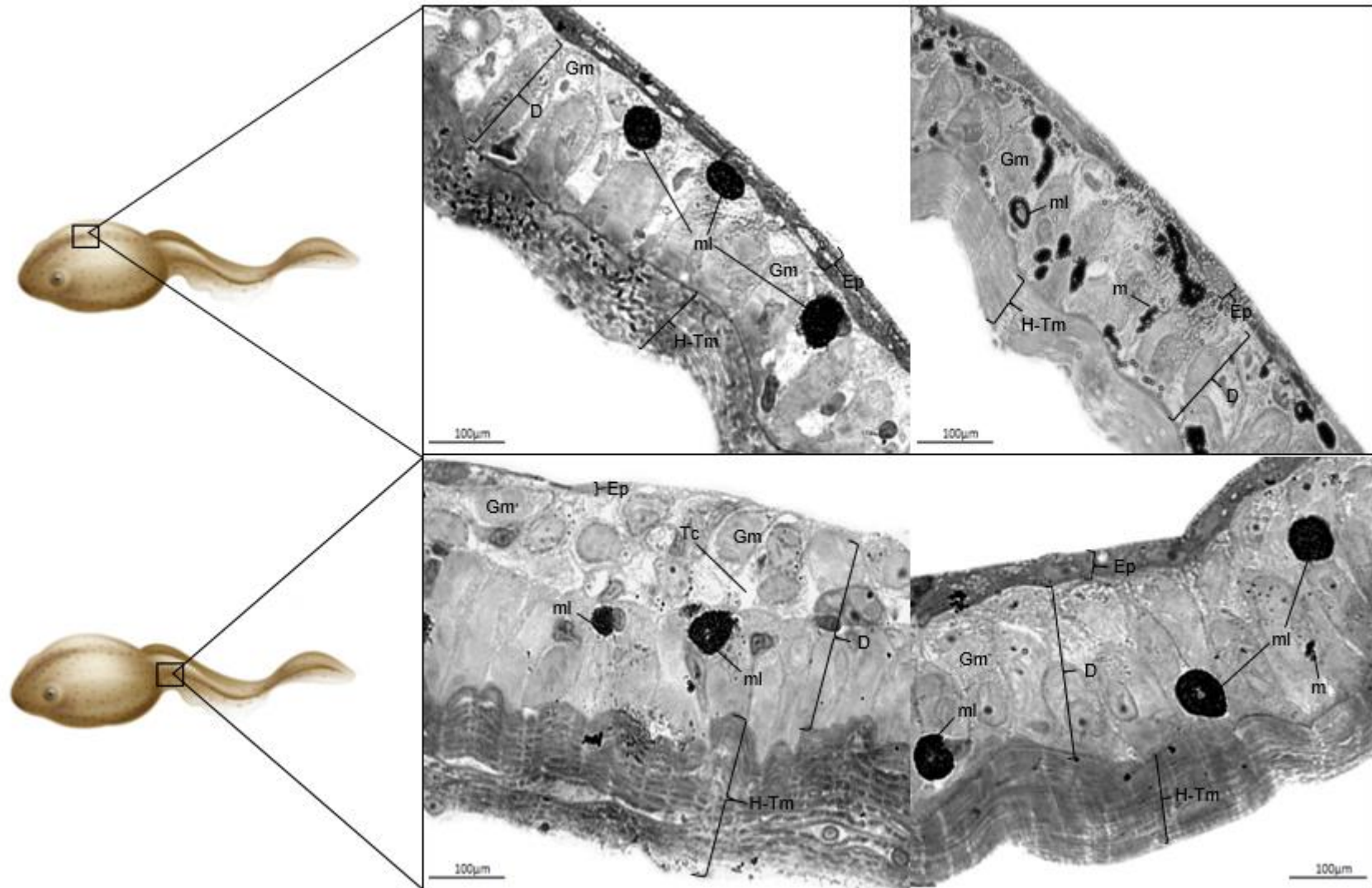


Figura 4. Tejido tegumentario de *D. molitor* correspondientes al tratamiento 3 (T3: 3.6 mg/L). Se observa epidermis (Ep), dermis (D), hipodermis-tejido muscular (H-Tm), melanóforos (ml), cúmulos de melanina (m), tejido conectivo (Tc), glándulas mucosas (Gm). Tinción azul de toluidina.

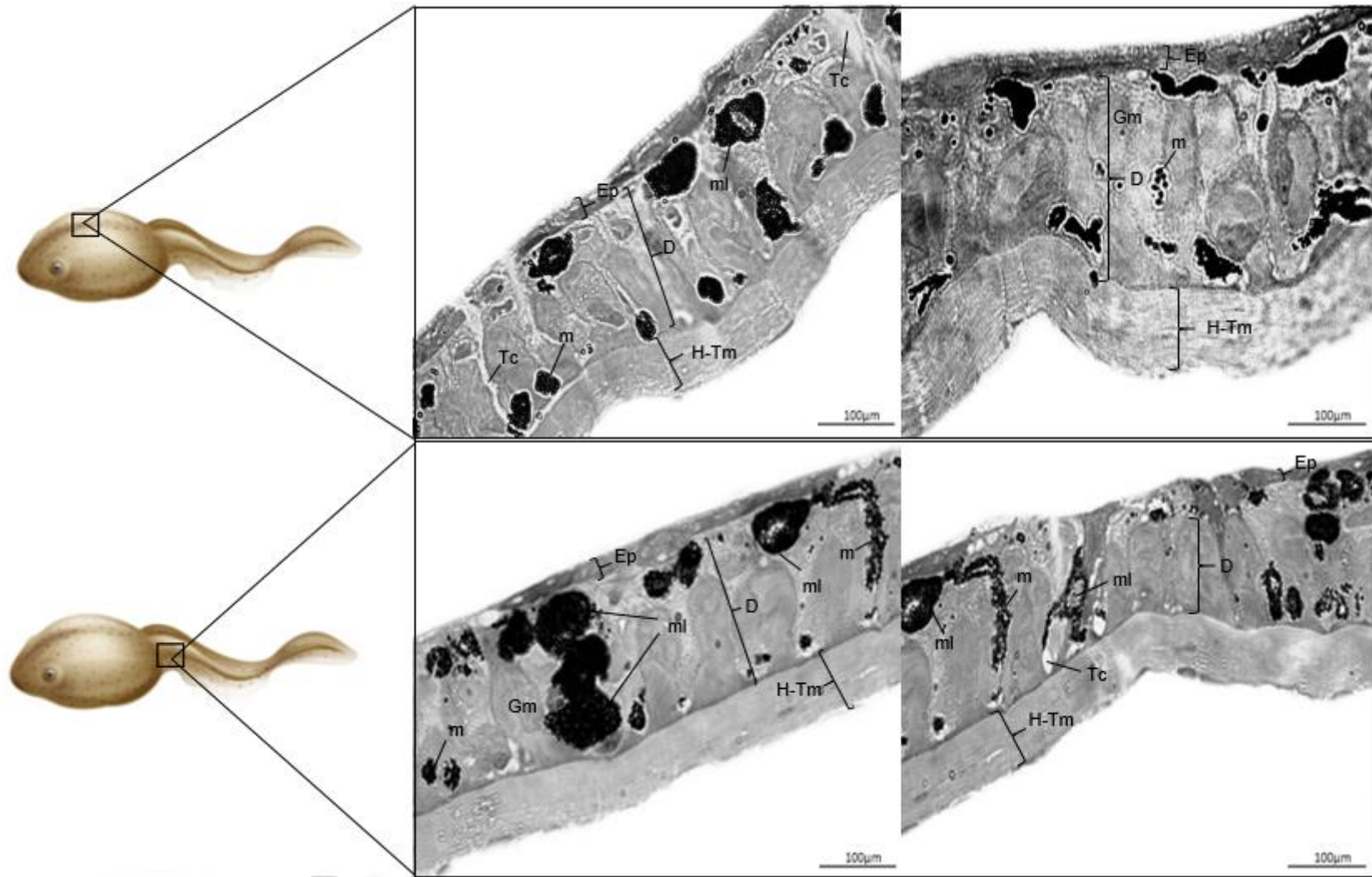


Figura 5. Tejido tegumentario de *D. molitor* correspondientes al tratamiento 4 (T4: 5.6 mg/L). Se observa epidermis (Ep), dermis (D) hipodermis-tejido muscular (H-Tm), melanóforos (ml), cúmulos de melanina (m), tejido conectivo (Tc), glándulas mucosas (Gm). Tinción azul de toluidina.

Se encontraron diferencias significativas en la longitud de la epidermis, dermis e hipodermis-tejido muscular entre las secciones dorso-craneal y cola perfil lateral (Fig. 6). En el grosor epidermal y dermal analizado en la sección dorso-craneal de *D. molitor* se encontró que aumentaba en tratamiento T2 en contraste con el tratamiento T1. En cuanto al grosor epidermal y dermal analizado en la cola perfil lateral de *D. molitor* se encontró que aumentaba en el tratamiento T2 y T3.

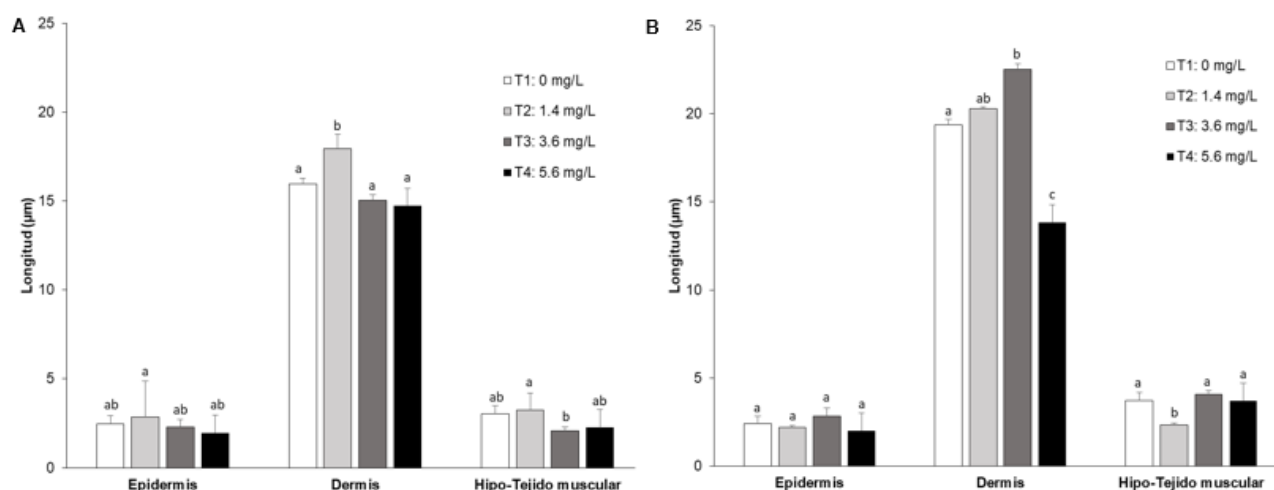


Figura 6. A. Tejido tegumentario de la sección dorso-craneal de *D. molitor* expuesto a diferentes concentraciones de Roundup Activo®. (Figura 6A., $F_{3,76}=4.855$, $P=0.00383$; Figura 6A., $F_{3,76}=3.742$, $P=0.0145$; Figura 6A., $F_{3,76}=4.304$, $P=0.00737$, respectivamente). **B.** Tejido tegumentario de la sección de cola perfil lateral de *D. molitor* expuesto a diferentes concentraciones de Roundup Activo®. (Figura 6B., $F_{3,76}=4.154$, $P=0.00882$; Figura 6B., $F_{3,76}=23.36$, $P=8.12e-11$ y Figura 6B., $F_{3,76}=13.9$, $P=2.58e-07$, respectivamente). Cada valor representa la media $\pm$ error estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p > 0.05$).

2.7 Discusión

Este es el primer estudio que se hace en histopatología por MOAR de la capa tegumentaria de la rana neotropical *D. molitor*.

El tejido tegumentario de *D. molitor* presentó tres capas constitutivas (epidermis, dermis e hipodermis) similares a las reportadas en otras especies de anfibios como el sapo *Epidalea calamita* y la rana *ridibunda* (Navas, 1978) y en diferentes anuros (Toledo y Jared, 1995; Duellman y Trueb, 1994; Greven *et al.*, 1995; Azevedo *et al.*, 2005; Felseburgh *et al.*, 2007). El tratamiento control T1 (Fig. 2) no exhibió ninguna alteración histopatológica y las células de cada una de las capas se presentaron normales; epidermis con tejido epitelial estratificado compuesto por más de un estrato celular (córneo y basal) cuyo estrato más superficial (córneo) contenía células aplanadas o escamosas seguido del estrato basal con células en alta actividad mitótica. La dermis presentaba un estrato laxo con abundantes glándulas mucosas y serosas mientras que el estrato compacto que exhibía melanóforos y un tejido

conectivo denso. La hipodermis era delgada asociada a una capa de musculo estriado esquelético de mayor espesor.

En los tratamientos T2 y T3 (sección cola perfil lateral) se evidenció hipertrofia e hiperplasia en la dermis, alteración descrita en otros anfibios como *Lithobates catesbeianus*, *Alytes muletensis*, *Dendrobates azureus*, *Dendrobates tinctorius* y *Tylototriton shanjing* lo anterior se ha reportado en respuesta a factores externos como actividad antropogénica que afecten al organismo (Juan-Sallés, 2020). Este hecho fue similar en *Scinax nasicus* donde se presentaron alteraciones caracterizadas por deformidad craneal y bucal e hiperplasia en epidermis al exponer los organismos a diferentes concentraciones de glifosato puro (3.07, 3.85, 4.8, 6 y 7.5 mg/L) a 24, 48, 72 y 96h (Lajmanovich *et al.*, 2003). La hipertrofia en capas del tejido tegumentario puede provocar marcadas alteraciones en cuanto a la forma y estructura del órgano, se ha evidenciado que la hipertrofia en epidermis y dermis genera desarreglos celulares en los tejidos conectivos, epiteliales y glandulares lo que afecta negativamente a los anfibios que estén expuestos a xenobióticos porque se reduce la división celular (Sahin *et al.*, 2014; Fernández *et al.*, 2017; Galante-Mulki, 2018). Neškovic *et al.*, (1996), identificaron hiperplasia en diferentes órganos (branquias, hígado y epidermis) de organismos acuáticos como peces expuestos a diferentes concentraciones de glifosato y concluyen que si estos daños epiteliales perduran como respuesta a pesticidas que se encuentren en el ambiente se presenta un comportamiento anormal en anfibios y alteraciones irreversibles que pueden causar una alta mortalidad en estos organismos (Menéndez-Helman, 2020).

En el tejido tegumentario de *D. molitor* de todos los ejemplares analizados, se observó mayor número de glándulas mucosas que serosas lo que es normal en anfibios ya que esta glándula funciona como reservorio de agua y sus diferentes secreciones (glicoproteínas y polisacáridos) previenen el daño mecánico, la desecación y aíslan al organismo parcialmente del medio en el que se encuentren (Azevedo, 2005; Wells, 2007). En los tratamientos T2, T3 y T4 el número de glándulas mucosas aumentó considerablemente, si se tienen en cuenta que estas glándulas están relacionadas con la respiración y el equilibrio osmótico e hídrico en anfibios, este aumento puede ser debido a que el glifosato y el surfactante presente en Roundup Activo® generó una respuesta a estrés y hubo mayor secreción de mucus como estrategia de aislar al organismo del xenobiótico. Lo anterior, coincide con lo obtenido por Henao-Muñoz *et al.*, (2015), donde especies de anfibios como *Rhinella humboldti* y *R. marina*, presentaron mayor secreción de mucus y una alta mortalidad cuando fueron expuestos a concentraciones subletales de Roundup Activo® y Cosmo-Flux® 411F (106,25; 212,5; 425; 850 y 1700 mg/L) Un leve aumento de las glándulas serosas o granulares al aumentar la concentración, los anfibios pueden secretar en estas glándulas sustancias tóxicas (péptidos, esteroides y alcaloides) o repelentes bajo condiciones que le causen estrés como depredación o contaminación antropogénica (Naya *et al.*, 2004).

La presencia de pigmentos de diferentes tamaños observados es característico de la melanina por ser pigmentos oscuros los cuales son producidos por melanóforos generalmente en la dermis (estrato compacto) de los anfibios. En este estudio se evidenció un aumento en el número de melanóforos y cúmulos de melanina en la dermis de *D. molitor* en los tratamientos T3 y T4 como posible respuesta al glifosato y surfactante Roundup Activo®. Esta alteración concuerda con lo descrito por Kalashnikova (2000) donde sugiere que el origen de la melanina de las ranas puede proceder de la destrucción de eritrocitos y la transformación de la por la acción enzimática de la tirosinasa (Kordylewski, 1984; Henson *et al.*, 1999). El aumento de melanocitos y melanina es un proceso normal en los organismos

acuáticos debido a que es un agente antimicrobiano y desempeña un rol de protección al disminuir la entrada de sustancias químicas en el tejido tegumentario, es decir, la melanina es utilizada como respuesta a factores externos que puedan afectar la forma y estructura del tejido tegumentario de estos organismos (Cetina, 2018). Kordylewski (1984) demostró que la principal función de la melanina es proteger al individuo de condiciones ambientales que le puedan ser adversas, como lo es la radiación ultravioleta y la contaminación antropogénica.

Las alteraciones estructurales (hipertrofia e hiperplasia) en las glándulas mucosas observadas en esta investigación causan un aumento en el grosor de la dermis y de su tejido conectivo laxo. Estudios experimentales realizados en peces y anfibios indican que la exposición a diferentes dosis de agroquímicos a base de glifosato provocan alteraciones tegumentarias como hiperplasia e hipertrofia de células planas de la epidermis, infiltración leucocitaria epidermal y acumulación subepidermal de pigmentos (Ramírez *et al.*, 2009). También fue posible observar que en los tratamientos T3 y T4 se forma un festoneado celular en la hipodermis-tejido muscular y esto es probablemente ocasionado por el efecto citotóxico del glifosato, los surfactantes o el efecto sinérgico de ambos presentes en la presentación comercial como POEA y el Cosmoflux® 411F incrementando daños sobre la epidermis e hipodermis al ocasionar cambios estructurales en la membrana de las células epiteliales (Monroy *et al.*, 2005).

En cuanto a la morfometría, se observó que existen diferencias estadísticamente significativas en el grosor de las capas que conforman el tejido tegumentario en individuos de *D. molitor*. El espesor del tejido tegumentario y de las capas que lo conforman varía en anuros según la región corporal analizada (Toledo y Jared, 1995). Se ha reportado que en especies de *Leptodactylus* del grupo *fuscus*, existen diferencias en el grosor del tejido tegumentario producto de la diferenciación celular y cambios morfológicos de las células epidérmicas (García *et al.*, 2011).

Se conoce que la exposición de diferentes organismos a productos químicos puede causarles alteraciones en tejidos y órganos como la piel. (Hayes *et al.*, 2010). Diferentes estudios evidencian aumento de parásitos debilitantes cutáneos en *Lithobates pipiens* expuestos a la combinación del pesticida Atrazina con fosfato, causando inmunosupresión en renacuajos y adultos de esta especie, lisis en células epiteliales en diferentes órganos en trucha arcoiris y otros organismos acuáticos como anfibios expuestos a tensioactivos, lo que induce a pensar que las diferencias en el tegumento de los anfibios encontradas en este estudio están relacionadas a los niveles de perturbación antrópica a la que están expuestos los organismos (Partearroyo *et al.*, 1991; Brock *et al.*, 2000; Rohr *et al.*, 2008; Bach *et al.*, 2018).

La dermis fue la capa más gruesa del tejido tegumentario de *D. molitor*, esto puede ser debido a que en esta capa se encuentran asociadas las células glandulares exocrinas (mucosas y serosas) (Ross y Pawlina, 2013); Esto coincide con el estudio realizado por Toledo y Jared (1995), donde manifiestan que estas glándulas son de gran tamaño en respuesta a la síntesis y almacenamiento de múltiples sustancias. Por lo que la hipertrofia e hiperplasia en la dermis, explicaría el aumento de espesor en la sección cola perfil lateral de *D. molitor*.

Los resultados obtenidos para los individuos de *D. molitor* evidencian que las glándulas mucosas están presentes en ambas secciones (dorso-craneal y cola perfil lateral) y además

son más abundantes que las glándulas serosas o granulares, lo que se relaciona con el papel protector de las mucosidades (Maldonado, 2017). Estas glándulas presentan diferentes productos de secreción como glicoproteínas, polisacáridos ácidos y neutros que según Wellls (2007), contribuyen a la entrada y almacenamiento de agua, disminuyen la fricción, evitan desecación y aíslan al organismo.

Se observó que el espesor de la dermis era mayor frente a las otras capas evaluadas (epidermis e hipodermis). Los resultados concuerdan con lo descrito por García *et al.* (2011) quienes indican que el grosor de la dermis laxa o estrato esponjoso, es mayor en las zonas de piel que poseen glándulas que en aquellas que no la presentan y así brindarle estructuralmente un soporte (tejido conectivo laxo) a las glándulas presentes en esta capa tegumentaria, el punto de vista funcional del aumento de glándulas mucosas a medida que se aumentaban las concentraciones de Roundup Activo® era necesario incrementar la secreción de mucosa, para controlar el pH de la piel y mantener una termorregulación óptima (Kambic, 2016).

Es probable que el grosor de la dermis en la sección dorso-craneal (15.90 μm) de *D. molitor* haya disminuido en comparación con la dermis de la sección de cola perfil lateral (19.00 μm), porque en esta capa, como ya se ha mencionado, se producen las glándulas mucosas y al disminuir su grosor es más fácil que este moco llegue a la epidermis con el fin de aislar el organismo de la sustancia tóxica o por responder al xenobiótico las células glandulares expulsan rápidamente sus productos (Gines, 1959). El incremento de la producción de moco en las branquias y piel es una respuesta descrita en peces sometidos a ambientes contaminados donde esta mucosa mejora la remoción, dilución y/o neutralización de compuestos tóxicos y patógenos reduciendo la difusión de agentes nocivos hacia la sangre. (Bols *et al.*, 2001; Speare y Ferguson, 2006).

Las alteraciones histopatológicas que se evidenciaron en este estudio concuerdan con los resultados obtenidos en otros trabajos donde se determina que al exponer anfibios a diferentes concentraciones de pesticidas a base de glifosato, se presenta poco o nulo desarrollo embrionario y por lo tanto morfológico que impide que los organismos se adapten al medio circundante, alteraciones que afectan la cola y por ende, la capacidad natatoria lo que impide una respuesta de escape ante depredadores y contaminantes, búsqueda de alimento o pareja y finalmente la muerte contribuyendo a la rápida tasa de extinción de estas poblaciones de organismos (Kats *et al.*, 2000; Ezemonye *et al.*, 2007; Sumanadasa *et al.*, 2008 Relyea, 2012; Henao-Muñoz *et al.*, 2015). En este estudio se observaron diferentes alteraciones histopatológicas en concentraciones subletales de Glifosato y se apoya lo encontrado por Solomon *et al.*, (2007b) donde expone que los anfibios son organismos ampliamente sensibles a las formulaciones de glifosato que otros animales acuáticos y es necesario complementar este tipo de estudios con diferentes órganos y técnicas histopatológicas para comprender de manera más clara el efecto del glifosato y que puede estar ocurriendo en ambiente natural.

2.8 Conclusiones

- Se evidenció un efecto concentración dependiente del xenobiótico en las alteraciones del tejido tegumentario de *D. molitor*.

- Las principales alteraciones histopatológicas encontradas en el tejido tegumentario de *D. molitor* fue el hallazgo de hiperplasia e hipertrofia de las glándulas de mucosas, aumento de melanóforos y cúmulos de melanina.
- La capa que presentó mayor espesor fue dermis tanto en la región dorso craneal como en la cola perfil lateral.
- La capa que presentó cambios de espesor en respuesta al xenobiótico fue la dermis, en respuesta a la hipertrofia e hiperplasia de las glándulas mucosas y melanóforos.

2.9 Recomendaciones

- Se recomienda hacer estudios donde se evidencien alteraciones histopatológicas en más órganos de *D. molitor* para conocer en detalle la respuesta sistémica de estos organismos al tóxico (Roundup Activo®).
- Realizar intoxicaciones experimentales con Glifosato puro, Surfactante, producto comercial (Roundup Activo®) y AMPA para determinar los efectos histopatológicos de cada uno de ellos en organismos acuáticos como *D. molitor*.
- Realizar estudios postexposición al tóxico para determinar si hay recuperación de los individuos o mantienen los cambios evidenciados al ser expuestos a Roundup Activo®.

2.9 Bibliografía

1. Ackermann W, Coenen M, Schrödl W, Shehata A A, Krüger M (2015). The influence of glyphosate of the microbiota and production of botulinum neurotoxin during ruminal fermentation. *Curr Microbiol.* 70: 374-382.
2. American Veterinary Medical Association (AVMA), (2013). Guidelines for the Euthanasia of Animals. American Veterinary Medical Association, Schaumburg, IL
3. Amézquita, A. (1999). Color pattern, elevation and body size in the high Andean frog *Hyla labialis*. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 23: 231-238.
4. Azevedo, R.; Pelli, A.; Ferreira-Pereira, A.; Santana, A.; Felseburgh, F. and De Brito-Gitriana, L. (2005). Structural aspects of the EberthKatschenko layer of *Bufo ictericus* integument: histochemical characterization and biochemical analysis of cutaneous calcium (Amphibia: Bufonidae). *Micron* 36: 61-65.

5. Bach, N. C., Marino, D. J., Natale, G. S., and Somoza, G. M. (2018). Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 202, 289-297.
6. Bernal, M. H., Solomon, K. R., & Carrasquilla, G. (2013). Toxicidad del glifosato formulado (Glyphos®) y Cosmo-Flux® para las ranas colombianas en estado larvario y juvenil 2. Toxicidad aguda de campo y de microcosmos de laboratorio.
7. Boyer R, Grue CE. (1995). The need for water quality criteria for frogs. *Environ Health Perspect.* 103:352-355.
8. Bols N.C., Brubacher J.L., Ganassin R.C., Lee L.E. (2001). Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev Comp Immunol.* 25: 853-873.
9. Brodeur, J. C., Poliserpi, M. B., D'Andrea, M. F., and Sánchez, M. (2014). Synergy between glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American toad *rhinella arenarum*.
10. Brock, T. C. M., Lahr, J. and Van den Brink, P. J. (2000). Ecological Risks of Pesticides in Freshwater Ecosystems Part 1: Herbicides Alterra-Rapport.
11. Brühl, C. A., Pieper, S., and Weber, B. (2011). Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(11), 2465-2472.
12. Bustos, M. (2012). Destino ambiental del glifosato en una zona arrocería del Tolima, Colombia. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Agronomía, Escuela de Posgrados Bogotá, DC, Colombia.
13. Calvet, R., Barriuso, E., Bedos, C., Benoit, P., Charnay, MP, Coquet, Y. 2005. Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et Environnementales. Éditions France Agricole. París, Francia.
14. Cetina, J. T., Pat, A. C., Muñoz, G. R., Cortes, J. T., Suaste, N. J., y Sunsa, H. L. (2018). Uso de la melanina del pulpo (*Octopus maya*) de Yucatán como agente antibacteriano. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*, 35(1), 0138-8452.
15. Cox, C. (1995). Glyphosate, Part 1: Toxicology. En: *Journal of Pesticides Reform*, Volume 15, Number 3. Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides, Eugene, OR, USA. 13p.
16. Di Fiori E., Pizarro H., dos Santos Alfonso M. and Cataldo D. (2012). Impact of the invasive mussel *Limnoperma fortunei* on glyphosate concentration in water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 81, 106-113.

17. Duellman, W. and Trueb, L. (1994). Biology of Amphibians. London and Baltimore, the Johns Hopkins University Press. p. 367-379
18. Dung, T. P., Connell, D., Miller, G., Rutherford, S., and Chu, C. (2012). Pesticide regulations and farm worker safety: The need to improve pesticide regulations in Viet Nam. Bulletin of the World Health Organization, 90(6), 468-473.
19. Eslava-Mocha PR, Ramirez-Duarte WF, Rondon-Barragan IS. (2007). Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: Impacto sobre peces nativos. Universidad de los Llanos. Colombia, 150 p.
20. Felsemburgh, F. A., Carvalho-E-SILVA, S. P. and De Brito-Gitirana, L. (2007). Morphological characterization of the anuran integument of the Proceratophrys and Odontophrynus genera (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Micron 38 (5): 439-445.
21. Fernández, R. E. D., Sánchez, F. R., y Fernández, W. P. (2017). Rinofima: presentación de dos pacientes. Medicentro Electrónica, 21(2), 174-179.
22. Galante-Mulki, M. C. (2018). Determinación anatomopatológica de posibles causas de muerte entre noviembre del 2016 a enero del 2018 en anfibios del Centro de Conservación Balsa de los Sapos.
23. García G.F., Cruz P.I, Mangione S. (2011). Caracterización histomorfológica de la piel de especies de Leptodactylus del grupo fuscus (Anura: Leptodactylidae), destacando la capa de Eberth-Katschenko. Acta Zool Lilloana 55: 33-43.
24. Georgieva, E., Yancheva, V., Velcheva, I., Mollov, I., Todorova, K., Tomov, S., Stoyanova, S. (2018). Glyphosate-based herbicide alters the histological structure of gills of two economically important cyprinid species (common carp, cyprinus carpio and bighead carp, aristichthys nobilis). Applied Ecology & Environmental Research, 16(3), 2295-2305.
25. Gines, H. (1959). Familias y géneros de anfibios Amphibia de Venezuela. Mem. Soc. Cienc. Nat. La Salle, 19(53), 85-146.
26. Gómez E. (2013). Efecto de una presentación comercial de glifosato en alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Tesis de Maestría, Universidad de los Llanos. 105 p.

27. Gosner, K. L., & Rossman, D. A. (1960). Eggs and larval development of the treefrogs *Hyla crucifer* and *Hyla ocularis*. *Herpetologica*, 16(4), 225-232.
28. Greven, H.; Zanger, K. and Schwinger, G. (1995). Mechanical properties of the skin of *Xenopus laevis* (Anura, Amphibia). *Journal of Morphology* 166:325-335.
29. Guarnizo, C.E., C. Escallón, D. Cannatella y A. Amézquita. (2012). Congruence between acoustic traits and genealogical history reveals a new species of *Dendrosophus* (Anura: Hylidae) in the high Andes of Colombia. *Herpetológica* 68: 523-540.
30. Haney R., Senseman S., Hons F. (2002). Effect of Roundup Ultra on microbial Activity and biomass from selected soils. *J Environ Qual*. 31(3): 730-735.
31. Hayes, T.B., Falso, P., Gallipeau, S., Stice, M. (2010). The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's Perspective. *J. Exp. Biol*. 213: 921-933.
32. Henao Muñoz, L. M., Montes Rojas, C. M., and Bernal Bautista, M. H. (2015). Acute toxicity and sublethal effects of the mixture glyphosate (Roundup® Active) and Cosmo-Flux® 411F to anuran embryos and tadpoles of four Colombian species. *Revista de biología tropical*, 63(1), 223-233.
33. Henson J.M., Butler M.J., Day A.W. (1999). The dark side of the mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol*. 37:447-71.
34. IUCN (2013). IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2013.2. www.iucnredlist.org Consultado: 03/12/2018.
35. Juan-Sallés, C., Almagro, V., Carbonell, L., Valls, X., Montesinos, A., y Fernández-Bellon, H. (2020). Enfermedades infecciosas y parasitarias en anfibios en cautividad: estudio retrospectivo de 131 pacientes. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*, 40(1), 15-27.
36. Kaczewer J. (2002). Toxicología del glifosato: Riesgos para la salud humana. Universidad Nacional de Buenos Aires.
37. Kalashnikova, M., (2000). "Ultrastructure of fish and amphibian liver during catabolism of degenerating erythrocytes", *Bulletin of experimental biology and medicine, Morphology and pathomorphology*, No. 1, pp. 101-104.
38. Kambic, A. (2016). Características morfohistológicas y cuantitativas del tegumento de *Odontophrynus americanus* (Amphibia, Odontophrynidae). Análisis comparado en dos ambientes con diferentes niveles de perturbación.

39. Kats L., Kiesecker J., Chivers D., Blaustein A. (2000). Effects of UV-B radiation on anti-predator behavior in three species of amphibians. *Ethology*, 106 (10): 921-931.
40. Kaufmann, K. y Dohmen, P. (2016). Adaption of a dermal in vitro method to investigate the uptake of chemicals across amphibian skin. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 1.
41. Kolpin D, Thurman M, Lee E, Meyer M, Furlong E, Glassmeyer S. (2006). Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Journal Science of the total environment*, 354: 191-197.
42. Kordylewski L. (1984). Egg pigmented is accumulated in the tadpole's brain. *Experientia*, 40(3):277-9.
43. Krüger M, Schrödl W, Neuhaus J, Shehata A A (2013). Field Investigations of Glyphosate in Urine of Danish Dairy Cows. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*. 3 (5): 1-7.
44. Lajmanovich, R. C., Sandoval, M. T., and Peltzer, P. M. (2003). Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 70(3), 0612-0618.
45. Maldonado, A. (2017). Tasas de pérdida de agua por evapotranspiración en dos especies de anfibios ecuatorianos con hábitos ecológicos diferentes: *Hypsiboas cinerascens* (Anura: Hylidae) y *Pristimantis unistrigatus* (Anura: Craugastoridae) (Bachelor's thesis, PUCE).
46. Mangione, S.; Garcia, G. y Cardozo, O. (2011). The Eberth–Katschenko layer in three species of ceratophryines anurans (Anura: Ceratophryidae). *Acta Zoologica (Stockholm)* 92: 21-26
47. Mann, R.M., Hyne, R.V., Choung, C.B., Wilson, S.P. (2009). Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environ. Pollut.* 157: 2903-2927.
48. Martínez, I. M., y R., M. Cruz. (2009). El uso de Químicos veterinarios Y Agrícolas en la zona ganadera de xico, centro de Veracruz, México Y el posible impacto ambiental. *Acta Zoológica Mexicana*, 25(3), 673-681.
49. Martinez, D., Loening, U., AND Graham, M. (2018). Impacts of glyphosate-based herbicides on disease resistance and health of crops: A review. *Environmental Sciences Europe*, 30(1), 1-14.

50. Menéndez, M. (2017). Efectos tóxicos del herbicida glifosato en animales. Montevideo, Uruguay.
51. Menéndez-Helman, R. J., Miranda, L. A., Salibián, A., y dos Santos Afonso, M. (2020). Effects on Ultrastructure, Composition and Specific Surface Area of the Gills of *Odontesthes bonariensis* Under Subchronic Glyphosate-Based Herbicide Exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 105(6), 835-840.
52. Monroy C.M., Cortés A.C., Sicard D.M., Groot de Restrepo H. (2005). Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica* 25: 335-345.
53. Murtaza F., Stallings W. (2001). Closing down on Glyphosate inhibition with a new structure for drug discovery. *Pnas*. 8(6): 2944-2946.
54. Navas, P. (1978). Morfología de la epidermis y glándulas anejas de los anfibios anuros, bufo calamita y rana ridibunda (Doctoral dissertation, Universidad de Sevilla).
55. Naya, D. E., Langone, J. A., y de Sá, R. O. (2004). Características histológicas de la tumefacción frontal de *Melanophryniscus* (Amphibia: Anura: Bufonidae). *Revista chilena de historia natural*, 77(4), 593-598.
56. Neškovic N K, Poleksic V, Elezovic I, Karan V, Budimir M (1996). Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate on Carp, *Cyprinus carpio* L. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 56: 295-302.
57. Nivia E., Sánchez L. (2001). Cultivos ilícitos. ¿Sustitución o erradicación? Notas aclaratorias sobre el uso del Roundup en Colombia. Rapalmira. Pan: Pesticide Action Network.
58. Partearroyo MA, Pilling SJ, Jones MN. (1991). The lysis of isolated fish (*Oncorhynchus mykiss*) gill epithelial cells by surfactants. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*; 100c:381388.
59. Peltzer, P. M.; Attademo, A. M.; Lajmanovich, R. C.; Junges, C. M.; Beltzer, A. H. y Sanchez, L. C. (2010). Trophic dynamics of three sympatric anuran species in a soybean agroecosystem from Santa Fe Province, Argentina. *Herpetological Journal* 20: 261-269.
60. Pérez-Iglesias, JM, Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., De Oliveira, C., Natale, GS, 2016. Efectos del glifosato en el tejido hepático evaluando las respuestas de melanomacrófagos y eritrocitos en anuro. *Leptodactylus latinasus*. *Reinar. Sci. Pollut. Control Ser.* 10, 9852 - 9861.

61. Piloni, N., Perazzo, J., Fernandez, V., Videla, L., Puntarulo, S., (2016). Sub-chronic iron overload triggers oxidative stress development in rat brain: implications for cell protection. *Biometals* 29, 119–130. doi:10.1007/s10534-015-9902-4
62. Ramírez, W. D.; Rondón, I. B.; Hoyer Vidal, B. y Eslava, P. (2009). Toxicidad aguda y lesiones histopatológicas en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) expuestas a la mezcla de herbicida Roundup® más surfactante Cosmoflux ® 411F. *Revista MVZ Córdoba* 14(1): 1563-1575.
63. Relyea R. (2012). New effects of Roundup on amphibians: predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. *Ecological Applications*, 22 (2): 634-647.
64. Reyes, M. E. A., Hondal, O. C., Hernández, J. T., & Alemán, M. A. T. (2003). Toxicidad aguda del herbicida químico glifosán en larvas de la rana cubana: *Osteopilus septentrionalis*.
65. Riaño, C., Ortiz-Ruiz, M., Pinto-Sánchez, N. R., y Gómez-Ramírez, E. (2020). Effect of glyphosate (Roundup Active®) on liver of tadpoles of the colombian endemic frog *Dendropsophus molitor* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 250, 126287.
66. Rohr, J. R., Schotthoefer, A. M., Raffel, T. R., Carrick, H. J., Halstead, N., Hoverman, J. T., and Beasley, V. R. (2008). Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*, 455(7217), 1235–1239.
67. Rosas-Castillo, M. E. (2012). Movilidad de glifosato en el suelo, agua de escurrimiento, persistencia y daño en el tejido vegetal del sistema de cultivo pasto-maíz, en Sucumbíos (Bachelor's thesis).
68. Ross, M. H., y Pawlina, W. (2013). *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular* / Michael H. Ross y Wojciech Pawlina (6a. ed.).
69. Sahin C, Turker M, Celasun B. (2014). Giant rhinophyma: Excision with coblation assisted surgery. *Indian J Plast Surg*.
70. Sicard, T. L., Salcedo, J. B., Pérez, C. T., Baquero, C. L., Rojas, C. N. R., and Hernández, C. P. R. (2005). Observaciones al “Estudio de los efectos del programa de erradicación de cultivos ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente”. Instituto De Estudios Ambientales (IDEA), Universidad Nacional De Colombia. Bogotá. 35p.

71. Solomon, K. R., Anadón, A., Cerdeira, A. L., Marshall, J., & Sanín, L. H. (2005). Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato (PECIg) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD).
72. Solomon, K. R., Anadón, A., Carrasquilla, G., Cerdeira, A. L., Marshall, E. J. P., and Sanin, L. H. (2007). Coca and poppy eradication in Colombia: Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. In Reviews of environmental contamination and toxicology (pp. 43-125). Springer, New York, NY.
73. Solomon, K. R., Anadón, A., Carrasquilla, G., Cerdeira, A., Marshall, J., and Sanin, L.-H. (2007) b. Coca and poppy eradication in Colombia: Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 190:43-125.
74. Svartz G.V., Herkovits J., Pérez-Coll C.S. (2012). Sublethal effects of atrazine on embryolarval development of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). Ecotoxicology 21(4):1251-1259.
75. Svartz, G. V. (2014). Evaluación de la toxicidad del endosulfán, la cipermetrina y un fungicida de uso comercial, solos y en mezclas sobre el desarrollo temprano de *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
76. Speare D.J., Ferguson H.W. (2006). Gills and pseudobranchs. In: Ferguson HW, editor. Systemic pathology of fish. A text and atlas of normal tissues in teleost and their responses in diseases. 2nd ed. London: Scotian Press p. 24-62.
77. Toledo, R. and Jared, C. (1995). Cutaneous granular glands and amphibian venoms. Comparative Biochemistry and Physiology 111A: 1-29.
78. Wells, D. (2007). The Ecology and Behavior of Amphibians. Chicago y London, The University of Chicago Press. 1162 p.
79. Williams G., Kroes R., Munro L. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, Glyphosate, for humans. Regulatory Toxicology and Pharmacology 31:117 – 165.
80. World Health Organization (WHO). (1994). United Nations Environment Programme, The international labour organization. 1994. Glyphosate. Environmental Health Criteria #159. Geneva, Switzerland.
81. Yáñez L., Ortiz D., Calderón J, Batres L., Carrizales L., Mejía J. (2002). Overview of human health and chemical mixtures: problems facing developing countries. Environ Health Perspect. 110:901–9.
82. Zar, J., 2010. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, New Jersey. USA, p. 5. ISBN: 97.

Referencias Virtuales:

- Software Image J 1.48v ([http:// imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/), 2013).
- R Core Team 2018. R: A language and environment for statistical computing. R