



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Naturales y Museo

**Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias
Naturales**

2022

**“Desarrollo de herramientas de diagnóstico clínico en
anfibios anuros para su utilización como indicadores
de calidad ambiental”**

Lic. María Florencia Bahl

**Directores: Dr Guillermo Sebastián Natale y Dra Céline Marie
Julie Brodeur**

Desarrollada con beca doctoral CONICET

**Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones del Medio Ambiente, CIM
(CONICET-UNLP)**

*A mis padres,
Graciela y Miguel*

AGRADECIMIENTOS

Al CONICET, por su beca que permitió que me dedique exclusivamente a esta tesis.

A la UNLP y la FCNyM por brindarme una educación pública y de calidad.

Al CIM por darme el espacio para desarrollar las tareas relacionadas con la tesis.

A mis directores, Guille y Julie por estar presente y guiarme a lo largo de todo este proceso de formación, tanto profesional como personal, por sus consejos, charlas y momentos compartidos que me permitieron conocerlos, y respetarlos y admirarlos como científicos y como personas. ¡Agradezco haberlos conocido y que hayan sido mis directores! A sus familias, que me recibieron en sus hogares en cada momento que fue necesario, compartiendo su tiempo y haciéndome sentir como en casa.

A Guille por “estar a la par” desde el primer al último momento, alentándome, enseñándome y transmitiéndome su pasión por cada cosa que hace.

A los jurados de la tesis por las sugerencias y correcciones realizadas.

A Horacio de Belaustegui por ser la persona que me contactó con el mundo de las ranas y con Guille.

A la gente del CIM, en especial a los que forman y formaron parte de la Unidad 5, grandes compañeros y compañeras con quienes compartimos muestreos, laboratorio, oficina y reuniones (Caro, Nadia, Juanma, Sansi, Eve, Vale, Ema, Fede, Fran, Mel). Gracias por todos los momentos compartidos y por hacer del laboratorio un buen lugar para trabajar. Especial agradecimiento a Ema, por ayudarme y acompañarme en las interminables jornadas de trabajo de mesada.

A las pasantes que colaboraron de manera activa en alguna etapa de la tesis: Sofi, Leda, Mica.

A Pablo Demetrio, “mi profe particular de estadística”, quien fue de gran ayuda al momento de realizar los análisis estadísticos. Por su paciencia para responder claramente miles de preguntas y despejar todas las dudas.

A Jorge Pessacq, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su colaboración en la medición de parámetros clínicos, y por apoyar la investigación científica. Agradezco también a las secretarias y técnicos de su laboratorio.

Al INTA Castelar, y a la gente del Instituto de Recursos Biológicos, principalmente a Belu, Jime, Flor y Dani por recibirme con buena onda en cada visita. Especial agradecimiento a Belu quien me acompañó en los primeros pasos en el trabajo de laboratorio.

A mi familia (Gra, Migue, Luli, Pato) que siempre me apoyó y acompañó en este camino que empezó en la facultad, incluso sin entender mucho qué es lo que hacía, pero festejando cada logro, a la par, y conteniéndome en los momentos complicados, e incluso acompañándome a algunos muestreos. Principalmente a mis padres (Gra y Migue) por estar a mi lado siempre y educarme desde el amor.

A Ger, el compañero que elijo todos los días, por acompañarme todos estos años, y por apoyarme incondicionalmente en todas las decisiones que tomo. Por las caminatas descontracturantes, y por bancarme siempre, sobre todo en los últimos tiempos pandémicos de redacción en casa. A su familia, mi familia.

A mis sobrinos, Loli y Bauti, porque sin saberlo, cada momento que compartimos me alegran el alma.

A mis tíos, tías, primos, primas y abuelo de Olavarría, especialmente a George que sé que estaría orgulloso de mí.

A mis amigos y amigas facultativos/as (Mati, Tabi, Mari, Nati, Palum) por los momentos compartidos, por las charlas biológicas, y por ser mi grupo de contención en esta carrera.

A mis amigas de la vida, Mica y Agus, por los momentos alegres que vivimos.

A todas las personas que me he cruzado en este camino, que han ayudado en alguna etapa de la tesis, no sólo metodológicamente sino también desde la inspiración **¡GRACIAS!**

INDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	13
ABREVIATURAS	16
INTRODUCCIÓN	19
Biología y ecología de los anfibios.....	19
Actividades antrópicas y efectos en ecosistemas.....	20
Ecotoxicología.....	22
Anfibios bioindicadores	24
Uso de biomarcadores	26
CAPITULO 1: ÁREA Y ESPECIES DE ESTUDIO	30
1.1 INTRODUCCIÓN	30
1.1.1 Ecosistemas	30
1.1.2 Actividades antrópicas	31
1.1.3 Especies de estudio.....	35
1.1.4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	37
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	38
1.2.1 Selección y descripción de los sitios de estudio.....	38
1.2.2 Caracterización fisicoquímica del agua y sedimento	45
1.2.3 Presencia de contaminantes en los sitios de estudio	46
1.2.4 Relevamiento de anfibios	46
1.2.5 Análisis estadísticos	46
1.3 RESULTADOS.....	46
1.3.1 Caracterización fisicoquímica del agua y sedimento	46
1.3.2 Presencia de contaminantes en los sitios de estudio	51
1.3.3 Relevamiento de anfibios	53
1.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	55
CAPITULO 2: OBTENCIÓN DE INTERVALOS DE REFERENCIA DE PARÁMETROS CLÍNICOS PARA <i>L. luctator</i> y <i>R. arenarum</i>	60
2.1 INTRODUCCIÓN	60

2.1.1 Estudios integrales.....	60
2.1.2 Concepto de estado de salud	61
2.1.3 Intervalos de referencia	62
Importancia y utilidad de los intervalos de referencia	62
¿Cómo obtener un intervalo de referencia?.....	63
Intervalos de referencia en especies silvestres	65
2.1.4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	67
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	67
2.2.1 Búsqueda de la información.....	68
Enfoque teórico	68
Enfoque práctico	68
2.2.2 Tratamiento de los datos y análisis estadísticos.....	70
Análisis de la variabilidad de los datos	70
Influencia del sexo de los individuos sobre la variabilidad	71
Obtención de intervalos de referencias para <i>L. luctator</i> y <i>R. arenarum</i>	71
2.3 RESULTADOS.....	71
2.3.1 Análisis de la variabilidad de los datos	72
Enfoque teórico	78
Enfoque práctico	78
Influencia del sexo de los individuos sobre la variabilidad	90
2.3.2 Obtención de valores de referencia para <i>L. luctator</i> y <i>R. arenarum</i>	91
2.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	94
CAPITULO 3: DESARROLLO DE HERRAMIENTA PARA EVALUACIÓN DEL ESTADO DE SALUD DE ANUROS PROVENIENTES DE SITIOS ALTERADOS POR LAS ACTIVIDADES ANTRÓPICAS	97
3.1 INTRODUCCIÓN	97
3.1.1 Estudios ecotoxicológicos en campo.....	97
3.1.2 Anfibios como bioindicadores-biomonitores	98
3.1.3 Uso de biomarcadores en anuros adultos provenientes del campo	99
Biomarcadores a nivel individuo:	100
Biomarcadores a nivel sanguíneo:.....	102
Biomarcadores a nivel inmunológico.....	103
Biomarcadores a nivel bioquímico.....	104

Biomarcadores a nivel genético	106
Biomarcadores a nivel plasmáticos	107
3.1.4 Integración de biomarcadores de diferentes niveles	107
3.1.5 Camino al desarrollo de un índice de salud.....	108
3.1.6 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	109
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	111
3.2.1 Sitios de muestreo y colecta de individuos:	111
3.2.2 Obtención de muestras biológicas y medición de biomarcadores:	112
3.2.3 Tratamiento de los datos:	118
3.2.4 Análisis estadístico:.....	119
Enfoque univariado	119
Enfoque multivariado	120
3.3 RESULTADOS.....	122
Enfoque univariado	122
Enfoque multivariado.....	134
3.4 DISCUSIÓN	140
3.4 CONCLUSIONES	151
CAPITULO 4: APLICACIÓN DE LA HERRAMIENTA	
PROPUESTA. ESTUDIO DE CASOS	153
4.1 INTRODUCCIÓN	153
4.1.1 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	154
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	155
4.2.1 Sitios de muestreo y colecta de individuos:	156
4.2.2 Obtención de muestras biológicas y medición de parámetros clínicos:.....	157
4.2.3 Tratamiento de datos y análisis estadístico	162
4.3 RESULTADOS.....	162
Escenario 2 - <i>Leptodactylus luctator</i> - 2017	
Enfoque univariado	162
Enfoque multivariado	168
Escenario 3 - <i>Leptodactylus luctator</i> - 2019	
Enfoque univariado	170
Enfoque multivariado	175
Escenario 4 - <i>Rhinella arenarum</i> - 2017	

Enfoque univariado	178
Enfoque multivariado	183
Escenario 5 - <i>Rhinella arenarum</i> - 2018	
Enfoque univariado	187
Enfoque multivariado	192
Escenario 6 - <i>Rhinella arenarum</i> - 2019	
Enfoque univariado	194
Enfoque multivariado	199
4.4 DISCUSIÓN	202
4.5 CONCLUSIONES	211
CAPITULO 5: CONSIDERACIONES FINALES Y	
CONCLUSIONES	213
REFERENCIAS	230
ANEXO 1: Tablas capítulo 2	256
ANEXO 2: Estudio de la variabilidad. ventajas y desventajas del uso de los parámetros clínicos propuestos	267
ANEXO 3: Tablas resumen de las pruebas de significancia para análisis univariados realizados	274
ANEXO 4: Salida del programa r con el detalle de los resultados de los análisis que no se muestran en los capítulos 3 y 4.	279
ANEXO 5. Protocolo de procesamiento y obtención de muestras de anuros adultos	317

RESUMEN

Las actividades antrópicas generan problemas ambientales tales como la contaminación, modificación, fragmentación y/o destrucción del hábitat, ocasionando efectos adversos sobre la biota y los procesos biológicos y ecológicos que ocurren en los ecosistemas. Estas actividades actúan como factores de estrés, los cuales desencadenan un conjunto de respuestas y provocan una alteración en la normalidad de los organismos, a la cual tienden a volver todo el tiempo a través de diversos mecanismos. La ecotoxicología es una disciplina que surge en respuesta a la necesidad de realizar diagnósticos ambientales y proporcionar herramientas para proteger el ambiente frente a las transformaciones generadas por los seres humanos. Para conocer el estado de los ecosistemas evaluados, se requiere de un estudio integral e interdisciplinario, generando información mediante estudios a diferentes niveles de organización ecológica reuniendo ideas y métodos de numerosas y variadas disciplinas en un marco ordenado y unificado de entendimiento (principio de consiliencia). Entre las estrategias de investigación que utiliza la ecotoxicología para abordar las problemáticas ambientales actuales se encuentra el esquema de “concatenación causa-efecto-significancia” que relaciona todos los niveles de organización de manera integral. Además, propone el uso de bioindicadores, biomarcadores y biomonitores como herramientas útiles para detectar, cuantificar y monitorear el impacto de factores externos en los ecosistemas, y para comprender su alcance temporal y espacial.

Los anfibios han sido propuestos como especies centinelas e indicadoras de la calidad ambiental debido a sus características ecológicas y biológicas. A pesar de ser un grupo muy diverso y presentar una amplia distribución, las poblaciones en diferentes regiones del mundo están disminuyendo e incluso extinguiéndose. En ese sentido, el objetivo general de la presente tesis doctoral fue desarrollar herramientas de diagnóstico clínico en anfibios anuros adultos empleando un enfoque multivariado a partir de la evaluación integral de biomarcadores a diferentes niveles de organización en dos especies de anuros autóctonos, para su utilización como indicadores de la calidad ambiental. Al considerar la complejidad de las problemáticas ambientales actuales, desde la Ecotoxicología y la Medicina clínica, se propone la realización de estudios integrales utilizando biomarcadores a diferentes niveles de organización para evaluar su objeto de estudio, ya que estos son interdependientes, por lo que su estudio integral permite obtener información con mayor representatividad y relevancia. Esto a su vez posibilitará mejorar

la comprensión de los resultados, contextualizar la interpretación de la información obtenida para diagnosticar el estado de salud de los individuos, y realizar inferencias más confiables sobre el impacto que producen los factores estresantes sobre los ecosistemas y sus componentes.

El presente trabajo de tesis presenta la información en 5 capítulos. En el primer capítulo, se describe el área y especies de estudio. En el área de estudio, se identificaron tres problemáticas ambientales notorias: cinturón florihortícola, industria petroquímica y descargas de efluentes cloacales. Además, se identificaron sitios de referencia, mínimamente alterados por estas actividades. Se detallaron las problemáticas ambientales estudiadas, y se realizó una descripción de los sitios de estudio a partir de la medición de características fisicoquímicas del agua y sedimentos y de la búsqueda bibliográfica sobre la presencia de contaminantes en dichos sitios; además, en cada sitio de estudio, se registró la presencia de anuros. A partir de la información obtenida pudimos caracterizar cada sitio de estudio y vincular dichas características con las actividades antrópicas que allí se desarrollan. En el capítulo 2, se realizó una revisión detallada de las publicaciones que evalúan y reportan información sobre los parámetros clínicos evaluados en la presente tesis en especies de anuros, y se llevó a cabo un análisis para conocer 1) la variabilidad de los datos aportada por las variaciones metodológicas producto de los procedimientos empleados por los diferentes grupos de investigación, 2) la variabilidad asociada con el grupo taxonómico, y 3) la variabilidad asociada con la procedencia de los individuos, con el fin de obtener información útil que permita generar intervalos de referencia confiables para las especies de estudio. El análisis permitió evidenciar que los parámetros evaluados presentan una gran variabilidad, y que la utilización de las diferentes fuentes de información nos llevaría a diagnósticos e interpretaciones diferentes. El análisis realizado nos brindó elementos para seleccionar el grupo de datos a emplear al momento de construir las tablas de intervalos de referencia, utilizando para dicho fin los datos obtenidos de los individuos de cada especie de estudio provenientes de sitios de referencia. En el capítulo 3, se desarrolló una herramienta para la evaluación integral del estado de salud de los anuros, utilizando individuos de *Leptodactylus luctator* como organismos de prueba. Para esto, se colectaron individuos adultos provenientes del cinturón florihortícola, la industria petroquímica, las descargas cloacales y un sitio de referencia. Se realizó el procesamiento y obtención de muestras de los individuos, y se midieron 27 parámetros clínicos a diferentes niveles (individuo: índice de condición corporal, hepatosomático, de cuerpos grasos y gonadosomático; sanguíneo: hematocrito,

recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, y los índices volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media; inmunológico: porcentaje de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos, recuento total de glóbulos blancos, recuento total de trombocitos, índice N:L; bioquímico: actividad glutatión S transferasa, catalasa y acetilcolinesterasa en hígado, riñón, músculo y plasma). Se analizó la respuesta individual y conjunta de los parámetros clínicos a partir de la aplicación de dos enfoques estadísticos (univariado y mutivariado) para interpretar e integrar la información proveniente de diferentes niveles. Además, se determinaron y evaluaron parámetros como la condición del sitio y la condición del individuo, a partir de la comparación de los valores de los parámetros clínicos con los intervalos de referencia obtenidos en el capítulo 2. Los análisis realizados permitieron determinar la efectividad y especificidad de los parámetros clínicos evaluados y las relaciones existentes entre ellos. En este capítulo se presenta una herramienta compuesta por un protocolo de procesamiento y obtención de muestras, la aplicación de dos enfoques estadísticos (uni y multivariado) para integrar la información obtenida, una lista de parámetros que permiten distinguir entre sitios, y recomendaciones de parámetros para ser utilizados en un índice de salud, el cual se puso a prueba en el capítulo 5. A partir de los resultados obtenidos pudimos determinar que los individuos provenientes del cinturón florihortícola, la industria petroquímica y las descargas cloacales presentan el estado de salud afectado. Considerando el empleo de la especie estudiada como bioindicador, pudimos realizar inferencias sobre la condición de los ecosistemas estudiados a partir del diagnóstico del estado de salud.

En el capítulo 4, se puso a prueba la herramienta propuesta en el capítulo 3 en diferentes escenarios, que incluyeron nuevos sitios, y la incorporación de una segunda especie de estudio (*Rhinella arenarum*), y se sumó la evaluación de parámetros a nivel plasmático. Al realizar una interpretación de los resultados obtenidos, pudimos observar que ambas especies resultaron adecuadas como objeto de estudio, ya que el procesamiento y obtención de muestras pudo ser realizado correctamente, obteniendo las muestras necesarias para la medición de cada parámetro clínico propuesto. En cuanto a los resultados obtenidos de los análisis estadísticos, pudimos observar que el empleo de los dos enfoques de análisis estadísticos propuestos brinda información complementaria y valiosa al momento de aplicar la herramienta propuesta, funcionando la herramienta como un todo. Tal como sucedió en el capítulo 3, a partir de los resultados obtenidos pudimos

determinar que los individuos provenientes del cinturón florihortícola, la industria petroquímica y las descargas cloacales presentan el estado de salud afectado.

Por último, en el capítulo 5, correspondiente a las consideraciones finales, se discutió y contextualizó la información obtenida, se plantearon nuevas preguntas de investigación, se discutieron los resultados, sus alcances, sus limitaciones, y se presentó un modelo conceptual (forma gráfica) diseñado a partir del aprendizaje logrado a lo largo de la tesis, el cual resulta interesante para entender y transmitir de manera simple, visual y didáctica los resultados de la tesis.

El presente estudio aporta elementos para la realización de estudios de calidad del ambiente de ecosistemas asociados con problemáticas ambientales complejas, empleando un conjunto de biomarcadores a diferentes niveles de organización, utilizando anuros autóctonos como bioindicadores a partir del diagnóstico integral del estado de salud de los individuos, resultando *L. luctator* y *R. arenarum* especies adecuadas para realizar este tipo de estudios.

ABSTRACT

Anthropogenic activities generate environmental problems such as pollution, modification, fragmentation and/or destruction of habitat, causing adverse effects on the biota and the biological and ecological processes occurring in ecosystems. These activities act as stress factors, which trigger a set of responses and cause alterations in the normality of organisms, to which they tend to return through various mechanisms. Ecotoxicology is a discipline that arose in response to the need to perform environmental diagnoses and provides tools to protect the environment from human-generated transformations. In order to know the state of the ecosystems being evaluated, an integral and interdisciplinary study is required, generating information through studies at different levels of ecological organization, bringing together ideas and methods from numerous and varied disciplines in an orderly and unified framework of understanding (principle of consilience). Among the research strategies used by ecotoxicology to address current environmental issues is the "cause-effect-significance concatenation" scheme that links all levels of organization in an integrated manner. It also proposes the use of bioindicators, biomarkers and biomonitors as useful tools to detect, quantify and monitor the impact of external factors on ecosystems, and to understand their temporal and spatial extent.

Amphibians have been proposed as sentinel species and indicators of environmental quality due to their ecological and biological characteristics. Despite being a very diverse and widely distributed group, populations in different regions of the world are declining, and even becoming extinct. In this sense, the general objective of this doctoral thesis was to develop clinical diagnostic tools in adult anuran amphibians using a multivariate approach based on the integral evaluation of biomarkers at different levels of organization in two species of native anurans, to be used as indicators of environmental quality. Considering the complexity of current environmental problems, from Ecotoxicology and Clinical medicine, it is proposed to carry out integral studies using biomarkers at different levels of organization to evaluate their object of study, as these are interdependent, allowing their integral study to obtain information with greater representativeness and relevance. This in turn will make it possible to improve the understanding of the results, contextualize the interpretation of the information obtained to diagnose the state of health of individuals, and make more reliable inferences about the impact of stressors on ecosystems and their components.

This thesis presents the information in 5 chapters. In the first chapter, the study area and selected species are described. In the study area, three environmental problems were identified: periurban green belt with intensive cultivation under cover, petrochemical industry, and sewage effluent discharges. In addition, reference sites, minimally altered by these activities, were identified. The environmental problems studied were detailed, and a description of the study sites was made based on the measurement of physicochemical characteristics of water and sediments, and a bibliographic search on the presence of pollutants; in addition, in each study site, the presence of anuran species was recorded. From the information obtained, we were able to characterize each study site and link these characteristics to the anthropic activities that take place there. In chapter 2, a detailed review was made of the publications that report information on the clinical parameters evaluated in this thesis in anuran species, and an analysis was carried out to determine i) the variability of the data provided by the methodological variations resulting from the procedures used by the different research groups, ii) the variability associated with the taxonomic group, and iii) the variability associated with the origin of the individuals, in order to obtain useful information to generate reliable reference intervals for the study species. The analysis showed that the parameters evaluated show great variability, and that the use of different sources of information would lead to different diagnoses and interpretations. The analysis provided us with elements to select the group of data to be used when constructing the reference intervals, using data obtained from individuals belonging to reference sites.

In chapter 3, a tool for the comprehensive assessment of anuran health status was developed, using individuals of *Leptodactylus luctator* as test organisms. For this purpose, adult individuals were collected from the periurban green belt, the petrochemical industry, a sewage discharges site, and a reference site. Individuals were processed and sampled, and 27 clinical parameters were measured at different levels (individual level: body condition index, hepatosomatic index, body fat index, and gonadosomatic index; hematological level: hematocrit, red blood cells, hemoglobin, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, and mean corpuscular hemoglobin concentration; immunological level: relative percentages of neutrophils, eosinophils basophils, monocytes, and lymphocytes, total white blood cells, total thrombocyte counts, N:L index; biochemical level: enzymatic activities of GST, CAT and AChE in liver, kidney, muscle and plasma). The individual and joint response of clinical parameters were analyzed by applying two statistical approaches (univariate and multivariate) to interpret

and integrate information from different levels. In addition, parameters such as site condition and individual condition were determined and evaluated by comparing the clinical parameter values with the reference intervals obtained in chapter 2. The analyses performed allowed determining the effectiveness and specificity of the clinical parameters evaluated and the relationships between them. This chapter presents a tool composed of a protocol for processing and obtaining samples, the application of two statistical approaches (univariate and multivariate) to integrate the information obtained, a list of parameters to distinguish between sites, and recommendations of parameters to be used in a health index, which was tested in Chapter 5. From the results obtained, we were able to determine that individuals from the periurban green belt, the petrochemical industry and sewage discharges sites have an affected state of health. Considering the use of the studied species as a bioindicator, we were able to make inferences about the condition of the ecosystems studied based on the diagnosis of the state of health.

In chapter 4, the proposed tool was tested in different scenarios, including new sites, the incorporation of a second study species (*Rhinella arenarum*), and the evaluation of parameters at the plasma level. Results showed that both species were suitable as test organisms since the processing and collection of samples could be carried out correctly, obtaining the necessary samples for the measurement of each proposed clinical parameter. In addition, the use of the two proposed statistical analysis approaches provides complementary and valuable information when applying the proposed tool. As indicated in the preceding chapter, we were able to determine that individuals from the periurban green belt, the petrochemical industry and sewage discharges sites have the most affected health status.

Finally, in chapter 5, corresponding to the final considerations, the information obtained was discussed and contextualized, new research questions were formulated, the results, their scope and limitations were discussed, and a conceptual model (graphic form) based on the learning achieved throughout the thesis was presented, which is interesting for understanding and transmitting the results of the thesis in a simple, visual, and didactic way.

The present study provides elements for carrying out studies of the environmental quality of ecosystems associated with complex environmental problems, using a set of biomarkers at different levels of organization, using native anurans as bioindicators from the comprehensive diagnosis of the health status of individuals, resulting *L. luctator* and *R. arenarum* species suitable for this type of studies.

ABREVIATURAS

A continuación, se presenta una lista de las abreviaturas y/o siglas utilizadas a lo largo de la presente tesis doctoral.

A/G: albumina/globulina

AC: análisis de contingencia

AChE: acetilcolinesterasa

ACP: análisis de componentes principales

AD: análisis discriminante

Alb: albúmina

Ami: amilasa

ANuc: anormalidades nucleares

Bas: basófilos

Ca: calcio

CAT: catalasa

CFH: cinturón florihortícola

CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media

CICUAL: Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

COL: colesterol total

Cond: conductividad

CPK: creatin fosfoquinasa

Creat: creatinina

CV: coeficiente de variación

DC: descargas cloacales

DE: desvío estándar

DQO: demanda química de oxígeno

Eos: eosinófilos

F: estadístico de prueba para el test de AVOVA

FA: fosfatasa alcalina

FRS: fósforo reactivo soluble

FT: fósforo total

Glob: globulinas

GST: glutatión S- transferasa
H estadístico de prueba para el test de Kruskal-Wallis
Hb : hemoglobina
HCM: hemoglobina corpuscular media
HDL: lipoproteínas de alta densidad
Hto: hematocrito
IC: intervalo de confianza
ICC: índice de condición corporal
ICG: índice de cuerpos grasos
IGS: índice gonadosomático
IHS: índice hepatosomático
IP: industria petroquímica
LDH: lactatodeshidrogenasa
LDL: lipoproteínas de baja densidad
Lin: linfocitos
LOI: materia orgánica total (perdida por ignición)
Mg: magnesio
MNs: micronúcleos
Mon: monocitos
MS222: metanosulfonato de tricaína 222
N:L: índice neutrófilos/linfocitos
Neu: neutrófilos
NH₄⁺: amonio
NO₂⁻: nitrito
NT: nitrógeno total
NTf: nitrógeno total filtrado
OD: oxígeno disuelto
OMS: organización mundial de la salud
P: fósforo
PT: proteínas totales
Q1: cuartil 1
Q3: cuartil 3

RGR: recuento de glóbulos rojos
RTGB: recuento total de glóbulos blancos
RTT: recuento total de trombocitos
SD: sólidos disueltos
SMS sangre mínima segura
SR: sitio de referencia
SS: sólidos en suspensión
ST: sólidos totales
Temp: temperatura
TGC: triglicéridos
TGO: aspartato aminotransferasa
TGP: alanina aminotransferasa
UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
Ur: urea
VCM: volumen corpuscular medio
VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad
VTS volumen total de sangre

INTRODUCCIÓN

Biología y ecología de los anfibios

La Clase Amphibia está compuesta por aproximadamente 8178 especies. Los anfibios ocupan casi todos los hábitats disponibles en la tierra, excepto los océanos abiertos, las islas oceánicas distantes y los confines del Ártico y la Antártida. Su modo de vida se puede describir de manera generalizada como terrestre, acuático, semiacuático, fosorial, arborícola, y ocupan una gran cantidad de hábitats asociados a charcas temporales o permanentes, pajonales inundables, ambientes forestales, urbanos, desérticos (Stebbin y Cohen, 1995; Wells, 2010).

La piel de los anfibios es desnuda, muy vascularizada y altamente permeable, lo que permite el paso del agua y gases respiratorios, pero les impide vivir en ambientes salados o estar activos en ambientes muy secos (Heatwole y Barthalmus 1994). La piel participa en la protección contra la abrasión y agentes patógenos, en la respiración y en la osmorregulación. En la tierra, al menos que el aire esté saturado de humedad, los anfibios generalmente pierden agua principalmente a través de la piel por evaporación, por lo que incorporan agua mediante la absorción cutánea desde un ambiente acuático o de lugares húmedos en la tierra, y también a partir de la ingesta. Cuando se encuentran en el agua, se enfrentan al problema opuesto: la absorción excesiva de agua por ósmosis (pase de agua de una región de baja concentración de soluto a una de mayor concentración). En este caso es el sistema excretor el que se encarga de eliminar el exceso de agua, y además en algunos casos de individuos mayormente acuáticos, existen modificaciones en la piel para hacer frente a este problema (Toledo y Jared, 1993). La piel también está involucrada en otros aspectos de la ecología de los anfibios. Presenta glándulas, las cuales son importantes para el cortejo, el reconocimiento sexual, y para la protección frente a sus depredadores (Barthalmus, 1994; Houck y Sever, 1994), además, los pigmentos presentes en la piel están involucrados en los cambios en la coloración, lo cual es importante para la comunicación, la regulación de la temperatura, y la protección contra los depredadores (Duellman y Trueb, 1994).

Si bien las diferentes especies poseen numerosos modos de vida, la mayoría dependen en cierta medida del agua para la reproducción incluso cuando los adultos son terrestres. Los anfibios presentan un ciclo de vida bifásico. Generalmente, inician la actividad reproductiva en respuesta a la lluvia, el aumento de la temperatura y los cambios en la duración del día, siendo la respuesta a estos factores variable según la especie. El

ciclo reproductivo comienza con movimientos migratorios de los machos hacia los cuerpos de agua, los cuales al llegar al sitio comienzan a agruparse y formar los coros reproductivos. Una vez formada la pareja, el macho “abraza” a la hembra en el momento de la puesta de huevos para asegurar la transferencia casi directa de los espermatozoides para la fertilización de los huevos en el medio acuático (fecundación externa). Los huevos no presentan cáscara, están unidos entre sí y protegidos por una sustancia gelatinosa. De los huevos eclosionan larvas de vida libre (renacuajos) que luego de la metamorfosis alcanza el estadio adulto, generalmente terrestre (Stebbin y Cohen, 1995; Wells, 2007).

Los anfibios poseen un rol importante en los ecosistemas acuáticos y terrestres como depredadores y presas (Crump, 2010). Las larvas son filtradoras, caníbales, depredadoras o herbívoras, mientras que los adultos se alimentan generalmente de artrópodos y en algunas ocasiones de pequeños vertebrados; y son presa de un gran número de especies de vertebrados (Stebbin y Cohen, 1995).

La pérdida de agua por evaporación a través de su piel, y el hecho de ser ectotérmicos y por lo tanto depender del entorno para controlar su metabolismo, contribuye a que los anfibios no migren grandes distancias (Brown y col., 2012). Estos tienden a permanecer dentro de áreas pequeñas (“home range”), y no migran grandes distancias desde el sitio donde eclosionaron y en caso de hacerlo, regresan con gran fidelidad a estos sitios para reproducirse (completando su ciclo de vida en ese lugar).

Todas las características biológicas y ecológicas mencionadas anteriormente hacen que los anfibios estén relacionados directa o indirectamente con el medio acuático, ya sea para la reproducción, el desarrollo de embriones y larvas, la alimentación, y el mantenimiento de la homeostasis, y que sean sensibles a cualquier cambio en el ambiente.

Actividades antrópicas y efectos en ecosistemas

Un ecosistema es el conjunto de organismos que viven en un área, su entorno físico y las interacciones entre ellos. Históricamente, los seres humanos han transformado los ecosistemas según sus necesidades. Desde la quema controlada por parte de las primeras sociedades cazadoras-recolectoras para facilitar la caza, transformando los paisajes cerrados en pastizales y bosques abiertos y alterando los hábitats para las especies nativas (Denevan 1992; Pyne 1995), hasta la transformación de la cobertura de los suelos para la domesticación de animales y plantas hace 10000 años que fue expandiéndose y perfeccionándose con el paso del tiempo. Hasta ese entonces, las transformaciones ambientales inducidas por el hombre eran pequeñas, locales o regionales. A partir de fines

del siglo XVIII, hubo un cambio social, económico y tecnológico que generó un aumento en el consumo de recursos naturales, con el consecuente impacto sobre el estado, composición y el funcionamiento de los sistemas naturales a nivel global (Turner y col., 1990). En los últimos tres siglos, la población humana aumentó 10 veces y se espera que en 2050 aumente a más de 9 000 millones (UNFPA 2001), por lo que se espera también un aumento en el uso de los recursos de los ecosistemas (Carpenter y col., 2009).

Las presiones generadas por las actividades humanas sobre los ecosistemas ponen en riesgo su capacidad de sustentar a las generaciones futuras (MA, 2005). Actualmente, más del 50 % de la superficie terrestre está transformada por acción humana directa (Vitousek y col., 1997), más de la mitad del agua dulce disponible en el planeta está destinada a uso humano (Postel y col., 1996), se perdieron más del 50% de los humedales costeros (IPCC, 2019); muchas especies animales están siendo explotadas o sobreexplotadas (WWF, 2020), han aumentado los gases de efecto invernadero (IPCC, 2019); y existe un aumento en la cantidad de contaminantes ambientales liberados en los ecosistemas (Steffen y col., 2003).

Entre las actividades antrópicas que transforman los ecosistemas se encuentran el establecimiento y expansión de centros urbanos, el establecimiento de industrias, y la práctica de la agricultura (Li y Huang, 2007; Wilson, 2013; Brito y col., 2015). Cada una de estas actividades genera estrés a través de diferentes factores físicos y químicos que pueden actuar solos o en conjunto sobre los sistemas naturales (McKinney, 2002; Haddad y col., 2015), considerando estrés a la respuesta o efectos perjudiciales en cualquier nivel de organización biológica, y factores de estrés a aquellos factores que causan esa respuesta o efecto (Newman, 2013). Si bien la magnitud y escala de estas actividades varía en todo el mundo según las demandas, el resultado final es el mismo: la transformación y degradación de los ecosistemas naturales y sus componentes a partir del uso indiscriminado de los recursos naturales para cubrir las necesidades humanas (Foley, 2005).

La contaminación se produce por el vertido voluntario o no, de sustancias a los ecosistemas, que pueden causar efectos adversos en los mismos. Los contaminantes se definen como sustancias que ingresan a un sistema natural por causa de la actividad antrópica directa o indirecta, o que se encuentran presentes en una concentración más elevada a lo normal y causa un efecto negativo sobre algún componente del ambiente (Orozco Barrenetxea, 2003). Las vías de ingreso más comunes de los contaminantes a los

ecosistemas son la aplicación directa, escorrentía desde zonas de aplicación de plaguicidas, aguas residuales urbanas o industriales y deposición atmosférica (Vitousek y col., 1997; Linder y Grillitsch 2000; Hill, 2010). Una vez que los contaminantes ingresan a los ecosistemas, según sus propiedades fisicoquímicas y las características del ambiente, interactúan con los diferentes compartimientos (aire, suelo, agua, biota) y para que un contaminante sea incorporado a un organismo, este debe estar biodisponible. La biodisponibilidad es la fracción de un contaminante en el medio que está libre para ser incorporada e interactuar con una parte o el total del organismo expuesto (Newman and Jagoe, 1994) a través de las siguientes rutas de exposición: dieta, absorción dérmica, transporte a través de superficies respiratorias.

Ecotoxicología

La ecotoxicología surge en respuesta a la necesidad de realizar diagnósticos ambientales y proporcionar herramientas para proteger el ambiente frente a las transformaciones generadas por los seres humanos. Aunque se sabe que existen cambios que se dan de manera natural en el ambiente, el planeta Tierra ha sido alterado por el ser humano y la tasa e intensidad de los cambios ocurridos en los últimos años es motivo de profunda preocupación ya que pone en riesgo su integridad (Cairns Jr., 2014).

La Ecotoxicología es una disciplina que surge en la década de 1970 tomando conocimientos derivados de la Toxicología y de la Ecología, definida en ese momento como “la rama de la Toxicología que comprende el estudio de los efectos tóxicos causados por contaminantes naturales o sintéticos sobre los componentes de los ecosistemas (incluyendo al hombre) en un contexto integrado” (Truhaut, 1977). A lo largo de los años han ido surgiendo diferentes definiciones, siendo algunas de las últimas la propuesta por Walker (2012) quien define a la ecotoxicología como “el estudio de los efectos nocivos de los productos químicos sobre los ecosistemas e incluye los efectos en los individuos y los consiguientes efectos en los niveles de población y superiores” y la propuesta por Newman (2014) quien la define como “la ciencia de los contaminantes en la biosfera y sus efectos sobre sus componentes, incluidos los humanos”.

En una definición más amplia, la Ecotoxicología es definida como “una ciencia jerárquica con muchos niveles” (Newman y Clement, 2008), los cuales corresponden a los niveles de organización biológica (nivel genético, molecular, bioquímico, celular, tisular, organismo, poblacional, paisaje, biosfera). La ecotoxicología tiene como objeto de estudio los efectos adversos provocados por contaminantes físicos, químicos o

biológicos sobre los diferentes componentes de un ecosistema, y también el destino y transporte de los mismos entre los compartimentos bióticos y abióticos (Newman y Clements, 2008). Para abordar el objeto de estudio, la ecotoxicología reúne ideas y métodos de otras disciplinas en un marco ordenado y unificado de entendimiento (principio de consiliencia), siendo las diferentes escalas de estudios las que condicionarán junto con la técnica aplicada para su estudio, su pertenencia a una u otra disciplina.

En este contexto, y para evitar confusiones en las escalas y especialidades asociadas, la ecotoxicología propone el esquema “concatenación causa-efecto-significancia” (figura 1) y lo utiliza como estrategia de investigación para abordar las problemáticas ambientales actuales relacionando todos los niveles de manera integral. En este esquema, se realiza una observación de procesos o efectos en un nivel, se buscan explicaciones en el nivel inferior y se predicen efectos en el nivel ecológico inmediatamente superior (Caswell, 1996).



Figura 1: esquema “concatenación causa-efecto-significancia”.

Todos los niveles aportan diferente información y poseen ventajas y desventajas en cuanto a su abordaje. El estudio de los niveles de organización inferiores tiende a ser más sencillo y de fácil vinculación a una causa específica. Los efectos a niveles inferiores se manifiestan más rápido en respuesta a la exposición al factor estresor los que se evidencian a través de la medición de cambios en los biomarcadores. Estos cambios son reversibles, es decir que los biomarcadores evaluados vuelven a sus valores normales ante la ausencia o disminución en la intensidad del factor estresor. Además, pueden indicar la

posibilidad de aparición de un futuro efecto adverso (alerta temprana) o proporcionar una idea de la causa de los efectos observados en los niveles superiores. Por otro lado, los estudios de efectos en niveles de organización superiores son más complejos, en general solo se pueden medir después de que haya ocurrido un daño significativo o permanente, por lo que son útiles para documentar y regular un problema existente (Newman, 2014).

La ecotoxicología propone el uso de bioindicadores, biomonitores y biomarcadores como herramientas útiles para detectar, cuantificar y monitorear el impacto de factores externos en los ecosistemas, y para comprender su alcance temporal y espacial. Un bioindicador es un organismo (o parte de un organismo o una comunidad de organismos) que contiene información sobre la calidad del medio ambiente (o una parte del medio ambiente). Un biomonitor, por otro lado, es un organismo (o una parte de un organismo o una comunidad de organismos) que brinda información cuantitativa sobre la calidad del medio ambiente. Un biomonitor siempre es un bioindicador, pero un bioindicador no siempre cumple los requisitos necesarios para ser un biomonitor. Los biomarcadores son parámetros medibles a nivel suborganismo (genético, enzimático, fisiológico, morfológico) en los que los cambios estructurales o funcionales indican influencias ambientales en general y la acción de los contaminantes en particular, siendo útiles como señales de alerta temprana (Huggett y col., 2018). Los biomarcadores complementan los datos de monitoreo químico al ofrecer una evaluación integrada de los efectos de los contaminantes en la salud de los organismos (Van der Oost y col., 2003, Cazenave y col., 2009).

Anfibios bioindicadores

Como mencionamos previamente, los anfibios están estrechamente vinculados con los ambientes acuáticos y presentan ciertas características que los hacen sensibles a los cambios en el ambiente. La presencia de piel permeable y vascularizada los hace sensibles a la presencia de contaminantes en el ambiente, los cambios en las propiedades fisicoquímicas del agua, y además los hace susceptibles a las enfermedades de la piel. La dependencia del agua para su reproducción y desarrollo, la embriogénesis expuesta por la ausencia de cáscara en sus huevos y la presencia de una larva de vida libre acuática los hace sensibles a diferentes factores físicos, químicos y biológicos desde las etapas más tempranas de su desarrollo. Además, la dependencia de los ambientes acuáticos y terrestres en las distintas etapas de su desarrollo hace que los individuos estén expuestos a diferentes perturbaciones en su hábitat durante todo su ciclo de vida. Y el hecho de que

no migran grandes distancias y que generalmente utilizan los mismos sitios para reproducirse, hace que permanezcan dentro de áreas pequeñas estando expuestos a los mismos factores de manera sostenida en el tiempo. Por último, el rol que ocupan en los ecosistemas acuáticos y terrestres como depredadores y presas los convierte en un enlace crítico en las redes tróficas, entre los niveles tróficos más bajos y altos de una comunidad (Blaustein y col., 1994; Brühl y col., 2013).

Cualquier factor de estrés que actúe sobre los ambientes en los que habitan los anfibios, provocará directa o indirectamente efectos en los individuos como la modificación de diversos procesos fisiológicos y una alteración de la homeostasis, generando un impacto negativo tanto en los individuos como en niveles ecológicos superiores (poblaciones, comunidades y ecosistema) (Blaustein y col., 2012).

Tal como describen Beketov y col. (2013) y Haddad y col. (2015) existe una crisis en la biodiversidad a nivel global y en ese contexto, existen evidencias que señalan a los anfibios como al grupo de vertebrados más amenazados (Stuart y col., 2004; Wake and Vredenburg, 2008; IUCN 2020). Los anfibios son uno de los primeros grupos en ser afectados por los estresores ambientales debido a sus características biológicas y ecológicas oportunamente mencionadas (Stebbin y Cohen, 1995; Wells, 2007). Considerando la sensibilidad de este grupo, y las particularidades ecológicas mencionadas anteriormente como su diversidad morfológica, el variado uso de hábitats, su presencia en la mayor parte de los ecosistemas y el hecho de que a pesar ser un grupo muy diverso y presentar una amplia distribución, las poblaciones en diferentes regiones del mundo están disminuyendo e incluso extinguiéndose (ver Blaustein y Wake, 1990; Carey y Bryant, 1995; Bee Bee y Griffiths, 2005; Houlahan y col., 2000; Davidson, 2004; Suarez y col., 2016) han sido propuestos como indicadores de la calidad del ambiente (Blaustein y col., 1994; Blaustein y Kiesecker, 2002).

La alteración y destrucción del hábitat y la contaminación ambiental se encuentran entre los factores que afectan las poblaciones de anfibios (Blaustein y col., 2011). A medida que ocurren estas alteraciones, las poblaciones quedan aisladas en fragmentos más pequeños, sin posibilidad de migrar. Esto genera vulnerabilidad a los factores que actúan sobre los ecosistemas fragmentados, quedando más expuestas a contaminantes ambientales, falta de alimento, competencia intra e interespecífica. Esta exposición provoca una respuesta de los individuos como parte del esfuerzo por mantener la homeostasis, conocida como estrés, aumentando la susceptibilidad a las enfermedades, las cuales pueden causar disminución e incluso desaparición de una población estresada y

aislada, siendo en muchos casos la causa de extinciones locales y regionales (Blaustein y col., 2012). Es por esto que el monitoreo a largo plazo se ha convertido en una herramienta muy valiosa para el estudio de las poblaciones naturales a partir de la evaluación del estado de salud, generando información útil para conocer las poblaciones en riesgo y proveer herramientas para protegerlas (Aguirre y col., 2008).

Como se mencionó anteriormente, un biomonitor es un organismo empleado en seguimientos cuantitativos y cualitativos de los niveles de contaminantes de un ecosistema y sus posibles repercusiones sobre el mismo. Los factores de estrés afectan a los anfibios a nivel molecular, fisiológico, individual, poblacional y comunidad (Blaustein 2012), por lo que es fundamental identificar y determinar la influencia y magnitud de los efectos producidos por las amenazas sobre las poblaciones de anfibios a partir de la obtención de datos de campo para evaluar el estado de salud de una población mediante técnicas de biomonitoreo (Egea-Serrano y col., 2012). La elección de individuos adultos está basada en que los individuos que habitan en los ecosistemas estudiados atravesaron todas las etapas sensibles de su ciclo de vida: estuvieron expuestos a diversos factores de estrés a través de numerosas vías (absorción por membrana del huevo; por piel, branquias y alimento en estadio larval, y por piel y alimento en estadio juvenil-adulto) y experimentaron los cambios del ecosistema en su historia reciente. Por otro lado, se asume que los efectos evaluados son producto de la exposición en un escenario real, que incluye tanto las interacciones de los individuos con los contaminantes a lo largo de su vida, como la influencia de factores intrínsecos y extrínsecos (de origen natural o antrópico), lo que resulta representativo de la problemática ambiental particular, y por lo tanto le da realismo ecológico al estudio (Bridges y Semlitsch, 2005).

Uso de biomarcadores

Los bioindicadores, biomonitores y biomarcadores constituyen herramientas importantes para la evaluación de los efectos que los contaminantes ambientales provocan sobre los ecosistemas y sus componentes. Como se mencionó anteriormente, los anfibios tienen ciertas características para ser utilizados como bioindicadores y biomonitores. Los biomarcadores son respuestas biológicas a nivel sub-individual (nivel molecular, bioquímico, fisiológico, histológico) por exposición a un factor de estrés. Debido a que los cambios subindividuales generalmente son detectables antes de que se observen efectos adversos en los niveles más altos de organización biológica (individuo, población, comunidad, ecosistema), los biomarcadores han sido propuestos como señales de alerta

temprana (Venturino y col. 2003, Sparling y col. 2010, Newman 2014). Esto representa una gran ventaja debido a que las respuestas a niveles más altos generalmente se pueden medir solo después de que se haya producido un daño significativo o permanente. Además, como las respuestas biológicas comienzan luego de la interacción de estresor con las biomoléculas en su sitio o célula diana, al evaluar los efectos tóxicos producidos desde niveles inferiores hasta niveles de organización superiores, se puede obtener información valiosa que permita hacer inferencias sobre efectos a niveles superiores (Van der Oost y col. 2003, Newman 2014). Más allá de la teoría que relaciona los niveles, existen evidencias que vinculan efectos a diferentes niveles. Por ejemplo, Medina y col. (2016) evidenciaron alteraciones en parámetros plasmáticos indicadores de daño hepático y renal, alteraciones en hígado y riñón mediante análisis histopatológicos y alteraciones en parámetros sanguíneos e inmunológicos en individuos expuestos a Cadmio; por otro lado, Jayawardena y col. (2017) relacionaron alteraciones en parámetros plasmáticos con evidencia histopatológica de daño hepático y renal en anfibios expuestos a metales pesados. Por lo tanto, detectar relaciones entre los biomarcadores pertenecientes a los diferentes niveles a partir de un estudio integral, teniendo en cuenta que los niveles de estudio son interdependientes, nos permitirá contextualizar e interpretar la información obtenida de un conjunto de biomarcadores para diagnosticar el estado de salud de los individuos (Cohen y col.2012; Warne y col., 2014).

Entre los biomarcadores empleados para evaluar efectos de estresores ambientales en anfibios podemos mencionar biomarcadores a nivel individual: efectos en el crecimiento, frecuencia de anormalidades, alteraciones en el comportamiento, presencia de parásitos; biomarcadores histológicos: presencia de histopatologías en diversos órganos; biomarcadores bioquímicos: alteración de actividad enzimática, alteración en la concentración de biomoléculas; biomarcadores genéticos: presencia de anormalidades nucleares (Sparling y col., 2010).

El estudio de muchos de los biomarcadores sub-individuales (genético, bioquímico, histológico), presenta como desventaja el uso de prácticas cruentas que requieren el sacrificio del animal, vinculado en parte con la disciplina y en parte con la técnica de medición utilizada y la cantidad de muestra necesaria. La utilización de animales en trabajos de investigación ha sido crucial en el desarrollo de la ciencia (medicina, biología, etc). En términos éticos, el fin de la investigación con animales debe ser beneficioso para el ser humano o los propios animales, y debe utilizar los animales racionalmente, con una metodología de trabajo adecuada. Es por eso que el uso de

animales para la investigación ha sido legislado a nivel internacional, para procurar su bienestar y evitar el sufrimiento y el uso indiscriminado. En el año 1977 se publicó la Declaración Universal de los Derechos del Animal, aprobada por UNESCO y ONU, con 14 artículos entre los que se incluye el cuidado y protección de los animales utilizados con fines científicos. En los últimos años ha aumentado el interés por el bienestar animal (compartido por nuestro grupo de trabajo), y se ha comenzado a investigar sobre alternativas que permiten evitar el sacrificio animal. Es en este contexto que los biomarcadores no destructivos han cobrado gran importancia, porque permiten estudiar efectos de los contaminantes en los individuos sin sacrificarlos, y de este modo se pueden desarrollar programas de biomonitorio, permitiendo a través de técnicas de captura y recaptura el estudio de un mismo individuo en muestreos sucesivos, e incluso estudiar el estado de las poblaciones de especies que están en peligro de extinción o presentan pocos individuos. Entre los biomarcadores no destructivos, uno de los más utilizados son los parámetros hematológicos y plasmáticos, los cuales se pueden estudiar a partir de la toma de una muestra de sangre (Cabagna y col., 2005; Davis y col., 2009; Wilson y col., 2011; Young y col., 2012), utilizando técnicas de análisis rutinarios en medicina humana para evaluar el estado de salud.

En resumen, las problemáticas ambientales representan un ambiente complejo, donde en cada una intervienen numerosos factores de estrés a los que están expuestos los individuos. Por lo que, para conocer el estado de los ecosistemas evaluados, se requiere de un estudio integral e interdisciplinario, generando información mediante estudios a diferentes niveles provenientes de diferentes disciplinas ambientales e interpretar los resultados y la información generadas basándonos en las ciencias ambientales y la Ecotoxicología (Newman y Clements, 2008; Newman, 2014). El uso combinado de las herramientas ecotoxicológicas como bioindicadores biomonitores y biomarcadores, permite evaluar la magnitud de la respuesta de un individuo a un factor de estrés, diagnosticar el estado de salud de los individuos y utilizarlos como señal de alerta temprana (Shugart y col., 1992, Markert y col., 2003).

En ese sentido, la presente tesis doctoral tuvo como objetivo general **desarrollar herramientas de diagnóstico en anfibios anuros a partir de la evaluación integral de biomarcadores a diferentes niveles de organización en dos especies de anfibios anuros autóctonos, para su utilización como indicadores de la calidad ambiental.**

El presente trabajo de tesis presenta la información en 5 capítulos. En el primer capítulo, se describe el área y especies de estudio. Se detallan las problemáticas ambientales estudiadas y se realiza una descripción de los sitios de estudio a partir de la evaluación de características fisicoquímicas del agua y sedimentos, y la presencia de contaminantes; y, además, se registra la presencia de especies de anfibios en cada sitio de estudio. En el segundo capítulo, se realiza una revisión de las publicaciones que evalúan y reportan datos de los diferentes parámetros clínicos en especies de anuros, y se lleva a cabo un análisis estadístico para conocer la variabilidad de los datos para cada parámetro clínico estudiado, teniendo en cuenta diferentes agrupamientos (1-todos los datos (bibliografía, base de datos del grupo de trabajo y datos de la tesis), 2- datos provenientes de la bibliografía (datos de la bibliografía y los datos obtenidos de la base de datos del grupo de trabajo), 3- datos de individuos de *L. luctator* de la tesis, 4-datos de individuos de *L. luctator* provenientes de los sitios de referencia, 5- datos de individuos de *R. arenarum* de la tesis, y 6- datos de individuos de *R. arenarum* provenientes de los sitios de referencia). Este análisis fue realizado para evaluar la variabilidad de los datos según los agrupamientos, y definir intervalos de referencia para cada parámetro clínico evaluado en *L. luctator* y *R. arenarum* para ser utilizados en el desarrollo de los próximos capítulos. En el tercer capítulo, se realiza la evaluación del estado de salud en individuos provenientes de sitios alterados por las actividades antrópicas (cinturón florihortícola, la industria petroquímica, las descargas cloacales, y un sitio de referencia) a partir de un estudio integral. Aquí se propone una herramienta que consiste en el procesamiento y obtención de muestras biológicas en individuos de *L. luctator* y posterior análisis estadístico integral que incluye un enfoque univariado y un enfoque multivariado. En el capítulo 4, se pone a prueba la herramienta propuesta en el capítulo 3 en diferentes escenarios, que incluyen nuevos sitios, e incluso otra especie de estudio (*R. arenarum*). Por último, en el capítulo 5, correspondiente a las consideraciones finales, se discute y se contextualiza la información obtenida, para presentar las conclusiones finales.

CAPITULO 1: ÁREA Y ESPECIES DE ESTUDIO

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 Ecosistemas

Los ecosistemas juegan un papel fundamental en el suministro de bienes y servicios para la supervivencia de los seres humanos (Daily, 1997; Sandhu, 2017). Estos bienes y servicios a menudo se denominan servicios ecosistémicos e incluyen diversos recursos y procesos. Se clasifican en cuatro categorías: 1) servicios de provisión: aquellos productos obtenidos del ecosistema, como alimento, agua, fibras, madera, combustible; 2) servicios de regulación: aquellos beneficios obtenidos de la regulación de los procesos de los ecosistemas como por ejemplo regulación del clima, regulación de perturbaciones como inundaciones o sequías, control de erosión y retención de sedimentos; 3) servicios culturales: aquellos beneficios obtenidos a través del enriquecimiento espiritual, recreación, experiencias estéticas y 4) servicios de soporte: aquellos servicios que son necesarios para la producción de todos los servicios, como ciclo de nutrientes, formación del suelo (Costanza y col, 1997; Daily, 1997).

En los últimos años ha aumentado la preocupación por ciertos sectores de la sociedad por el estado de los ecosistemas y se ha intentado documentar, analizar y comprender los efectos del cambio a partir de estudios integrales sobre el estado del planeta. Estos estudios incluyen la biodiversidad, los ecosistemas y sus servicios, así como las consecuencias de los cambios sobre el bienestar humano y la vida silvestre, y las acciones de conservación y uso sostenible de estos sistemas (MA, 2005; WWF, 2020). Estos estudios muestran que en los últimos años el ser humano ha producido cambios sin precedentes en los ecosistemas para satisfacer sus necesidades (alimentos, agua, energía) a expensas de la naturaleza, reduciendo su capacidad de brindar otros servicios claves como la purificación de aire y agua, la protección contra desastres naturales, causando una disminución de las poblaciones de diversas especies, la cual es más marcada en los trópicos (MA, 2005; Carpenter y col., 2009; WWF, 2018, 2020). Si bien se está creando conciencia sobre la importancia de mantener los ecosistemas y sus servicios, estos continúan degradándose a un ritmo acelerado.

1.1.2 Actividades antrópicas

Entre las principales actividades que modifican los ecosistemas se encuentra el uso de la tierra para producir bienes y servicios. Estas actividades producen una alteración en la estructura y normal funcionamiento de los ecosistemas, y en la forma en la que estos ecosistemas interactúan con la atmósfera, los sistemas acuáticos y la tierra circundante, y es una de las principales causas de la pérdida de biodiversidad en todo el mundo (Vitousek y col., 1997). La transformación de la tierra comprende una gran cantidad de actividades que varían en su intensidad y consecuencias. Desde la revolución industrial, las actividades humanas han destruido y degradado cada vez más bosques, praderas, humedales y otros ecosistemas importantes. El desarrollo de estas actividades genera problemas ambientales tales como la contaminación y modificación, fragmentación y/o destrucción del hábitat, ocasionando efectos adversos sobre los componentes de la biota y los procesos que ocurren en los ecosistemas, como así también en la población humana (Steffen y col., 2005). Se ha alterado el 75% de la superficie terrestre, la mayoría de los océanos están contaminados y se ha perdido más del 85% de la superficie de humedales (WWF, 2020).

En la ciudad de La Plata (Buenos Aires, Argentina) y en la ciudad de Chascomús se desarrollan diversas actividades que generan modificaciones del suelo para producir bienes y servicios, por lo que resultan representativas para el estudio de las problemáticas ambientales relacionadas con los diferentes usos del suelo como el avance de la frontera agrícola, el desarrollo industrial, y la descarga de efluentes cloacales relacionada con el crecimiento urbano (Hurtado y col., 2006; Torremorell y col., 2007). La región del Gran La Plata se ubica en el extremo sur del litoral de la región metropolitana de Buenos Aires, ocupando una superficie de 1162 km². Su población es de 702.449 habitantes y comprende los partidos de Ensenada, Berisso y La Plata, mientras que la ciudad de Chascomús se ubica en el centro – oeste de la Provincia de Buenos Aires, a 80 km de la ciudad de La Plata, con una población de aproximadamente 35.000 habitantes. Para el desarrollo de la presente tesis se han seleccionado tres problemáticas ambientales evidentes, desarrolladas en el área de estudio correspondiente a la ciudad de La Plata y alrededores y en la ciudad de Chascomús, las cuales se enumeran y describen a continuación: (figura 1.1):

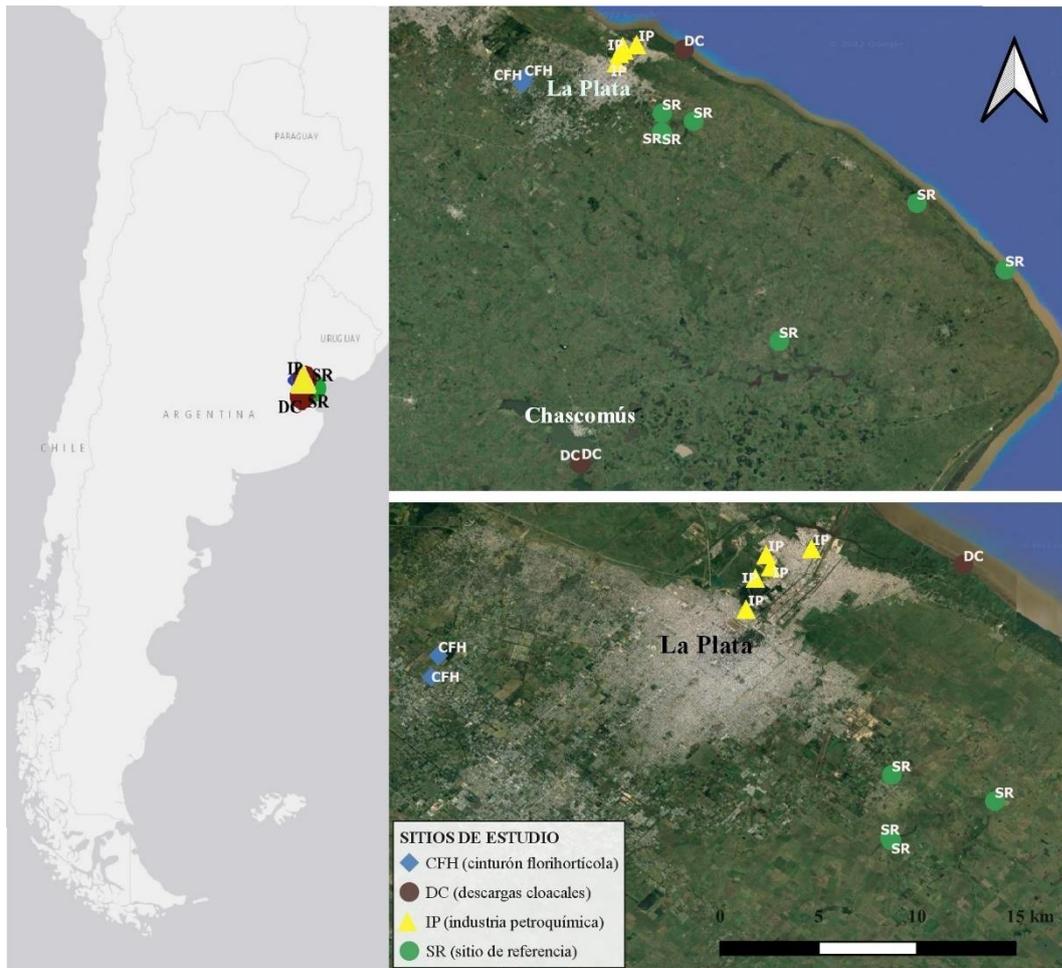


Figura 1.1: Mapa del área de estudio y sitios de muestreo correspondientes a cinturón florihortícola (CFH), descargas cloacales (DC), industria petroquímica (IP) y sitio de referencia (SR).

Florihorticultura

La agricultura afecta a los ecosistemas naturales debido a su dependencia del uso de plaguicidas y el uso intensivo de las tierras. Entre los problemas ecológicos que causa se encuentran la fragmentación y destrucción del hábitat, la llegada de los contaminantes a los diferentes compartimientos de la biósfera (agua, suelo, aire, biota), pérdida de diversidad genética de los cultivos, eutrofización de cuerpos de agua, cambios en las estructuras de las redes alimentarias, pérdida de fertilidad y erosión del suelo (Matson, 1997; Lasier y col., 2016). En el partido de La Plata (Buenos Aires, Argentina) predomina el cultivo hortícola por sobre la agricultura extensiva, por lo que se estudiará la problemática relacionada a este tipo de cultivo, a partir de la selección del Cinturón Hortícola y Florícola Platense (CFH) como sitio de estudio. El CFH es uno de los más importantes del país, que abastece entre el 60% y 90% de la verdura fresca que consume

la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y alrededores (Benencia 2002) y concentra más del 50 % de la producción del país de floricultura. Está ubicado en la zona periurbana al suroeste de la ciudad de La Plata con una superficie de 3709 hectáreas de las cuales aproximadamente el 65,5% se utiliza para la siembra a campo, y el 34,5% para cultivo bajo cubierta, y produce alrededor de 78860 toneladas por año (CHFB, 2005). Entre los principales cultivos hortícolas se encuentran acelga, alcaucil, brócoli, choclo, espinaca, lechuga, pimiento, repollo y tomate (Sarandón y col., 2015) y el principal destino de la producción es el mercado interno. El período de cultivo va desde agosto hasta mayo y coincide con el periodo reproductivo de los anfibios (Peltzer y col., 2008). Según un relevamiento de la utilización de agroquímicos en la Provincia de Buenos Aires, elaborado entre el Defensor del Pueblo y profesionales de la Universidad Nacional de La Plata en el año 2015, en el CFH se aplican 168 compuestos activos, de distintas categorías toxicológicas, presentando el valor más alto de índice de peligrosidad hortícola. La mayoría de los productores optan por utilizar plaguicidas organofosforados, carbamatos y piretroides, buscando aquellos de amplio espectro, y de menor precio, los cuales son riesgosos no sólo para el ambiente sino también para la salud de los trabajadores y consumidores (Souza Casadinho, 2009).

Industria petroquímica

Para el estudio de esta problemática se seleccionaron sitios que se encuentran en la zona de influencia de la industria petroquímica. El Polo Petroquímico comenzó su actividad en el año 1925 y está formado por varias industrias dedicadas mayoritariamente a procesos derivados de la explotación del petróleo para la elaboración de productos básicos intermedios o finales (Velazco y col., 2006). El procesamiento de petróleo genera emisiones de gases y vuelcos de productos que si no tienen algún tipo de tratamiento, pueden producir contaminación tanto del suelo, por enterramiento de desechos tóxicos; del aire, por emisiones de material particulado, compuestos orgánicos volátiles, hidrocarburos aromáticos, compuestos de azufre, entre otros; como del agua, por el vertido de hidrocarburos aromáticos, metales pesados y aceites a los canales adyacentes a la refinería (Botkin y Keller, 2010; Olawoyin y col., 2014; Santucci y col., 2017).

El Polo Petroquímico de La Plata es uno de los más importantes de América del Sur y el de mayor actividad industrial del país (Velazco y col., 2006). Ocupa una superficie de 300 hectáreas y está conformado por 27 plantas industriales divididas en tres grupos: unidades de petroquímicas, lubricantes, refinería y destilería. Su actividad se

basa en procesar todas las variedades de crudo que se extraen en el país y elaborar productos de mayor valor agregado (bases lubricantes, parafinas, extractos aromáticos y asfaltos y productos petroquímicos), pudiendo llegar a procesar 38.000 m³ de crudo por día y alcanzando una capacidad de refinación de 189 mil barriles por día (Cabrera Christiansen y Scandizzo, 2015), siendo los productos de mayor producción los polipropilenos, polibutenos, bencenos, n-hexanos, n-pentanos, toluenos, xilenos y carbón de petróleo, los cuales representa un considerable riesgo para la salud pública (Colman y col., 2018).

Descarga de efluentes cloacales

Las descargas de efluentes cloacales y domésticos pueden afectar la salud de los seres vivos y la calidad del ambiente ya que alcanzan los cuerpos de agua con escaso o nulo tratamiento (Walker y col., 2012). Entre las sustancias contaminantes presentes en aguas residuales encontramos no solo los desechos fisiológicos, sino también metabolitos de fármacos, hormonas naturales y sintéticas, y productos relacionados con el cuidado personal (Halling-Sorensen y col, 1998; Hirsch y col, 1999; Kolpin y col, 2002; Fabbri 2015; Bai y col., 2018). Estos desechos pueden encontrarse tanto en las fases líquidas de los medios acuáticos como en las sólidas asociadas (sedimentos). La alta concentración de bacterias coliformes y otros microorganismos patógenos trae aparejado enfermedades como la hepatitis, cólera, disentería, diarreas, giardiasis (Mariñelarena, 2006; Molina y col., 2011). Con respecto a los productos farmacéuticos y las hormonas, estos no son completamente metabolizados por el organismo, sino que son excretados por heces y orina tanto en su forma original como sus formas metabolizadas o conjugadas y terminan desechados a través de los desagües cloacales domiciliarios en forma continua (Ankley y col., 2007; Kamrath y col., 2014).

Para el estudio de esta problemática se escogieron dos sitios de descarga de efluentes cloacales puntuales: el Río de La Plata, ubicado en la Avenida Río de La Plata, en la ciudad de Berisso, al cual se producen las descargas de efluentes cloacales provenientes de las ciudades de La Plata, Berisso, Ensenada y alrededores con un escaso o nulo tratamiento (Ministerio de Infraestructura y Servicios Públicos, 2004). Este se encuentra roto hace más de 40 años, por lo que existe un permanente contacto con la costa. El otro sitio seleccionado, se ubica en la ciudad de Chascomús, y corresponde a la zona de descarga de efluentes cloacales provenientes de la misma ciudad. Los desechos cloacales son conducidos a una estación depuradora de aguas residuales con tratamientos

convencionales primarios y secundarios, y el efluente se vacía por una tubería de 6 km de longitud a un canal artificial de 200 metros que desemboca en el arroyo Girado, que se encuentra 300 metros aguas debajo de una compuerta que controla los niveles de agua de la Laguna de Chascomús, de uso recreacional. Sin embargo, la planta se encuentra afectada en cuanto a su capacidad para depurar eficazmente los efluentes cloacales ya que no cuenta con el equipamiento necesario en funcionamiento para lograr rendimientos de depuración que permitan cumplir las normas de vertido en condiciones normales (DINAPREM, 2018).

Sitios de referencia

Estos sitios son fundamentales para comparar los resultados obtenidos de las problemáticas ambientales estudiadas. Actualmente, es poco probable hallar sitios libres de contaminación, por lo que se toman como tales a los sitios lo suficientemente alejados de las problemáticas ambientales estudiadas, que no reciban influencia directa de las problemáticas a evaluar, considerándose como mínimamente perturbados. De los cinco sitios escogidos como referencia, dos se encuentran en la planicie de inundación del arroyo El Pescado, en los cuales se forman charcas temporarias luego de las lluvias, o por ingreso de agua del arroyo. Los otros tres sitios restantes, se ubican en el partido de Magdalena, uno corresponde a la Reserva Natural “El Destino”, y los otros dos corresponden a caminos de tierra con escaso tránsito automovilístico, y sin urbanización cercana, por lo que se espera que tengan mínima influencia de las actividades antrópicas mencionadas anteriormente.

1.1.3 Especies de estudio

Como se mencionó en la introducción, los anfibios presentan ciertas características anatómicas y ecológicas que los hacen buenos candidatos para ser bioindicadores de la calidad ambiental ya que son vulnerables a los factores que actúan sobre los ecosistemas donde habitan (Steven and Cohen, 1995; Blaustein y col., 2011). Las especies seleccionadas para el presente estudio corresponden a una rana, de hábitos semiacuáticos, *Leptodactylus luctator*, y un sapo de hábitos principalmente terrestre, *Rhinella arenarum*.

Leptodactylus luctator (figura 1.2a), comúnmente llamada “rana criolla”, es una especie de rana semiacuática perteneciente a la familia Leptodactylidae, cuya distribución

abarca desde el centro-sur de Brasil, Uruguay, sudeste de Paraguay, extremo este de Bolivia, y Argentina, hasta la provincia de San Juan (Magalhaes y col., 2020).

Es una especie de tamaño grande, cuya longitud hocico-cloaca alcanza los 12 cm en hembras y 14 cm en los machos (Ceí 1980; Magalhaes y col., 2020). El dimorfismo sexual es marcado, el macho presenta un mayor tamaño corporal que la hembra, y desarrolla hipertrofia de los miembros anteriores y pectorales, junto con la presencia de espinas córneas en el dedo I de miembros anteriores y en los pectorales. Ambos sexos presentan dorso verdoso o pardo amarillento, con varias cadenas glandulares longitudinales y manchas grandes oscuras con bordes claros. Se alimentan de artrópodos terrestres y acuáticos como coleópteros, isópteros e himenópteros, y pequeños vertebrados como otros anuros, roedores y aves (Gallardo, 1974; Sanabria y col., 2005). La reproducción ocurre en la primavera y principios del verano, en coincidencia con la estación de lluvias y el aumento de la temperatura (Lavilla y Rouges 1992). La oviposición ocurre en el cuerpo de agua y se forma un nido de espuma que se adhiere a la vegetación. Este se forma a partir de la secreción de sustancias producidas en el oviducto, las cuales, al ser batidas con los miembros posteriores del macho y la hembra, forman una espuma blanca que flota, donde se depositan y fecundan los ovocitos (Lavilla y Rouges 1992). Este nido de espuma posee forma circular con un hueco en el centro donde, generalmente, permanece la hembra cuidando el nido. Las larvas eclosionan y mantienen un comportamiento gregario, cuidadas por la hembra. La especie es utilizada con fines culinarios, sin embargo, su estado de conservación es de “menor preocupación” (UICN, 2020).

Rhinella arenarum (figura 1.2b) comúnmente llamado “sapo común” es una especie de sapo terrestre perteneciente a la familia Bufonidae, que tiene amplia distribución por el sur de Brasil, Uruguay, este de Bolivia y Argentina, hasta el norte de Chubut (Kwet y col., 2004). Es una especie de tamaño grande, presentando los individuos adultos una longitud hocico-cloaca entre 8 y 11 cm en machos y entre 9 y 12 cm en hembras (Ceí, 1980). Ambos sexos tienen manchas oscuras diseminadas dorsoventralmente y un vientre blanquecino. Los machos presentan colores marrón o verdoso en el dorso, mientras que las hembras son de color marrón claro o grisáceo (Ceí, 1980). Se alimentan de insectos, lombrices y crustáceos terrestres. La reproducción ocurre durante la primavera y principios del verano, lo cual coincide con la estación de lluvias. La reproducción se lleva a cabo en cuerpos de agua temporales o charcas que suelen formarse por desbordes de arroyos o directamente a campo inundado en ocasión de lluvia

intensa, aunque también aprovechan zanjas y cualquier tipo de depósito de agua a ras del suelo generados artificialmente por el hombre. Los machos comienzan a cantar desde el agua o desde el borde de la charca. La fecundación es externa, la hembra comienza a expulsar los huevos, pequeños y oscuros en cordones gelatinosos, que son fecundados por el macho en los cuerpos de agua (Ceí, 1980). La especie es utilizada para fines educativos y científicos, sin embargo, su estado de conservación es de “menor preocupación” (UICN, 2020).

En lo que respecta a estudios ecotoxicológicos, varios autores han trabajado utilizando *R. arenarum* como modelo de estudio, utilizando embriones y larvas en bioensayos de toxicidad (Ferrari y col., 2008; Lascano y col., 2011; Liendro y col., 2015; Peltzer y col., 2017); y evaluando efectos de contaminantes en adultos (Rosemberg y col., 2003; Cabagna y col., 2005; Chiesa y col., 2006). Por otro lado, son escasos los estudios realizados empleando *L. luctator*, (en larvas: Bach y col., 2016; en adultos: Brodeur y col., 2011).



Figura. 1.2: Especies de estudio. a) *Leptodactylus luctator*; b) *Rhinella arenarum*

1.1.4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Los sitios seleccionados para el presente estudio presentan características fisicoquímicas del agua y sedimento asociadas a cada problemática estudiada (florihorticultura, industria petroquímica, descargas de efluentes cloacales, sitios de referencia).

Las especies de anfibios se encuentran presentes en los sitios de estudio.

Objetivos

- 1- Realizar una descripción de los sitios de estudios mediante la evaluación de las características fisicoquímicas del agua y sedimentos, y la presencia de contaminantes.
- 2- Registrar la presencia de especies de anfibios en cada sitio de estudio.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Selección y descripción de los sitios de estudio

Para la elección de los sitios de estudio, en primer lugar, se identificaron las zonas de la ciudad de La Plata y alrededores y de la ciudad de Chascomús donde se desarrollan las actividades antrópicas estudiadas: florihorticultura, industria petroquímica, descargas de efluentes cloacales, y además sitios que se encuentren alejados de dichas actividades, mínimamente perturbados, considerados como sitios de referencia. Una vez identificadas las zonas, se realizaron recorridos para la selección de los sitios de estudio para lo cual se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

Uso del suelo. Se identificaron sitios con diferentes usos del suelo considerando las actividades antrópicas estudiadas.

Grado de contaminación. Se consideraron sitios que contaran con información previamente publicada, con evidencia de contaminación específica de cada actividad. Además, se tuvieron en cuenta aquellos sitios que actualmente están siendo estudiados por otros investigadores de nuestra universidad.

Factibilidad y accesibilidad. Se consideraron las distancias y la accesibilidad a los sitios y, en caso de ser propiedad privada, también se consideraron los permisos de acceso por parte de los propietarios. Se priorizaron sitios en zonas relativamente cercanas, de fácil acceso, con caminos en buen estado (calles asfaltadas que permitan el acceso durante y/o luego de lluvias) y en los cuales se contara con los permisos y autorizaciones por parte del propietario, o de instituciones gubernamentales.

Calificación de los ambientes. Se seleccionaron ambientes que presenten características necesarias para la presencia y reproducción de las especies de anuros de la región.

De un total de 35 sitios visitados, se seleccionaron 18 según los criterios tenidos en cuenta para el desarrollo de la presente tesis. En la figura 1.1 y tabla 1.1, se muestran su ubicación y coordenadas, respectivamente.

Tabla 1.: Sitios de estudio seleccionados indicando.

Problemática	Sitio	Latitud	Longitud
Referencia	(SR0) Control - Frison	-34.9850°	-57.8562°
	(SR1) Control - El Destino	-35.1513°	-57.3891°
	(SR2) Control - Eden	-35.0218°	-57.8565°
	(SR3) Control - Punta Indio	-35.2747°	-57.2274°
	(SR4) Control - R20	-35.4066°	-57.6418°
Florihortícola	(SR5) Control – Molfesa	-35.0206°	-57.8573°
	(CFH1) Florihortícola - S5	-34.9201°	-58.1143°
Descargas cloacales	(CFH2) Florihortícola - S1	-34.9301°	-58.1128°
	(DC1) Cloaca Chascomús	-35.6308°	-58.0046°
	(DC2) Cloaca Berisso	-34.8668°	-57.8163°
Petroquímica	(DC3) Cloaca Chascomús (fondo)	-35.6332°	-58.0071°
	(IP1) Petroquímica - Pelotas	-34.8919°	-57.9364°
	(IP2) Petroquímica - Gesa	-34.8744°	-57.9312°
	(IP3) Petroquímica - Cementerio	-34.8612°	-57.9252°
	(IP4) Petroquímica - Extremo	-34.8680°	-57.9227°
	(IP5) Petroquímica - Arenal	-34.8578°	-57.8998°
	(IP6) Petroquímica – C. Este 1	-34.8928°	-57.9136°
	(IP/) Petroquímica – C. Este 2	-34.8812°	-57.9005°

*Entre paréntesis figura el número de referencia de cada sitio, utilizado a lo largo de la tesis

Como **Referencia** se seleccionaron seis sitios (figura 1.3). Los **sitios SR0, SR2 y SR5** se encuentran en la planicie de inundación del arroyo “El pescado” entre 11 y 14 km del centro de la ciudad de La Plata. El **sitio SR0** se ubica en un campo privado sobre avenida 7 a la altura de la calle 536. Esto le confiere un fácil acceso, con calle asfaltada, y se cuenta con permiso para ingresar por parte del dueño. Está ubicado en un sector topográficamente bajo y presenta un bloqueo artificial del escurrimiento natural del agua, lo que favorece la acumulación de agua de lluvia formándose una charca semi permanente con una superficie aproximada de 1 ha y una profundidad máxima de 60 cm. La vegetación predominante es de pastizal, con pocos árboles en su mayoría talas y abundantes plantas acuáticas. El **sitio SR2** se ubica en un campo al costado del puente que conduce a la localidad de Ignacio Correa. Corresponde a un sector topográficamente bajo, en el cual se acumula agua luego de las lluvias y por desborde del arroyo “El Pescado”, lo que favorece la formación de una charca semi permanente con una superficie aproximada de 1 ha y una profundidad máxima de 90 cm, cuya vegetación predominante es de pastizal. En las zonas más altas se forman canales rodeados de gramíneas con una profundidad máxima de 40 cm. El **sitio SR5** se ubica en un campo privado a 100 m del

puente que conduce a la localidad de Ignacio Correa, a 200 metros del SR2. El acceso es fácil ya que la calle principal está asfaltada y además se cuenta con los permisos por parte de los dueños del campo. Corresponde a una charca semipermanente de 200 m² aproximadamente, la cual está rodeada por un pajonal de cardas donde predominan pastizales, juncos, totoras, y presenta con una zona central con una profundidad máxima de 90 cm donde predominan *Lemna sp.*, helechitos de agua. Por otro lado, los **sitios SR1, SR3 y SR4** se ubican en el partido de Magdalena. El acceso a estos sitios es relativamente fácil ya que se accede por camino de tierra, lo que favorece la baja circulación de automóviles, pero luego de copiosas lluvias queda anegado. El **sitio SR1** se encuentra en las inmediaciones de una Reserva Natural y corresponde a los márgenes del arroyo Primera Estancia, cerca de su desembocadura en el Río de La Plata. La vegetación predominante es de pastizal, y presenta abundantes plantas acuáticas (totoras, repollitos de agua). El **sitio SR3** se ubica en la localidad de Punta Indio, partido de Magdalena, Buenos Aires. A 500 metros del Río de La Plata, con la vegetación típica de pastizales. El **sitio SR4** se ubica al margen de la Ruta 20; corresponde a charcas temporarias de aproximadamente 100 m² y 50 cm de profundidad, formadas con agua de lluvia y por desborde de arroyos que atraviesan la zona donde predominan cola de zorro, lentejas de agua y saetas y helechito de agua, y la vegetación típica de pastizales. En todos los sitios de referencia, menos en el sitio SR0, se observó pastoreo de ganado vacuno.



Figura 1.3: Sitios de estudio seleccionados como sitio de referencia. SR: sitio de referencia.

Para el estudio de la problemática **florihorticultura** (figura 1.4), se seleccionaron sitios ubicados en la planicie de inundación del arroyo “El Carnaval” totalmente inmerso en el cinturón florihortícola platense (**sitio CFH1 y CFH2**), al cual se asocian numerosos invernaderos que escurren el agua de riego. Para acceder a ambos sitios contamos con permiso del dueño del campo, pero luego de fuertes lluvias se dificulta el ingreso ya que no cuentan con calles asfaltadas. En dicho campo existen charcas temporarias que se forman a lo largo del recorrido del arroyo, a partir de las lluvias e ingreso de agua del arroyo con una profundidad máxima de 50 cm. La vegetación típica de estos sitios es de pastizal, en el arroyo se observan totoras y repollitos de agua tanto en los márgenes como en la superficie. Un sector del arroyo se encuentra inmerso en una zona de cultivo de soja y no presenta ningún tipo de vegetación, ya que los cultivos se extienden hasta el margen del arroyo, y los productos de fumigación llegan a este tanto por escorrentía como por aplicación directa (observación personal).



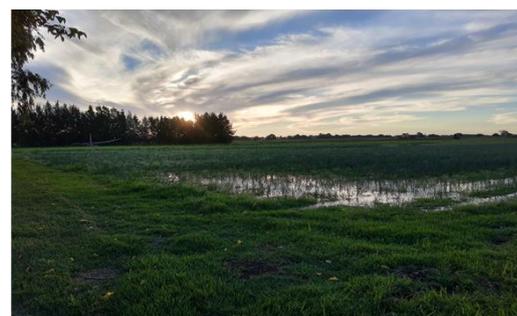
CFH1



CFH1



CFH2



CFH2

Figura 1.4: Sitios de estudio seleccionados para la problemática Florihorticultura. CFH: cinturón florihortícola.

Para la problemática correspondiente a la **industria petroquímica** se seleccionaron cinco sitios localizados en la zona de influencia del Polo Petroquímico. (figuras 1.5 y 1.6). Todos los sitios son de fácil acceso ya que cuentan con calles

asfaltadas. El **sitio IP1**, corresponde a una zanja de desagüe que se encuentra al costado del Camino Vergara a 5 km del centro de la Ciudad de La Plata, y 2.5 km de la puerta de acceso principal a la petroquímica. La zanja tiene un ancho de dos metros y una profundidad máxima de 60 cm y se puede encontrar una vegetación variada, observándose gramíneas, saetas, junquillos y eucaliptos. En el año 2017 este sitio sufrió alteración por la realización de diversas obras, por lo que solamente pudo ser estudiado en el año 2016. El **sitio IP2** se encuentra ubicado sobre camino Rivadavia que une la ciudad de La Plata con la ciudad de Ensenada. Se encuentra en el camino de ingreso de una empresa, y contamos con el permiso del jefe de Planta. Este sitio corresponde a una zona baja de inundación que recibe agua de lluvia y en cuyo sitio hay varias charcas de 30 cm de profundidad, y está conectado a una zanja de desagüe que está ubicada al costado de la ruta que presenta una profundidad de 110 metros en el centro. Presenta gran cantidad de eucaliptos, cuyas hojas caen a la charca y tiñen el agua de color marrón. El **sitio IP3**, está ubicado sobre el Camino Rivadavia, en frente a la industria petroquímica. En este sitio se forman charcas semipermanentes por agua de lluvia, rodeadas por vegetación típica de pastizal, las cuales se secan a los pocos días. En el año 2018 comenzaron a realizarse obras de relleno, motivo por el cual no fue posible realizar estudios durante los años siguientes. El **sitio IP4** está ubicado a 200 m del sitio 12, en la calle llamada “By pass” que une el camino Rivadavia y el Camino Vergara. Corresponde a un campo ubicado en frente de la industria petroquímica. En este sitio se forman charcas semipermanentes por agua de lluvia, las cuales presentan una superficie de 100 m² y una profundidad aproximada de 10 a 30 cm y predominan las gramíneas. Es un campo utilizado para alimentación del ganado equino. El **sitio IP5** está ubicado a 9 km del centro de la ciudad de La Plata, frente a la arenera de Ensenada con acceso por calle asfaltada. Se encuentra a 2,6 km de la puerta de acceso principal de la petroquímica. Este sitio corresponde a una zona baja de inundación que recibe agua de lluvia y en cuyo sitio hay un basural formado por desechos domiciliarios. En sus alrededores se pudo observar la presencia de tala, gramíneas y lirios amarillos. Los sitios IP6 e IP7 se ubican sobre el canal ubicado sobre la Avenida del Petróleo Argentino lo cual les confiere fácil accesibilidad. El IP6 corresponde a un sector del canal que está siendo remediado, con un sistema de aireación continua, mientras que IP7 no presenta ningún tipo de remediación. Ambos canales se corresponden con ambientes lóticos, presentan un ancho de 2, 3 metros y una profundidad que varía según la abertura de compuertas que permiten el ingreso del agua del río de La

Plata. En los bordes del canal se puede observar la presencia de gran cantidad de gramíneas y plantas de *Ipomea palmata* y en la superficie del agua se ve una capa aceitosa.



IP1 (antes)



IP3 (antes)



IP1 (después)



IP3 (después)

Figura. 1.5: Sitios de estudio seleccionados para la problemática petroquímica, donde se observa el antes y después de las modificaciones. IP: industria petroquímica.

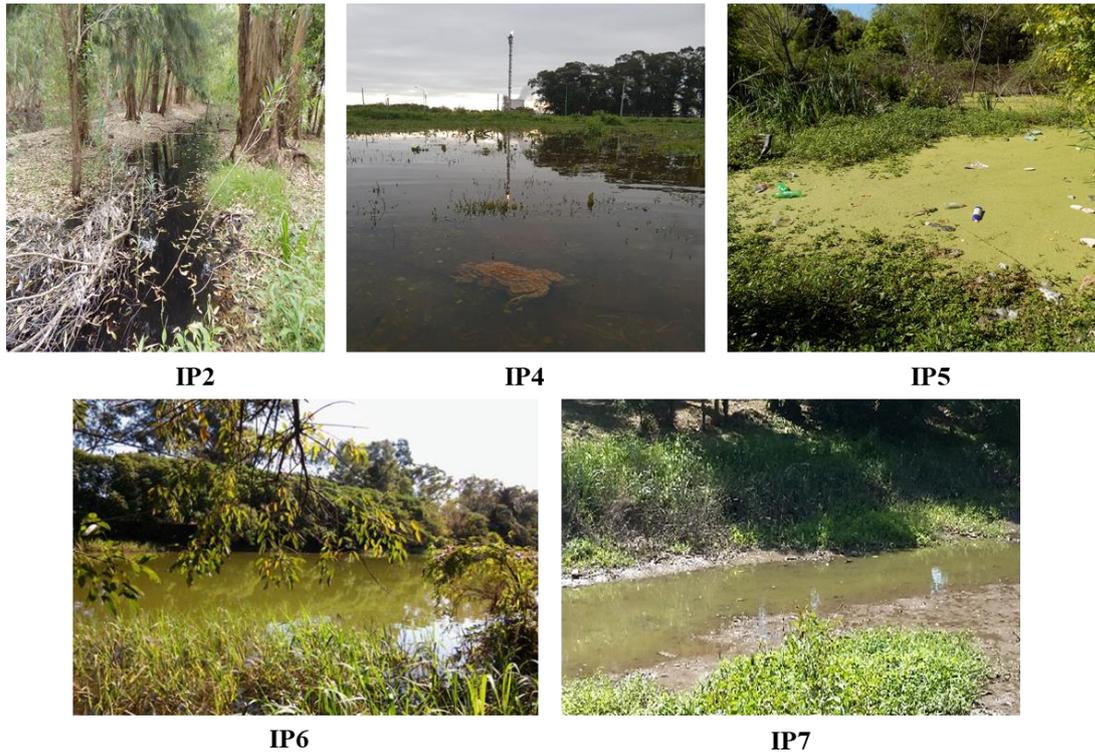


Figura 1.6: Sitios de estudio seleccionados para la problemática petroquímica. IP: industria petroquímica.

Para la problemática de **descargas cloacales** se seleccionaron tres sitios (figura 1.7). El **sitio DC1** se encuentra ubicado en la ciudad de Chascomús. El acceso es sencillo, por calle asfaltada. La zanja de desagüe tiene aproximadamente 200 metros de largo, 2 metros de ancho y 1,5 metros de profundidad, y desemboca en el arroyo Girado, a 200 metros de las compuertas que separan el arroyo de la Laguna de Chascomús. En su cercanía se observan árboles de tala y sauces, y en el borde del arroyo se observan algunas gramíneas y plantas arbustivas. El **sitio DC3** corresponde a una zona de inundación del arroyo Girado, a 300 metros de la zona de descarga, donde se mezcla el contenido del desagüe cloacal, con el agua del arroyo, y predominan las gramíneas. El **sitio DC2** está ubicado en la costa del Río de la Plata, en la desembocadura de las descargas de efluentes cloacales provenientes de las ciudades de La Plata, Berisso y Ensenada. El acceso a este sitio se dificulta en periodos de lluvia y crecidas del Río ya que el último tramo de la calle Avenida Río de la Plata no se encuentra asfaltada y se inunda fácilmente. El caño que desemboca en el Río se encuentra roto hace 40 años formando una charca donde se mezclan los efluentes cloacales y el agua de río, con una superficie aproximada de 20 m² y una profundidad máxima de 40 cm, entre la vegetación costera predominan los juncos.



DC1



DC3



DC2

Figura 1.7: Sitios de estudio seleccionados para la problemática de descargas cloacales. DC: descargas cloacales.

1.2.2 Caracterización fisicoquímica del agua y sedimento

Para la caracterización fisicoquímica del agua, se realizó un muestreo en el que se seleccionaron sitios de cada problemática evaluada que cumplan con los criterios mencionados previamente, y se registraron diferentes parámetros *in-situ*, como la temperatura, conductividad, oxígeno disuelto y pH utilizando multiparamétrico modelo WA-2017SD. Además, se tomaron muestras de agua por triplicado en botellas de vidrio color caramelo y muestras de 200 gr de sedimento compuestas en bolsas de polipropileno para realizar determinaciones fisicoquímicas en laboratorio, siguiendo los métodos analíticos normalizados, descritos en APHA (1998). Para la matriz agua se determinaron: fósforo total (4500-PC), fósforo reactivo soluble (4500-PC), nitritos (4500-NO2-B), nitrógeno amoniacal (4500-NH3F), nitrógeno total (4500-NB), sólidos totales (2540B ST), sólidos disueltos (2540-C), sólidos suspendidos (2540-D). DQO (EPA, 410.4), dureza (2340-C) y alcalinidad (2320); mientras que para el sedimento se determinó el contenido de materia orgánica (LOI).

1.2.3 Presencia de contaminantes en los sitios de estudio

Para conocer la presencia de contaminantes ambientales como pesticidas, metales pesados, hidrocarburos y/o contaminantes emergentes en los sitios de estudio, se realizó una búsqueda bibliográfica y se confeccionó una base de datos.

1.2.4 Relevamiento de anfibios

Se realizaron un total de 30 salidas diurnas y nocturnas a los sitios de estudio durante el periodo de agosto-abril en los años 2016-2019 con mayor frecuencia en los meses de primavera (septiembre-diciembre) para constatar la presencia de las diferentes especies de anfibios. Para la identificación de especies presentes se utilizaron dos métodos: encuentros visuales (Crump y Scott, 1994), identificando las especies según sus características morfológicas (Cei, 1980) y el método auditivo (Zimmerman, 1994), mediante la audición de las vocalizaciones de anfibios (Heyer y col., 2004). El tiempo de duración de los relevamientos fue de 1-2 horas para todos los sitios de estudio. En estas salidas, se colectaron individuos adultos de *R. arenarum* y *L. luctator* (ver capítulos 3 y 4).

1.2.5 Análisis estadísticos

Los datos de los parámetros fisicoquímicos medidos en el punto 1.2.2 fueron analizados mediante estadística descriptiva (media y desvío estándar). Además, se realizaron tests Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de los datos y tests de Barlett para comprobar la homogeneidad de varianza. En los casos que se cumplieron estos supuestos, los datos fueron analizados mediante tests de ANOVA, y en caso de no cumplirse los supuestos, mediante tests no paramétricos Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$). Posteriormente se realizó un análisis de componentes principales para describir las relaciones del conjunto de parámetros analizados.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Caracterización fisicoquímica del agua y sedimento

En la tabla 1.2, se muestra la media \pm desvío estándar de los parámetros fisicoquímicos determinados en agua y sedimento de los sitios pertenecientes a las diferentes problemáticas evaluadas.

Tabla 1.2: Media y desvío estándar de los parámetros fisicoquímicos evaluados en agua y sedimento.

	Referencia			Descargas cloacales		Industria petroquímica			Florihorticultura	
	SR4	SR5	SR0	DC2	DC1	IP6	IP7	IP2	CFH2	CFH1
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
Temp	23,75 ± 0,63	16,56 ± 0,51	17,3 ± 0	24,7 ± 0,19	23,53 ± 0,05	25,8 ± 0,09	26,03 ± 0,15	25,43 ± 0,05	21,9 ± 0,09	24,8 ± 0,17
pH	7,89 ± 0,02	6,12 ± 0,014	6,07 ± 0,01	7,03 ± 0,02	7,54 ± 0,009	7,12 ± 0,009	7,9 ± 0,01	6,59 ± 0,03	7,56 ± 0,15	6,75 ± 0,01
Cond	0,626 ± 0,01	0,143 ±	0,137 ±	1,297 ± 0,021	0,291 ± 0,001	1,081 ± 0,001	0,618 ± 0,006	0,381 ± 0,001	0,274 ±	0,209 ± 0,001
OD	6,93 ± 0,15	1,8 ± 0,1	0,9 ±	0,66 ± 0,05	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,2	8,7 ± 0,1	1,1 ±	7,56 ± 0,15	5,4 ± 0,17
Dureza	55,12 ± 4,24	55,12 ± 5,99	104,58 ± 2,44	233,2 ± 0	308,1 ± 2,44	114,48 ± 5,99	148,4 ±	21,2 ±	67,84 ±	67,84 ± 4,24
Alcalin.	130,66 ± 11,31	98, ±	104,53 ± 11,31	307,06 ± 11,31	816,66 ± 11,31	176,4 ±	490,0 ±	313,6 ±	156,8 ±	147,0 ± 13,85
NH4+		0,094 ± 0,004	0,01 ±	5,43 ± 0,106	2,57 ± 0,307	0,04 ±	1,44 ± 0,29	0,035 ± 0,007	0,047 ± 0,017	0,026 ± 0,003
NO2-	0,014 ± 0,0004	0,04 ± 0,0009	0,01 ± 0,0008	0,0268 ± 0,0004	1,86 ±	0,0816 ± 0,0005	0,022 ± 0,002		0,005 ± 0,0004	0,016 ±
NTf	1,45 ± 0,03	2,28 ± 0,11	1,69 ± 0,11	1,19 ± 0,19	7,94 ± 0,18	1,07 ± 0,02	1,47 ± 0,08	1,31 ± 0,13	1,31 ± 0,09	1,81 ± 0,11
NT	1,49 ± 0,21	2,19 ± 0,16	2,12 ± 0,23	30,07 ± 4,05	26,31 ± 1,05	1,42 ± 0,10	2,76 ± 0,31	1,54 ± 0,06	1,11 ± 0,02	2,16 ± 0,24
DQO	96,69 ± 1,75	70,52 ± 1,07	80,13 ± 4,02	53,42 ± 7,29	75,94 ± 10,28	17,48 ± 0,98	45,45 ± 4,58	73,65 ± 7,54	52,71 ± 3,42	56,06 ± 1,91
ST	563,33 ± 17,47	169,0 ± 6,08	222,33 ± 6,65	746,0 ± 4,24	2018,33 ± 1,15	674,33 ± 7,09	402,33 ± 7,76	335,66 ± 23,6	308,66 ± 9,01	330,33 ± 12,09
SS	253,66 ± 1,96	4,5 ± 0,70	25,0 ± 7,21	10,5 ± 6,36	28,5 ± 2,19	3,5 ± 0,70	16,33 ± 0,57	80,33 ± 4,93	44,33 ± 3,78	71,0 ± 1,21
SD	309,66 ± 10,78	163,66 ± 6,11	197,33 ± 8,96	737,0 ± 4,24	1996,66 ± 18,82	667,66 ± 3,21	386,0 ± 8,18	267,5 ± 13,43	264,33 ± 12,34	259,33 ± 23,58
LOI	2,65 ± 0,21	9,25 ± 0,54	11,07 ± 1,99	3,76 ± 1,66	23,97 ± 0,16			9,95 ± 0,71	4,32 ± 0,57	4,44 ± 0,80
FRS	0,074 ± 0,004	0,260 ± 0,025	0,664 ± 0,016	1,63 ± 0,29	2,65 ± 0,067	0,053 ± 0,000	0,305 ± 0,040	0,732 ± 0,053	1,952 ± 0,106	1,925 ± 0,873
FT	0,57 ± 0,04	0,87 ± 0,06	1,14 ± 0,14	1,77 ± 0,05	4,38 ± 0,03	0,63 ± 0,1	0,99 ± 0,1	1,49 ± 0,19	1,87 ± 0,15	2,48 ± 0,59

*La Temperatura (Temp.) fue expresada en °C; la Conductividad (Cond) en μ Simens/m; el Oxígeno disuelto (OD) en mg/l; la dureza y la alcalinidad (Alcalin) en mg CaCO₃/l; NH₄⁺ (amoníaco), NO₂⁻ (nitrito), NTf (nitrógeno total filtrado) y NT (nitrógeno total) en mg/l; DQO (demanda química de oxígeno) en mg O₂/l; ST (sólidos totales), SS (sólidos en suspensión) y SD (sólidos disueltos) en mg/l; el LOI (peso seco) como % de pérdida de peso en ignición; y el FRS (fósforo reactivo soluble) y FT (fósforo total) en mg/l.

Las temperaturas registradas estuvieron en un rango entre 16 y 26°C. A partir de los análisis realizados se detectaron diferencias significativas ($H(9) = 27,51$; $p < 0,01$) entre los sitios SR0 y SR5 y los sitios IP6 y IP7, presentando estos últimos una mayor temperatura. Los valores de pH estuvieron en un rango entre 6 y 7,9. Los análisis realizados mostraron valores significativamente mayores en el sitio IP7 con respecto al sitio SR0 ($H(9) = 26,38$; $p < 0,01$). Los valores de conductividad se encontraron entre 0,137 y 1,297 mS/m. El sitio DC2 presentó valores significativamente mayores que los sitios SR0 y SR5 ($H(9) = 27,67$; $p < 0,01$). Los valores de oxígeno disuelto se registraron en un rango entre 0,6 y 8,7 mg/L, siendo el sitio DC2 el que presentó valores significativamente menores ($H(9) = 26,03$; $p < 0,01$).

Por otro lado, la dureza y alcalinidad se registraron en un rango de 21,2-308,1 y 98-490 mg CaCO₃/L, respectivamente, presentando el sitio DC1 los mayores valores de estos parámetros ($H(9) = 23,61$; $p < 0,01$ para dureza y $H(9) = 23,57$; $p < 0,01$ para alcalinidad).

En cuanto a NH₄⁺, se registró en un rango de concentración entre 0 y 5,43, siendo el sitio DC2 el que presentó valores significativamente mayores ($H(9) = 21,6$; $p < 0,01$). El NO₂⁻ se registró en un rango entre 0 y 1,86, siendo el sitio DC1 el que presentó los valores más elevados de este parámetro ($H(9) = 27,78$; $p < 0,01$). En cuanto a los parámetros NTf y NT, estos se registraron en un rango de 1,77-11,9 y 1,11-30,07, respectivamente, presentando los sitios DC1 y DC2 los mayores valores de estos parámetros ($H(9) = 26,73$; $p < 0,01$ para NTf y $H(9) = 20,37$; $p < 0,01$ para NT).

La DQO se registró entre 17,48 y 96,69 mg O₂/L, siendo significativamente mayor en el sitio SR4 respecto a todos los sitios ($F(9) = 33,42$; $p < 0,001$). Los sitios IP6 y IP7 fueron los que presentaron los menores valores de este parámetro.

Con respecto a ST y SD estos se registraron en un rango de 169-2018,3 y 3,5-253,66 mg/L, respectivamente, siendo el sitio DC1 el que presentó los valores más elevados de estos parámetros ($H(9) = 27,45$; $p < 0,01$ para ST y $H(9) = 26,21$; $p < 0,01$ para SD).

Los parámetros FRS y FT, presentaron valores entre 0,05-2,65 y 0,63-4,38, respectivamente, siendo los sitios CFH1, DC1 y DC2 los que presentaron los mayores valores ($H(9) = 27,42$; $p < 0,01$ para FRS y $H(9) = 28,13$; $p < 0,01$ para FT).

En la figura 1.8, se muestra el análisis de componentes principales realizado para evaluar el comportamiento del conjunto de los parámetros estudiados, y conocer la relación entre los mismos. El factor 1 explicó un 48,21% y el factor 2 un 16,17% de la

variabilidad total de los datos. En el biplot se distinguió la siguiente separación de los sitios: en el cuadrante superior derecho, los sitios SR0 y SR5 correspondientes a sitios de referencias, relacionados con valores más altos de DQO; en el cuadrante superior izquierdo e inferior izquierdo, los sitios DC1 y DC2, respectivamente, asociados con valores elevados de la mayoría de los parámetros evaluados (conductividad; dureza, alcalinidad, NH_4^+ , NO_2^- , NTf, NT, ST, SD, FRS y FT). En el cuadrante inferior derecho se agrupan los sitios IP6 y IP7 correspondientes a la petroquímica, asociado a valores elevados de conductividad y pH. En el medio del gráfico se encuentran los sitios CFH1 y CFH2 correspondientes a la problemática florihortícola y el sitio IP2 correspondiente a la problemática petroquímica.

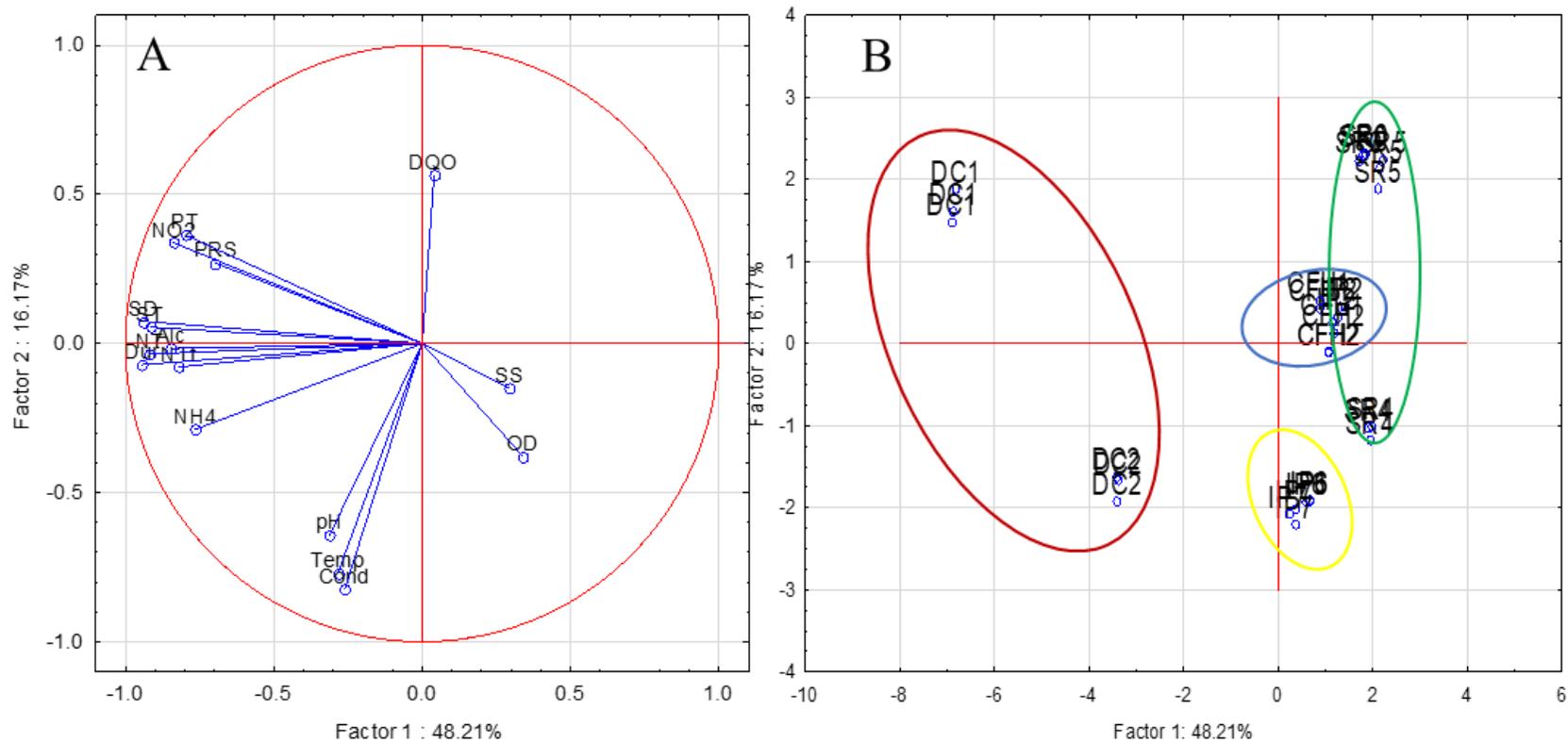


Figura 1.8: Análisis de componentes principales (ACP) para los parámetros fisicoquímicos de los sitios de estudio. A-Proyección de las variables en el plano según los factores 1 y 2. B- Proyección de los sitios en el plano según lo factores 1 y 2. Abreviaturas: Temperatura (Temp), Conductividad (Cond), Oxígeno disuelto (OD), Demanda bioquímica de oxígeno (DQO) Solidos totales (ST), Sólidos en suspensión (SS) y Solidos disueltos (SD), nitritos (NO₂-), Amonio (NH₄+), Nitrógeno total (NT), Nitrógeno total filtrado (NTf), PT (fósforo total), PRS (fósforo reactivo soluble). Sitios de Referencia (SR0, SR4, SR5), Florihorticultura (CFH1, CFH2), Industria petroquímica (IP2, IP6, IP7) y Descargas cloacales (DC1, DC2).

1.3.2 Presencia de contaminantes en los sitios de estudio

Luego de una rigurosa búsqueda bibliográfica sobre la presencia de contaminantes en los sitios de estudio, se armó la tabla 1.3, en la que se presentan las concentraciones de los diferentes contaminantes medidas por diversos autores.

Tabla 1.3: Concentraciones de contaminantes detectados en las zonas de estudio.

Sitios de referencia													
	Fe (mg/L)	Mn (mg/L)	Cd (mg/L)	Cr (mg/L)	Cu (mg/L)	Pb (mg/L)	Zn (mg/L)	Cu (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)			
Camilion y col., 2003 (S)								16.4	20	36			
Natale 2006	0.89	0.6	<0.02	<0.01	<0.01	<0.02	0.15						
Natale 2006	2.47	0.32	<0.02	<0.01	<0.01	<0.02	0.1						
Ronco y col., 2001				17.5									

Cinturón frutihortícola														
	Cu (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)	cr (mg/kg)	GLY (ng/g)	AMPA (ng/g)	ATZ (ng/g)	TRF (ng/g)	ACET (ng/g)	CYP (ng/g)	LMD (ng/g)	CLP (ng/g)	END (ng/g)	EPX (ng/g)
Agostini y col., 2013 (S)										3		5		11
Camilion y col., 2003 (S)	30.4		22.5	49.9										
Hunt y col., 2016 (S)										0.67		2.67		7.71
Mac Loughlin y col., 2017 (S)					404	225	32.7	649.04		14.8	649	2258	14.8	214.3
Ronco y col., 2001 (S)				13.85										
Sansifiena y col., 2018 (S)								55.9	17.7		265	26		16.6

Industria petroquímica																			
	Cu (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)	As (mg/kg)	Hg (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Mn (mg/kg)	V (mg/kg)	HC totales	Fe (mg/kg)	Co (mg/kg)	PCB Lind heptacl	Hepoxidot-clord	DDE	DDT		
Colombo y col., 1990 (A-ng/l)														56.5	16.2		0.8	8.2	
Colombo y col., 1990 (S-ng/g)													90	998	12.2	15.6	18.7	37	91.4
Greenpeace 2000 (S)					4.3	<20	32	51											
Manassero y col., 2013 (S)	32.9	52	142.17																
Palermo y col., 2011 (S)	116	61	610				275	72											
Peluso 2011; Ronco y col., 2008 (S)	55.8	125	387	18.2	6.8	3.2	<2.5	39.7			22.361								
Ronco y col., 2001 (S)							86.2												
Santucci y col., 2017 (S)	88.6		16.1	96.5			70		1273.6	101.4			1104						

Descargas cloacales																										
	PCB	Lind	Heptcl	t-clord	DDE	DDT	cd (ug/L)	zn (ug/L)	zn (ug/g)	pb (ug/L)	pb (ug/g)	Cr (ug/L)	Cr (ug/g)	Fe (mg/L)	E1 (ng/L)	E2 (ng/L)	EE2 (ng/L)	E3 (ng/L)	DHT (ng/L)	T (ng/L)	P (ng/L)	17OHP (ng/L)	Caf (ug/L)	Carba (ug/L)	Ibu (ug/L)	
Colombo y col., 1990 (A-ng/l)	13.8	49.2	2.9																							
Colombo y col., 990 (S-ng/g)	3		0.07	0.2	0.2	1																				
Elorriaga y col., 2013 (A)																							0.1	0.3	4.5	
Elorriaga y col., 2013 (A)																							13.2	<1	<1	
Gonzalez y col., 2020 (A)															85.15	4.72	64.24	348.4	33.32	16.39	12.73	6.85				
Gonzalez y col., 2020 (A)															56.11	7.06	47.55	176.5	16.59	5.61	5.64	5.64				
Valdes y col., 2014 (A)															<LOD	631	65									
Valdes y col., 2014 (A)															<LOD	122	80									
Villar y col., 1998 (A)							<1	63	169	17	44	29	68	2												

(A): medición en agua. (S): medición en sedimento. AMPA: Acido Aminometilfosfonico, ATZ: Atrazina, ACET: Acetaclor, TRF: Trifluralina, CYP: Cipermetrina, LMD: Lambdacialotrina, CLP: Clorpirifos, END: Endosulfan, EPX: Epoxiconazole, HC: hidrocarburos, PCB: biflenilos policlorinados, DDE: diclorodifenildicloroetileno, DDT: diclorodifeniltricloroetano, Lind: lindano, Heptcl: Heptaclor epóxido, t-clord: Trans- Clordan, E1: Estrona, E2: 17β-estradiol, E3: estriol, T: testosterona, DHT: 5α-dihidrotestosterona, P: progesterona, 17OHP: 17-hidroxiprogesterona, CAF: cafeína, CARBA: Carbamazepina, IBU: Ibuprofeno.

En los sitios de referencia se detectaron metales como Fe, Mn, Cr, Cu, Pb, Zn en agua o en sedimento en concentraciones menores a las detectadas en el resto de los sitios (Ronco y col., 2001; Camilión y col., 2003; Natale, 2006), mientras que no se detectaron plaguicidas (Natale, 2006; Peluso, 2011; Agostini y col., 2013). No se encontraron trabajos que evalúen la presencia de fármacos en estos sitios.

Los sitios correspondientes al CFH, presentaron valores de 22,5, 30,4 y 49,9 mg/kg de Pb, Cu y Zn en sedimento, respectivamente (Camilión y col., 2003). Mientras que como era de esperarse, en sedimento se detectaron plaguicidas como glifosato, AMPA, atrazina, trifluralina, acetochlor, cipermetrina, clorpirifós, endosulfán, lamdacialotrina y epoxiconazol en concentraciones que van desde milésimas hasta miles de ng/g (Ronco y col., 2001; Agostini y col. 2013, Hunt y col., 2016; MacLoughlin y col., 2017; Sansiñena y col., 2018).

En cuanto a los sitios correspondientes a la petroquímica, en sedimento se detectaron metales pesados como Arsénico (As), Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Mercurio (Hg), Níquel (Ni), Plomo (Pb), Zinc (Zn) en concentraciones mayores a las registradas en el resto de los sitios y también se detectaron hidrocarburos (Greenpeace 2000; Ronco y col., 2001; Ronco y col., 2008; Palermo y col., 2011; Peluso, 2011; Manassero y col., 2013; Santucci y col., 2017). Además, se detectaron bifenilos policlorados (PCB) y plaguicidas como DDT, lindano, heptacloro tanto en sedimento como en agua (Colombo y col., 1990).

Por último, en los sitios correspondientes a la zona de descargas cloacales se detectaron metales pesados como Zn, Cr, Cu en muestras de sedimento y agua (Villar y col., 1998); PCBs, y plaguicidas como DDT, lindano, heptacloro en sedimento y agua (Colombo y col., 1990); y hormonas estrogénicas: estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3); andrógenos: testosterona (T), 5 α -dihidrotestosterona (DHT); progesteronas: progesterona y 17-hidroxiprogesterona (17OHP); y fármacos: ibuprofeno, carbamazepina y cafeína, en muestras de agua (Elorriaga y col., 2013; Valdés y col., 2014; Gonzalez y col., 2020).

1.3.3 Relevamiento de anfibios

En la tabla 1.4, se muestra los resultados del relevamiento de anfibiofauna en los sitios de estudio. En total se registraron 13 especies. El sitio SR5 presentó la mayor riqueza específica, con un total de 13 especies presentes. En cuanto a los sitios de la problemática agrícola, en el sitio CFH1 se identificaron nueve especies, siendo este el

segundo sitio de estudio con mayor riqueza específica junto con el sitio SR1. De la problemática petroquímica, el sitio IP5 presentó una mayor riqueza específica con ocho especies de anuros, seguido por el sitio IP2, con seis especies. En cuanto a la problemática de descargas cloacales, en el sitio DC2 se identificaron siete especies, mientras que en el sitio DC1 se registraron cinco especies.

Tabla 1.4: Especies de anuros registradas en los sitios de estudio.

Especies	SR0	SR1	SR3	SR4	SR5	CFH1	CFH2	IP1	IP2	IP3	IP4	IP5	DC1	DC2
<i>B. pulchella</i>	X	X	X	X	X	X	X		X			X	X	X
<i>Dendrosophus sp</i>	X	X	X		X	X			X			X		X
<i>S. squalirostris</i>	X	X	X	X	X	X								
<i>S. granulatus</i>	X	X	X		X	X								X
<i>P. minuta</i>				X	X				X			X	X	
<i>O. americanus</i>					X							X		
<i>C. ornata</i>					X									
<i>L. luctator</i>	X	X	X	X	X	X		X	X			X	X	X
<i>L. latinasus</i>		X		X	X	X		X	X			X		X
<i>L.s gracilis</i>					X									
<i>P. falcipes</i>		X	X	X	X	X		X	X	X	X			X
<i>R. arenarum</i>	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X
<i>R. fernandezae</i>	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	

SR0, SR1, SR3, SR4 y SR5: sitios de referencia. CFH1 y CFH2: cinturón florihortícola. IP1, IP2, IP3, IP4 e IP5: industria petroquímica. DC1 y DC2: descargas cloacales

A partir de la información obtenida podemos decir que, de modo general, los sitios de referencia fueron los que presentaron mayor cantidad de especies de anuros, seguidos por los sitios correspondientes a la problemática agrícola, petroquímica y por último los sitios de las descargas cloacales.

En cuanto a las especies de anfibios identificadas, *R. arenarum* se encontró en 12 sitios de estudio, menos en 2 correspondientes a la petroquímica (sitio IP1 y IP2), y fue la especie que se encontró en la mayor cantidad de sitios de estudio; mientras que *L. luctator* fue registrada en 11 sitios, siendo junto con *B. pulchella*, y *R. fernandezae*, las especies más registradas luego de *R. arenarum*, seguidas de *P. falcipes* (10 sitios), *Dendrosophus sp* (8 sitios), *L. latinasus* (8 sitios), *S. squalirostris* y *S. granulatus* (6 sitios), *P. minuta* (5 sitios), *O. americanus* (2 sitios) y *L. gracilis* y *C. ornata* (1 sitio).

1.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En todo el mundo, la contaminación es crítica en las zonas donde se asienta la mayor densidad de población. Los ríos, arroyos y otros cuerpos de agua reciben gran cantidad de desechos provenientes de diferentes actividades la mayoría de las veces sin previo tratamiento, incrementando los niveles de contaminación de manera sostenida en el tiempo, y alcanzando valores que muchas veces superan los establecidos para los diferentes usos del agua (consumo de agua potable, protección de la biota acuática, recreación) (UN Water, 2016). En Argentina, la ciudad con mayor densidad de población es la ciudad de Buenos Aires, con 2,89 millones de habitantes (INDEC, 2010). La ciudad de La Plata se encuentra a 59 km de dicha ciudad, y cuenta con 702.449 habitantes. Tal como se comentó en la introducción de este capítulo, el cinturón florihortícola platense es el segundo más grande del país y produce alrededor de 78860 toneladas por año (CHFB, 2005); en la ciudad de Ensenada se desarrollan, desde el año 1925, grandes empresas de la industria petroquímica concentradas en el polo petroquímico; y en la costa del Río de La Plata se descargan los desechos cloacales provenientes de las ciudades de La Plata, Berisso y Ensenada. Por otro lado, la zona sur de la ciudad de La Plata, elegida como sitio de referencia, se encuentra alejada de estas actividades, con menor probabilidad de llegada de contaminantes y si bien ya no podemos encontrar sitios blancos en la naturaleza, podemos considerar esta zona como sitios de referencia al encontrarse lejos de las zonas donde se realiza el resto de las actividades antrópicas estudiadas.

Los parámetros fisicoquímicos son utilizados para evaluar y monitorizar la calidad de los cuerpos de agua y son indicadores de la contaminación antrópica (Orozco, 2003), y a partir de su estudio se pueden determinar diferentes usos del agua (consumo de agua potable, protección de la biota acuática, recreación). Los parámetros medidos en la presente tesis se encuentran entre los indicadores fisicoquímicos más utilizados (APHA, 1998; Alberro y col., 2011).

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos medidos *in situ* (pH, conductividad, oxígeno disuelto y temperatura), la temperatura, la conductividad y el oxígeno disuelto son los que presentaron diferencias relevantes para el presente estudio. Todos los sitios correspondientes a las problemáticas estudiadas presentaron valores de temperatura mayores que los sitios de referencia, siendo los sitios de la petroquímica los que presentaron los valores más elevados. Un incremento en la temperatura del agua puede ser indicador del vuelco de efluentes líquidos que cambian las propiedades del agua del cuerpo receptor, aunque hay que tener en cuenta los horarios en los que fueron realizados

los registros para arribar a conclusiones más precisas. La conductividad fue mayor en un sitio de descargas de desechos cloacales y en un sitio de la petroquímica, lo que se puede explicar por la presencia de una gran cantidad de iones disueltos a causa de la contaminación química y una mayor concentración de sólidos disueltos. Los sólidos disueltos reducen la entrada de luz, provocando una disminución en la fotosíntesis por parte de los productores, lo que se ve reflejado en una menor concentración de OD. Para que el agua sea apta para la vida acuática, el oxígeno disuelto debe presentar valores mayores a 5 mg/L, que corresponde al 50% del valor de saturación de oxígeno en agua (Orozco, 2003). La solubilidad de oxígeno en agua decrece con el aumento de la temperatura. Todas las problemáticas presentaron al menos 1 sitio con valores menores a 5 mg/L, menos la florihorticultura. Con respecto al valor inferior a 5 mg/L registrado en uno de los sitios de referencia, esto puede deberse al alto contenido de materia orgánica presente al momento de realizar la medición, lo que puede evidenciarse también por una alta DQO, que es una medida indirecta para medir la cantidad de materia orgánica total. En el caso de los sitios SR0 y SR5, había un exceso de vegetación en degradación, proceso que consume oxígeno. El intervalo de pH en los cuerpos de agua generalmente es de 6,5-9, y la mayoría tienen ligero carácter básico debido a la presencia de bicarbonatos y carbonatos (APHA, 1998), el intervalo de pH en los sitios evaluados se encontró dentro del intervalo de valores normales para la vida acuática.

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos medidos en laboratorio, los sitios correspondientes a las descargas cloacales presentaron las aguas más duras (>181 mg $\text{CO}_3\text{Ca/L}$, correspondiente a aguas muy duras), mientras que el resto de los sitios registraron valores entre 21 y 120 mg $\text{CO}_3\text{Ca/L}$, correspondientes con aguas blandas a moderadamente duras. La dureza el agua está relacionada con la presencia de iones calcio y magnesio y con factores geológicos (tipo de roca y composición del suelo). Las aguas duras presentan alto contenido de iones calcio y magnesio, asociadas con rocas sedimentarias, mientras que las aguas blandas presentan bajo contenido de estos iones, y están en contacto con rocas impermeables como el granito. Si bien no existe un límite recomendado para la vida acuática, la dureza puede tener influencia en la toxicidad de algunos metales (Cr, Cu, Pb, Ni y Zn) (Markich y col., 2001). La alcalinidad está determinada generalmente por el contenido de carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos y se relaciona con la acción buffer o amortiguadora de cambios de pH al agua. En general, se acepta una alcalinidad mínima de 20 mg de $\text{CaCO}_3\text{/L}$ para mantener la vida acuática (USEPA, 2006), ya que cuando es menor, pierde su capacidad buffer y vuelve las aguas

muy sensibles a la contaminación. En todos los sitios la alcalinidad fue mayor al valor mínimo aceptado para la vida acuática. Los sitios correspondientes a las descargas cloacales presentaron los mayores valores de alcalinidad seguido por los sitios correspondientes a la petroquímica, y esto puede deberse a la mayor presencia de iones y sólidos disueltos.

En cuanto a las concentraciones de NO_2^- , NH_4^+ , NTf y NT , estos presentaron valores de hasta mil veces mayor en los sitios correspondientes a descargas cloacales. Las fuentes de la contaminación nitrogenada de los cuerpos de agua son muy variadas e incluyen los desechos domésticos, industriales y agrícolas. Todas estas formas de nitrógeno son bioquímicamente interconvertibles y son componentes del ciclo del nitrógeno. El nitrógeno orgánico incluye materiales naturales como proteínas y péptidos, ácidos nucleicos y urea, y numerosos materiales orgánicos sintéticos. Las concentraciones de nitrógeno determinadas en la presente tesis coinciden con lo reportado en la bibliografía para aguas residuales sin tratar (más de 20 mg/L) (APHA, 1998). En los cuerpos de agua, el amoníaco se puede oxidar a nitritos y nitratos por la acción natural de microorganismos (autodepuración), pero en general las altas concentraciones de estos compuestos en agua se relacionan con las actividades humanas, y una concentración elevada contribuye a la eutrofización de las aguas (Madigan y col., 2004; Camargo y col., 2005). Además, estos compuestos pueden reaccionar con aminas secundarias para formas nitrosaminas, muchas de las cuales son cancerígenas (APHA, 1998).

En cuanto a las concentraciones de FT y FRS , los sitios correspondientes a las descargas cloacales y el CFH, son los que presentaron los mayores valores. Las principales fuentes de compuestos de fósforo en el agua son las descargas cloacales, el drenaje agrícola o ciertos desechos industriales. El fósforo es esencial para el crecimiento de los organismos, y es el nutriente principal que limita el crecimiento de los productores, por lo que un aumento en su concentración puede estimular el crecimiento de organismos fotosintéticos, provocando la eutrofización del agua (Winkler, 1995; Correll, 1998).

En los sitios de referencia se detectaron metales en agua y sedimento en concentraciones normales y menores al resto de los sitios, mientras que no se detectaron plaguicidas (Ronco y col., 2001; Camilión y col., 2003; Natale, 2006; Peluso, 2011; Agostini y col., 2013). En los sitios correspondientes al CFHP, se detectaron metales en sedimento, y plaguicidas (herbicidas, insecticidas) en altas concentraciones (Ronco y col., 2001; Agostini y col., 2013; Hunt y col., 2016; MacLoughlin y col., 2017; Sansiñena y col., 2018). En cuanto a los sitios correspondientes a la petroquímica, en muestras de

sedimento se detectaron metales pesados e hidrocarburos en altas concentraciones (Greenpeace 2000; Ronco y col., 2001; Ronco y col., 2008; Palermo y col., 2011; Peluso, 2011; Manassero y col., 2013; Santucci y col., 2017); y además se detectaron bifenilos policlorados (PCB) y plaguicidas como DDT, lindano, heptacloro tanto en sedimento como en agua (Colombo y col., 1990). Por último, en los sitios correspondientes a la zona de descargas cloacales se detectaron metales pesados en muestras de sedimento y agua (Villar y col., 1998), PCBs, y plaguicidas en sedimento y agua (Colombo y col., 1990); y hormonas estrogénicas (E1, E2, EE2) y fármacos como ibuprofeno, carbamazepina y cafeína en muestras de agua (Elorriaga y col., 2013; Valdés y col., 2014; Gonzalez y col., 2020).

Los resultados obtenidos a partir de las determinaciones fisicoquímicas sumado a la información provenientes de la literatura consultada, nos permitió caracterizar los sitios de estudio, y a partir de la comparación realizada, asociar a cada uno de ellos con cada problemática estudiada. Es por esto que la zona de estudio y los sitios de estudio escogidos son representativos de las problemáticas estudiadas.

En cuanto al relevamiento de la anfibiafauna, si bien en la presente tesis no se realizaron técnicas de relevamiento para evaluar parámetros ecológicos de comunidades de anfibios de manera rigurosa, ya que este tipo de estudios excedió los tiempos y objetivos de la tesis, se registraron las especies presentes en cada sitio durante los muestreos realizados para la colecta de individuos, a lo cual se sumó la información recolectada por el grupo de trabajo. Es por esto que las conclusiones a las que llegamos las esbozamos como hipótesis o preguntas de investigación para ser abordadas en futuros estudios.

Se constató que uno de los sitios de referencia es el que presentó la mayor riqueza específica, seguido por otro sitio de referencia y uno de los sitios correspondientes al cinturón florihortícola. En términos generales se puede observar que los sitios de referencia registraron la mayor riqueza específica, con más de 8 especies en cada uno (de un total de 13), seguido en orden decreciente por los sitios correspondientes al cinturón florihortícola, la industria petroquímica y las descargas cloacales. Si consideramos que los anfibios son bioindicadores, y que su presencia o ausencia es indicadora de la calidad del ambiente, esto coincide con las características fisicoquímicas de los cuerpos de aguas detalladas anteriormente correspondientes a las problemáticas estudiadas, siendo la

problemática de descargas cloacales la más perjudicial para el desarrollo de la mayoría de los anfibios, seguida por la petroquímica, y el cinturón florihortícola. Esto podría indicar que la presencia de diversos contaminantes podría estar afectando a las poblaciones locales de anuros. Si bien esta información resulta de gran relevancia ecológica, se recomienda realizar monitoreos de las poblaciones de anfibios más detallados, en busca de información ecológica de cada especie en cada sitio para arribar a una conclusión más clarificadora.

Las dos especies que se encontraron en solo un sitio fueron *C. ornata* y *L. gracilis*, y coincide con un sitio de referencia. *O. americanus* fue registrada en un sitio de referencia y en uno correspondiente a la problemática petroquímica. **El orden creciente teniendo en cuenta la cantidad de sitios en los que se hallaron las especies de anfibios es el siguiente: *C. ornata*, *L. gracilis*, *O. americanus*, *P. minuta*, *S. squalirostris*, *S. granulatus*, *L. latinasus*, *Dendrosophus sp*, *P. falcipes*, *R. fernandezae*, *B. pulchella*, *L. luctator* y *R. arenarum*.** Si comparamos estos resultados con la información provenientes desde la ecotoxicología sobre su sensibilidad, y desde la herpetología sobre su biología y ecología (Natale, 2006), podríamos considerar a estas especies como **candidatos para emplear como indicadores de la calidad ambiental**. Desde la biología, podemos decir que las poblaciones de estas especies no son naturalmente abundantes, presentan distribuciones puntuales, relacionadas con características de la matriz ambiental, y su reproducción relacionada con fenómenos específicos (por ejemplo, lluvias torrenciales y tormentas para *C. ornata*), mientras que desde la ecotoxicología podemos decir que estas especies presentan una mayor sensibilidad (Natale, 2006).

La presencia en la mayoría de los sitios, sumado a sus características morfológicas, nos permitió corroborar la elección de *R. arenarum* y *L. luctator* como objeto de estudio. En cuanto a estas, *R. arenarum* se encontró en la mayor cantidad de sitios (12 de los 14 seleccionados), posiblemente en relación con el hábito de *R. arenarum* y a que es considerada una de las especies de la zona más tolerante, y ocupa una gran variedad de ambientes (Cei, 1980). En cuanto a *L. luctator*, se la encontró en 11 sitios al igual que *B. pulchella*, pero el motivo de la elección de la primera fue el gran tamaño que posee, lo que, como en *R. arenarum*, facilita la toma de la cantidad de muestras biológicas necesarias para llevar a cabo la presente tesis.

CAPITULO 2: OBTENCIÓN DE INTERVALOS DE REFERENCIA DE PARÁMETROS CLÍNICOS PARA *L. lutator* y *R. arenarum*

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Estudios integrales

Desde la **Ecotoxicología**, la evaluación de los efectos que los factores estresantes provocan sobre los ecosistemas y sus componentes mediante el uso de una batería de biomarcadores a diferentes niveles (nivel genético, molecular, bioquímico, celular, tisular, organismo), resulta una herramienta muy útil (Newman y Clements, 2008). Es a partir del estudio de los niveles subindividuales que se puede desarrollar una base de comprensión de cómo los diferentes estresores ambientales pueden modular la función del organismo, producir patologías y provocar efectos en la salud animal, actuando de este modo como “biomarcadores de alerta temprana” (Moore y col., 1994; Moore y col., 2004; Newman, 2014). Además, existen evidencias que vinculan efectos a diferentes niveles (Medina y col., 2016; Jayawardena y col., 2017), por lo que, detectar relaciones entre los biomarcadores a partir de un estudio integral, teniendo en cuenta que los niveles de estudio son interdependientes, nos permitirá descubrir y dar explicaciones relevantes sobre las relaciones que existen entre éstos, y contextualizar y mejorar la interpretación de la información obtenida del estudio de un conjunto de biomarcadores para evaluar y realizar inferencias más confiables sobre el impacto que producen los factores estresantes sobre los ecosistemas y sus componentes (Forbes y col., 2006; Newman y Clements 2008; Triquet y col., 2013).

Dentro de la **medicina veterinaria**, la patología clínica veterinaria es una especialidad que se centra en el estudio del estado de salud de los animales a partir de estudios integrales realizados a diferentes niveles mediante el examen de sangre (parámetros sanguíneos), suero o plasma (parámetros plasmáticos), orina, fluidos corporales y tejidos (parámetros histológicos). Esta disciplina cubre una amplia gama de ensayos y métodos de laboratorio y resulta útil para el diagnóstico, y la prevención de enfermedades (Heatley, 2020) tanto en mascotas como en animales silvestres, aunque los

estudios en estos últimos son escasos y la literatura existente se encuentra dispersa entre diversas disciplinas (Heatley, 2020).

Por lo antes dicho queda claro que, tanto desde la Ecotoxicología como de la Medicina clínica, se propone la realización de estudios integrales utilizando biomarcadores de diferentes niveles para evaluar su objeto de estudio, ya que estos son interdependientes, y su estudio integral permite una mayor comprensión de los resultados (Triquet y col., 2013). Hace varios años que se proponen diferentes herramientas para la evaluación integral de los datos obtenidos para evaluar los biomarcadores a diferentes niveles, entre los que se encuentran los análisis de componentes principales (Sinha y col., 2009), respuesta de biomarcadores integrados (IBR) (Beliaeff y Burgeot, 2002) y el sistema experto (Dagnino y col., 2007). Sin embargo, al considerar los estudios que utilizan a los anfibios como bioindicadores, al momento de comenzar la presente tesis (año 2016), la mayoría de los estudios realizados evaluaban efectos en diferentes niveles de manera aislada, y no existían estudios que integraran la información en un contexto más amplio (Brodeur y col., 2011; Lascano y col., 2011; Shutler y Marcogliese, 2011; Zhelev y col., 2013; Attademo y col., 2014). Si bien el estudio de los biomarcadores a nivel subindividuo resulta útil como biomarcador de efecto o de exposición a cierto factor estresante, es probable que la evaluación de estos biomarcadores de forma independiente no proporcione información representativa que permita inferir de manera precisa sobre el estado general de los individuos (Forbes y col., 2006), por lo que realizar un estudio a través de un enfoque integrador, resulta una herramienta adecuada al momento de evaluar el estado de salud de los individuos ya que involucra diferentes niveles relacionados entre sí y además permite contextualizar e interpretar los resultados en un marco teórico más amplio (Triquet y col., 2013).

2.1.2 Concepto de estado de salud

Según la Organización Mundial de la Salud, la salud es “un estado de completo bienestar físico, mental y social, que no solo considera la ausencia de afecciones o enfermedades” (OMS, 1948). Esta definición no es transferible a los animales ya que no es posible definir criterios objetivos para caracterizar el bienestar. Si se toma la definición de salud otorgada por la OMS para seleccionar individuos sanos para establecer los valores de referencia, la mayoría de los individuos (según esta definición) pueden ser considerados como no saludables, por lo que este enfoque para diagnosticar la salud es casi imposible ya que no existe la salud absoluta (Gräsbeck, 2004). La salud es un

concepto relativo, un individuo puede estar enfermo desde un punto de vista, pero sano desde otro. Al evaluar solamente un órgano no podemos decir “el individuo X está sano”, sino que decimos “el órgano X funciona bien” (puede realizar sus funciones correctamente). Es por esto que para abarcar el estudio del estado de salud de los individuos es importante adoptar una visión holística, ya que la salud es un atributo que se aplica principalmente a los individuos como sistemas integrados y complejos.

2.1.3 Intervalos de referencia

Importancia y utilidad de los intervalos de referencia

Un intervalo de referencia representa un cálculo estadístico de un grupo de datos obtenidos de una población definida de individuos (Horowitz, 2008). Los intervalos de referencia describen las fluctuaciones observadas en poblaciones o individuos sanos y están diseñados para usarse como pautas de interpretación y para determinar si un valor es normal o anormal para cierto parámetro por lo que constituyen una herramienta importante en la interpretación de los resultados (Gräsbeck, 2004).

El concepto de “valores de referencia” fue introducido por Gräsbeck y Saris (1969) para describir la variación en las concentraciones de analitos en sangre en grupos bien caracterizados de individuos sanos, y constituyen una de las herramientas de laboratorio más utilizadas para evaluar procesos clínicos (Horn y Pesce, 2005). El término adecuado para referirse es “intervalo de referencia” (IR) y no “rango de referencia”, y si bien es un método aceptado mundialmente, aún sigue en discusión el método óptimo para su obtención. El estándar para la producción de IR basado en la población humana, cuyas recomendaciones están resumidas por Solberg y Gräsbeck (1989) fue realizado por la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) en 1970, y consta de seis partes. Desde entonces, se ha discutido y propuesto nuevos métodos para su cálculo (métodos estadísticos alternativos para identificar valores atípicos, particionar los valores según diferentes clasificaciones de los grupos, etc), hasta que, en el año 2008, se publicó una revisión de la generación de IR, que incluye recomendaciones para la transferencia y validación de IR de otras fuentes y promueve también métodos sólidos para determinar el IR a partir de muestras pequeñas (Horowitz, 2008).

En lo que respecta a especies animales, el concepto de IR comenzó a aplicarse en 1978 (Lumsden 1978). El Comité Quality Assurance and Laboratory Standards (QALS) de la American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) formó un subcomité

para generar una guía de pautas para la determinación de intervalos de referencia en especies veterinarias y para abordar temas de interés adicionales, con el objetivo de desarrollar recomendaciones que sean estadística y clínicamente válidas (Horowitz 2008; Geffre 2009). Entre los temas de interés se encuentran la determinación de IR de novo para nuevos parámetros, métodos o nuevas poblaciones de animales. Debido a que las IR son específicas para un conjunto particular de condiciones, el documento también analiza el uso indebido de las IR publicadas cuando no se describen las poblaciones de referencia, el analizador y la metodología y otros factores pertinentes.

¿Cómo obtener un intervalo de referencia?

A continuación, se destacan los aspectos más relevantes considerados para la presente tesis del documento generado por el Comité de Quality Assurance and Laboratory Standards (QALS) de la American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP), en el cual se describen los pasos a seguir para obtener intervalos de referencia para los parámetros:

La información mínima que debe proporcionarse para todos los valores de referencia incluye el grupo de la población de referencia (especie, edad, sexo), los criterios de exclusión para los individuos de referencia, el método por el cual se recolectaron las muestras, y el análisis y métodos estadísticos utilizados para generar los valores de referencia (Walton, 2001).

En principio, se recomienda realizar una investigación preliminar sobre las fuentes de variabilidad biológica e interferencia que afecten a la medición de los parámetros a evaluar, para determinar las especificaciones para la recolección y manipulación de muestras y para la selección de individuos de referencia y procedimientos de medición. Esta información también puede usarse para establecer criterios de inclusión y exclusión. Entre los criterios de selección de la población de referencia se incluyen: biológico (edad, sexo, especie, etapa del ciclo reproductivo); clínico (historia y examen físico); características geográficas (ubicación) y estacionales (efectos de la temperatura y fotoperiodo) (Walton 2001). Por otro lado, entre los criterios de exclusión, se incluyen: biológico (estado de ayuno o no ayuno, nivel de estrés o excitación); fisiológicos (enfermedad, reproducción, otros). (Poole 1997). En caso de ser necesario, se puede dividir la población de referencia en subgrupo (edad, sexo o estado reproductivo) (Walton 2001).

En general, se recomiendan muestras de al menos 120 individuos para establecer un intervalo de referencia (CLSI and IFCC, 2008). Sin embargo, esto suele ser difícil en medicina veterinaria debido a la falta de disponibilidad de individuos requeridos y al costo de la obtención y el análisis de muestras, por lo que algunos autores sugieren que un número más realista es de al menos 40 individuos (Kaneko y col., 1997). Por otro lado, cuando se trata de evaluar animales silvestres, con los cuales el contacto es limitado, obtener la muestra adecuada y establecer el intervalo de referencia puede ser un desafío (ver más adelante). Es por esto que, por más que los intervalos de referencia con menos de 10 individuos no deben informarse porque es poco probable que tamaños de muestra tan pequeños sean representativos de la distribución de una variable dentro de una población, resultan ser información valiosa como punto de partida para el estudio del estado de salud de especies de animales silvestres (Heatley, 2020).

Una vez obtenidos los datos, se procede a realizar el tratamiento de los datos y el posterior análisis estadístico. Parte del tratamiento de datos incluye identificar los valores atípicos causados por diferentes tipos de errores, para que estos no afecten los límites de referencia. Entre los errores frecuentemente cometidos se encuentran: errores de transcripción, inclusión de muestras inapropiadas o de mala calidad (muestra incorrecta, hemólisis, lipemia), inclusión de individuos de referencia inapropiados (animales que posteriormente se demostró que no eran saludables). Además, se debe reducir la variación que no se deba a la variabilidad inter o intraindividual (cambio de lotes de reactivos, personal técnico). Para la realización del análisis estadístico, debe seleccionarse el método estadístico apropiado basado en el número y la distribución de los valores de referencia. Primero se calcula los parámetros estadísticos media y desvío estándar, y para calcular el intervalo de referencia, hay que considerar si los datos presentan distribución gaussiana o no. En caso de presentar distribución gaussiana, se calcula el intervalo de referencia como $\text{media} \pm (x) \text{ desvío estándar}$. El múltiplo del desvío estándar está determinado por el grado de certeza que se le quiere dar al intervalo, siendo la opción más común el múltiplo 2, lo que corresponde al 95% de la población. Por lo tanto, cualquier animal que presente un valor de cierto parámetro dentro del 95% será considerado normal para ese parámetro. Por otro lado, para los parámetros cuya distribución no es gaussiana, se propone el uso de transformaciones (logarítmica o raíz cuadrada de los valores del parámetro para que la distribución quede normal) o el uso de percentiles como límites, generalmente el 2,5 para límite inferior y percentil 97,5 para límite superior (Horn y Pesce 2003). Por lo tanto, los animales se clasificarían como anormales cuando tuvieran valores

por debajo del 2.5% o por encima del 97,5% de los valores normales para cierto parámetro.

Intervalos de referencia en especies silvestres

Como ya se mencionó, en la medicina de animales silvestres, la generación del intervalo de referencia apropiados para la especie, sexo, y edad implica un gran desafío (Walson, 2001), por un lado debido a la dificultad de obtener un número y cantidad suficiente de muestra, por cuestiones como acceso al lugar donde habitan los individuos, condiciones de cría *ex-situ*, tamaño de las poblaciones, categoría de la lista roja de IUCN, tamaño de los individuos y, por otro lado, debido la dificultad en la interpretación de los resultados de las pruebas, ya que la fisiología y anatomía que presentan los diferentes grupos de animales es muy variada, y el conocimiento en estos campos es escaso para muchas de las especies silvestres por lo que establecer si un animal se encuentra afectado o no es una tarea difícil. Además, existen regulaciones tanto como para la colecta (Dirección de Flora y Fauna) como para el uso en laboratorio (Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio-CICUAL) de animales silvestres, lo que limita el número de individuos a utilizar. Sumado a esto, la obtención de muestras para la medición de algunos parámetros requiere de técnicas cruentas y esto también está fuertemente regulado por organismos como CICUAL, que presentan condiciones estrictas para la utilización de individuos en investigaciones que requieren de su sacrificio (y más aún cuando se trata de especies que están en categorías vulnerable o en peligro de extinción en la lista roja de IUCN). Todas estas restricciones en la toma de muestra traen como consecuencia que con el fin de que el número de individuos utilizados para el cálculo del IR sea mayor, se tome un único intervalo de referencia para todos los individuos de una misma especie (Thrall y col., 2012). Por otro lado, muchos laboratorios clínicos o de diagnóstico no tienen sus propios valores de referencia para la mayoría de las especies, y generan intervalos de referencia a partir de datos obtenidos de la literatura o de otras instalaciones de diagnóstico. En la literatura, muchos de los intervalos de referencia publicados se derivan de menos de 40 individuos, e incluso menos de 20 individuos, aunque se corre el riesgo de una mala interpretación clínica de los valores del individuo. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, esta información, si bien no cumplen con los criterios para ser consideradas intervalos de referencia ya que pueden llevar a una interpretación errónea de los datos obtenidos, pueden servir como un punto

de partida para la evaluación del estado de salud de los individuos silvestres, y están destinados a representar los mejores datos existentes disponibles (Heatley, 2020).

Por lo antes dicho, queda claro que obtener muestras para generar un intervalo de referencia para uno o más parámetros es una tarea difícil cuando se trata de animales silvestres. Aunque en los últimos años desde la medicina veterinaria se está trabajando mucho en este tema, y ya se han publicado diversos manuales de protocolos para obtención y análisis de muestras obtenidas a partir de animales silvestres (aves, reptiles e incluso anfibios) (Coppo y col., 2005; Thrall y col., 2012; Campbell y col., 2015; Heatley y col., 2020), la dificultad radica en abarcar todas las especies de animales, ya que en general estos intervalos están generados en especies de zoológicos, o en especies de animales utilizadas para experimentos, o para mascotismo. Particularmente en anuros, el número de publicaciones asociadas a este tipo de estudio son mínimas y en general están asociadas a especies del hemisferio norte (Wilson y col., 2011; Forzán y col., 2016), y cuando se quiere realizar un estudio de anuros autóctonos, que son lo que se proponen para usarlos como bioindicadores de problemáticas ambientales locales, el problema es más evidente ya que los estudios en los que presentan intervalos de referencia correctamente calculados para especies autóctonas son muy escasos o nulos.

Por lo tanto, obtener los valores de referencia para un gran número de parámetros generalmente utilizados para la evaluación del estado de salud de los individuos de especies autóctonas resulta de gran importancia al momento de evaluar los efectos que los factores estresantes causan sobre las poblaciones, ya que estos son los que nos brindan información precisa sobre si los individuos presentan cierto parámetro afectado o no. Además, abordar estos estudios a partir de un estudio integral de estos parámetros resulta de gran importancia, ya que la salud es un atributo que se aplica a los individuos como conjuntos integrados, y no existe información clara al respecto.

Es por eso que, identificando esta necesidad, el presente capítulo está dirigido a realizar análisis de la variabilidad de los datos de los parámetros medidos en anuros considerando los siguientes agrupamientos: 1-todos los datos (bibliografía, base de datos del grupo de trabajo y datos de la tesis), 2- datos provenientes de la bibliografía (datos de la bibliografía y los datos obtenidos de la base de datos del grupo de trabajo), 3- datos de individuos de *L. luctator* de la tesis, 4-datos de individuos de *L. luctator* provenientes de los sitios de referencia, 5- datos de individuos de *R. arenarum* de la tesis, y 6- datos de individuos de *R. arenarum* provenientes de los sitios de referencia, con el fin de aportar elementos en la toma de decisiones en la construcción de los intervalos de referencia. Los

intervalos de referencia generados en este capítulo serán utilizados a lo largo de la tesis para determinar el estado de salud de los individuos de *Leptodactylus luctator* y *Rhinella arenarum* provenientes de sitios alterados por la florihorticultura, la industria petroquímica y las descargas cloacales, y sitios de referencia, mínimamente alterados.

2.1.4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Existen diferencias en la variabilidad de los datos al considerar los valores obtenidos de la bibliografía, los valores obtenidos en la presente tesis, y los valores de diferentes especies de anuros.

Los valores de los diferentes parámetros clínicos evaluados en los individuos de *L. luctator* y *R. arenarum* provenientes de los sitios de referencia, permiten establecer intervalos de referencia para ambas especies con mayor precisión que los obtenidos a partir de la bibliografía existente.

Objetivos

- 1- Realizar una revisión de las publicaciones que evalúen y reporten datos de los diferentes parámetros clínicos en especies de anuros.
- 2- Realizar un análisis estadístico para conocer la variabilidad de los datos para cada parámetro clínico estudiado.
- 3- Describir ventajas y desventajas del uso de cada parámetro clínico evaluado.
- 4- Definir intervalos de referencia para cada parámetro clínico evaluado en *L. luctator* y *R. arenarum*.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de evaluar la variabilidad de los datos de cada parámetro estudiado y obtener los valores de referencia para cada parámetro clínico evaluado en anuros y particularmente en las dos especies de estudio provenientes de los sitios de referencia, considerando a estos últimos como individuos sanos, se consideraron dos enfoques: un enfoque teórico y un enfoque práctico.

2.2.1 Búsqueda de la información

Enfoque teórico

El enfoque teórico consistió en una búsqueda bibliográfica de los valores de los parámetros clínicos evaluados en anuros adultos. Para esto, se utilizaron buscadores como Scopus, Scielo y Google académico empleando los siguientes términos en la búsqueda: “anura biomarkers”, “anura clinical parameters”, “anura health”, “anura diseases” “anura effects”. Además, se examinó la bibliografía de los trabajos consultados y se revisó la información proveniente de la base de datos del grupo de trabajo. Se tomaron datos de estudios realizados en machos y hembras pertenecientes a diferentes Familias de anuros criados *ex situ*, expuestos en ensayos de laboratorio a diferentes tipos de contaminantes, como también de individuos colectados en el campo de sitios de referencia y sitios contaminados. Con toda la información obtenida, se confeccionaron tablas, en las cuales se ordenaron los datos, y se transformaron las unidades para unificar la información. En los casos en los que los datos fueron insuficientes (consideramos un $n < 10$), se recurrió a la herramienta de generación de números aleatorios, con la cual con los valores de la media y el desvío estándar se generaron 30 números aleatorios para alcanzar el *ene* deseado para el análisis, lo que permitió graficar la distribución.

Enfoque práctico

Para llevar a cabo el enfoque práctico, durante los años 2016, 2017, 2018 y 2019, se colectaron individuos adultos machos y hembras de *Leptodactylus luctator* (en estado pre-reproductivo entre los meses de octubre y noviembre), e individuos de *Rhinella arenarum* (durante el periodo reproductivo de la especie en el mes de septiembre) provenientes de sitios de referencia y de sitios alterados por las actividades antrópicas descritas en el capítulo 1 (cinturón florihortícola, industria petroquímica y descargas cloacales). Estos fueron capturados de manera directa, se colocaron en bolsas de polietileno con agua del lugar de captura y fueron trasladados al laboratorio, donde se procedió a realizar la disección siguiendo protocolos previamente publicados (Wright, 2001; Pessier y col., 2003; Campbell, 2015). Para la medición de cada parámetro se siguieron técnicas previamente publicadas (ver tabla 2.1) (Ver detalle de metodología de disección y procesamiento de muestras en capítulos 3 y 4). Para la captura de individuos se contó con los permisos correspondientes a Dirección de Flora y Fauna de la Provincia de Buenos Aires (Exp. 22500-41820/17 - Disposición 73 y Exp. EX-2019-37803203 - Disposición número DI-2019-101-GDEBA-DFYFMAGP). Mientras que la totalidad de

los procedimientos con animales se realizaron con el aval del Comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL - protocolo número 023-22-15).

Tabla 2.1: Técnicas empleadas para la medición de los parámetros clínicos.

Parámetro	Técnica empleada
Índice de condición corporal (ICC)	Fulton (1904)
Índice de cuerpos grasos (ICG)	Brodeur y col. (2012)
Índice hepatoesomático (IHS)	Brodeur y col. (2012)
Índice gonatoesomático (IGS)	Brodeur y col. (2012)
Recuento total de eritrocitos (RGR) (GR/L)	Natt and Herrick (1952)
Hematocrito (Hto) (%)	Allender y col. (2008)
Hemoglobina (Hb) (g/dL)	Drabkin and Austin (1935)
Volumen corpuscular medio (VCM) (fL)	Allender y col., 2008
Hemoglobina corpuscular media (HCM) (pg)	Allender y col., 2008
Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) (g/dL)	Allender y col., 2008
Recuento total de glóbulos blancos (RTGB) (GB/1000 GR)	Shutler y Marcogliese (2011)
Recuento total de trombocitos (RTT) (T/1000 GR)	Shutler y Marcogliese (2011)
Neutrófilos/100 leucocitos (N) (%)	Allender y col. (2008); Davis y col. (2009)
Eosinófilos/100 leucocitos (E) (%)	Allender y col. (2008); Davis y col. (2009)
Basófilos/100 leucocitos (B) (%)	Allender y col. (2008); Davis y col. (2009)
Monocitos/100 leucocitos (M) (%)	Allender y col. (2008); Davis y col. (2009)
Linfocitos/100 leucocitos (L) (%)	Allender y col. (2008); Davis y col. (2009)
Acetilcolinesterasa (AChE)*	Ellman y col. (1961)
Catalasa (CAT)*	Baudhin y col. (1964)
Glutación S-transferasa (GST)*	Habig y col. (1974)
Lactato deshidrogenasa (LDH) (U/L)	IFCC (2002, 2010)
Creatina fosfoquinasa (CPK) (U/L)	IFCC (2002, 2010)
Alanina aminotransferasa (TGP) (U/L)	IFCC (2002, 2010)
Aspartato aminotransferasa (TGO) (U/L)	IFCC (2002, 2010)
Fosfatasa alcalina (FA) (U/L)	IFCC (2002, 2010)
Proteínas totales (PT) (g/dL)	IFCC (2002, 2010)
Albumina (Alb) (g/dL)	IFCC (2002, 2010)
Globulina (Glob) (g/dL)	IFCC (2002, 2010)
Albumina/Globulina (A/G)	IFCC (2002, 2010)
Colesterol total (COL) (mg/dL)	IFCC (2002, 2010)
Triglicéridos (TGC) (mg/dL)	IFCC (2002, 2010)
Lipoproteínas de alta densidad (HDL) (mg/dL)	IFCC (2002, 2010)
Lipoproteínas de baja densidad (LDL) (mg/dL)	IFCC (2002, 2010)
Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) (mg/dL)	IFCC (2002, 2010)
Calcio (Ca) (mg/dL)	IFCC (2002, 2010)
Fosforo (P) (mg/dL)	IFCC (2002, 2010)
Magnesio (Mg) (mg/dL)	IFCC (2002, 2010)
Creatinina (Creat) (U/L)	IFCC (2002, 2010)
Urea (Ur) (mg/dL)	IFCC (2002, 2010)

* expresados en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteínas. GR: glóbulos rojos, GB: glóbulos blancos; T: trombocitos.

2.2.2 Tratamiento de los datos y análisis estadísticos

Análisis de la variabilidad de los datos

Con el objetivo de conocer la variabilidad de los datos para cada parámetro estudiado, realizar un análisis comparativo entre la variabilidad de los datos generados en la presente tesis, la variabilidad aportada por las variaciones metodológicas producto de los procedimientos empleados por los diferentes grupos de investigación, la variabilidad asociada con el grupo taxonómico, la variabilidad asociada con la procedencia de los individuos, y realizar una clasificación de los parámetros en función de la variabilidad, se realizaron seis agrupamientos de datos. Estos agrupamientos fueron: 1-todos los datos (bibliografía, base de datos del grupo de trabajo y datos de la tesis), 2- datos provenientes de la bibliografía (datos de la bibliografía y los datos obtenidos de la base de datos del grupo de trabajo), 3- datos de individuos de *L. lutator* de la tesis, 4-datos de individuos de *L. lutator* de los sitios de referencia, 5- datos de individuos de *R. arenarum* de la tesis, y 6- datos de individuos de *R. arenarum* de los sitios de referencia.

Para cada agrupamiento se calcularon los estadísticos media, mediana, cuartiles, desvío estándar, intervalos de confianza al 95% y coeficiente de variación. Además, se detectaron los outliers y valores extremos. Teniendo en cuenta que el coeficiente de variación brinda información sobre el nivel de precisión en la medición de los parámetros, los parámetros fueron ordenados según valor decreciente de coeficiente de variación, y clasificados en tres categorías ($CV > 100\%$; CV entre 50 y 100%; $CV < 50\%$).

Por otro lado, con el objetivo de describir el comportamiento de la variabilidad asociado a los agrupamientos, se realizó un gráfico tipo histograma para visualizar la cantidad de parámetros pertenecientes a las tres categorías en cada agrupamiento.

Además, con el objetivo de describir y visualizar el comportamiento particular de la variabilidad para cada parámetro asociada a los agrupamientos, se realizaron gráficos de líneas ("line plots") para cada parámetro teniendo en cuenta su CV en cada agrupamiento, asignándole la categoría 1 a los CV menores a 50%, 2 a los CV entre 50 y 100%, y 3 a los CV mayores a 100%. Sumado a esto, se realizó una resta de los coeficientes de variación de cada parámetro entre los agrupamientos para evaluar la diferencia en la magnitud de la variación, y así poder observar claramente si hubo una reducción o un aumento en la variabilidad entre los agrupamientos.

Por último, se realizaron gráficos de tipo box plot con los intervalos de referencia establecidos para cada parámetro en cada agrupamiento, con el fin de visualizar las diferencias entre los límites inferiores y superiores de cada intervalo.

Con la información reunida a partir del tratamiento de los datos realizado, la experiencia adquirida, y la información provenientes de la bibliografía, se procedió a realizar un proceso de calificación de los parámetros considerando los siguientes criterios determinantes para describir ventajas y desventajas del uso de cada parámetro: 1- probabilidad de cometer errores en la medición, 2-dificultad (baja, media, alta) del método, 3-costo del método (bajo, medio, alto), 4-si requiere sacrificar al animal (si/no), 5-variabilidad y estabilidad de esa variabilidad en los agrupamientos propuestos.

Influencia del sexo de los individuos sobre la variabilidad

Con el objetivo de conocer la influencia del sexo de los individuos en la variabilidad de los datos, se realizó el agrupamiento de los datos en “machos” y “hembras” para los individuos de *L. luctator* y de *R. arenarum* provenientes de sitios de referencia, y se calcularon los coeficientes de variación. Los parámetros clínicos fueron ordenados según valor decreciente de coeficiente de variación y la diferencia en la magnitud de la variación de cada parámetro clínico fue evaluada mediante la resta de los coeficientes de variación de cada parámetro entre los agrupamientos “todos” y “machos” y “hembras”.

Obtención de intervalos de referencias para *L. luctator* y *R. arenarum*

Una vez finalizado el análisis de la variabilidad, y determinado el mejor agrupamiento para establecer los intervalos de referencia para las especies de estudio, estos fueron establecidos siguiendo pautas la Sociedad Estadounidense de Patología Clínica Veterinaria (ASVCP por sus siglas en inglés) (ver introducción) y se confeccionaron tablas, las cuales serán utilizadas en capítulos posteriores para comparar los valores obtenidos de cada parámetro clínico en individuos provenientes de los sitios de estudio.

2.3 RESULTADOS

Se obtuvieron datos de 47 parámetros clínicos de 74 especies de anuros, incluidas las dos especies de anuros estudiadas en la presente tesis. La generación de números aleatorios fue necesaria solamente para los datos de los 19 parámetros plasmáticos

correspondientes al agrupamiento de datos provenientes de la bibliografía. Los parámetros clínicos de los cuales se obtuvo mayor cantidad de datos a partir de los trabajos consultados fueron los parámetros sanguíneos (Hto, RGR, Hb, VCM, HCM, CHCM) y los parámetros inmunológicos (RTT, RTGB, y porcentaje de N, E, B, M, L) de los cuales se encontró un total de entre 187 y 274, y 39 y 126, respectivamente; mientras que para los parámetros a nivel individuo el número de datos obtenidos fue mayor (entre 198 y 480 datos) debido a que el grupo de trabajo cuenta con una amplia base de datos para dichos parámetros. En cuanto a los parámetros bioquímicos, solamente se encontraron valores de actividad enzimática evaluada en hígado, pero no otros tejidos como músculo y riñón. Los parámetros evaluados en la presente tesis de los cuales no se encontró información en la bibliografía fueron: actividad GST en riñón, músculo y plasma, CAT en riñón, AChE en músculo y VLDL; mientras que de actividad AChE en plasma y fosfatasa alcalina se encontró solamente un valor.

En la tabla 1 del anexo 1 se presenta una tabla con los valores de los parámetros clínicos evaluados en anuros adultos encontrados en la bibliografía.

2.3.1 Análisis de la variabilidad de los datos

En las tablas 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 y 2.7 se muestran los valores de media, desvío estándar, intervalos de confianza al 95% mediana, cuartil 1, cuartil 3, y coeficiente de variación de cada parámetro correspondiente a cada agrupamiento.

Tabla 2.2: Estadística descriptiva correspondiente al agrupamiento “todos los datos”.

	N	Media	SD	IC 95%		Mediana	Q1	Q3	CV
ICC	974	0.096	0.026	0.094	0.097	0.097	0.082	0.11	27.64
ICG	1000	0.025	0.008	0.024	0.025	0.024	0.019	0.03	34.05
IHS	542	0.040	0.197	0.023	0.057	0.007	0.002	0.02	490.55
IGS	976	0.030	0.063	0.026	0.034	0.003	0.002	0.03	210.38
Hto (%)	720	32.3	8.9	31.6	32.9	31.1	26.6	38.0	27.44
RGR (GR/L)	778	0.69	0.33	0.66	0.71	0.62	0.45	0.86	47.52
Hb (g/dL)	629	7.70	2.70	7.49	7.91	7.30	5.78	9.50	35.09
VCM (fL)	690	548.0	276.5	527.3	568.7	498.4	349.7	690.5	50.45
HCM (pg)	567	117.9	49.9	113.8	122.0	112.0	76.8	151.4	42.36
CHCM (g/dL)	554	30.0	69.7	24.2	35.8	23.8	18.5	30.0	232.19
GST hígado*	265	6.74	3.49	6.32	7.16	6.24	4.48	8.25	51.79
CAT hígado*	263	1003.83	551.62	936.85	1070.80	970.53	642.43	1313.33	54.95
AChE hígado*	264	11.08	7.11	10.22	11.94	11.17	7.44	15.41	64.14
GST riñón*	213	2.53	1.18	2.37	2.69	2.21	1.75	2.85	46.49
CAT riñón*	209	469.25	318.14	425.87	512.64	354.42	226.89	626.99	67.80
GST músculo*	213	0.05	0.03	0.05	0.06	0.05	0.03	0.08	60.47
AChE músculo*	213	10.03	6.89	9.10	10.96	8.48	4.20	14.55	68.62
AChE plasma*	185	9.35	12.40	7.55	11.15	8.14	6.01	10.55	132.05

GST plasma*	196	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	110.37
Neu (%)	585	12.5	13.6	11.4	13.6	8.0	3.0	16.7	106.09
Eos (%)	579	5.5	6.0	5.0	6.0	4.0	1.0	7.7	109.69
Bas (%)	578	4.4	7.0	3.8	4.9	2.0	0.0	5.9	160.46
Mon (%)	579	2.8	3.8	2.5	3.1	1.4	0.0	4.0	130.27
Lin (%)	590	74.7	18.4	73.2	76.2	81.0	66.0	88.0	24.91
N:L	584	0.3	0.9	0.2	0.4	0.1	0.0	0.3	295.90
RTGB (GB/1000 GR)	506	31.78	14.20	30.54	33.02	30.00	21.00	41.00	44.22
RTT (T/1000 GR)	502	14.29	10.53	13.37	15.22	11.00	7.00	19.00	73.31
LDH (U/L)	137	4215.8	4638.3	3432.1	4999.4	3416.0	1738.0	5666.0	107.80
CPK (U/L)	141	6135.2	4814.1	5333.7	6936.7	5137.0	1329.4	10123.0	76.97
TGP (U/L)	140	138.1	684.9	23.7	252.5	24.0	11.5	88.9	481.07
TGO (U/L)	141	1067.8	990.8	902.8	1232.8	866.0	305.8	1552.0	85.96
FA (U/L)	108	450.4	491.3	356.6	544.1	228.0	132.5	695.0	109.10
PT (g/dL)	143	3.8	1.2	3.6	4.0	3.6	3.0	4.5	32.62
Alb (g/dL)	141	1.9	0.6	1.8	2.0	1.9	1.4	2.4	33.34
Glob (g/dL)	140	1.8	0.9	1.7	2.0	1.5	1.2	2.3	48.64
A/G	140	1.3	0.6	1.2	1.4	1.2	0.7	1.7	48.07
COL (mg/dL)	139	102.0	88.8	87.1	116.9	77.0	51.0	113.0	84.83
TGC (mg/dL)	138	51.5	52.8	42.6	60.4	27.0	18.0	66.0	101.96
HDL (mg/dL)	139	19.2	11.6	17.2	21.1	17.0	11.0	26.0	54.49
LDL (mg/dL)	138	55.2	57.0	45.6	64.8	45.5	28.0	67.0	103.27
VLDL (mg/dL)	106	9.2	10.7	7.1	11.3	5.0	3.0	9.0	116.13
Ca (mg/dL)	140	8.1	2.5	7.6	8.5	8.2	6.4	9.7	29.77
P (mg/dL)	138	4.7	2.6	4.3	5.1	4.2	3.3	5.9	53.36
Mg (mg/dL)	138	2.0	0.8	1.9	2.1	2.0	1.4	2.3	41.99
Creat (U/L)	140	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	0.2	0.4	98.34
Ur (mg/dL)	140	48.6	43.1	41.4	55.8	42.5	8.4	80.5	87.88
Ami (U/L)	132	3777.7	3873.3	3110.8	4444.6	2041.9	718.5	6377.0	99.45

* expresados en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteínas. GR: glóbulos rojos, GB: glóbulos blancos; T: trombocitos.

Tabla 2.3: Estadística descriptiva correspondiente al agrupamiento “datos de la bibliografía”.

	N	Media	SD	IC 95%	Mediana	Q1	Q3	CV
ICC	448	0.083	0.027	0.080 0.085	0.085	0.0610	0.099	33.25
ICG	480	0.025	0.009	0.024 0.026	0.024	0.0192	0.029	36.34
IHS	198	0.090	0.320	0.046 0.135	0.008	0.0028	0.023	353.89
IGS	456	0.032	0.072	0.026 0.039	0.003	0.0016	0.035	223.35
Hto (%)	226	33.9	10.1	32.5 35.2	33.1	26.9	40.0	29.88
RGR (GR/L)	274	0.59	0.30	0.55 0.62	0.52	0.41	0.68	51.40
Hb (g/dL)	241	7.82	2.87	7.46 8.19	7.80	5.68	9.80	36.74
VCM (fL)	198	651.5	308.0	608.3 694.6	626.0	471.3	821.9	47.28
HCM (pg)	210	134.85	46.47	128.53 141.17	135.82	107.50	169.00	34.46
CHCM (g/dL)	187	39.10	118.94	21.94 56.26	24.10	17.38	30.00	304.23
GST hígado*	49	5.86	2.72	5.08 6.64	6.10	4.75	8.00	46.36
CAT hígado*	49	470.67	428.76	347.52 593.83	230.00	151.00	806.00	91.09
AChE hígado*	49	0.07	0.15	0.03 0.12	0.05	0.02	0.08	211.60
GST riñón*	0							
CAT riñón*	0							
GST músculo*	0							
AChE músculo*	0							
AChE plasma*	1	168			168	168	168	
GST plasma*	0							
Neu (%)	121	27.4	18.6	24.0 30.7	22.4	15.0	35.0	67.86

Eos (%)	124	7.2	7.8	5.8	8.6	5.8	1.3	10.2	107.97
Bas (%)	118	8.1	11.7	6.0	10.3	3.8	1.0	10.0	144.27
Mon (%)	118	4.0	5.7	2.9	5.0	1.5	0.0	5.7	143.22
Lin (%)	126	54.7	21.0	51.0	58.4	57.7	37.9	68.0	38.36
N:L	121	1.0	1.9	0.7	1.3	0.4	0.2	0.7	189.07
RTGB (GB/1000 GR)	43	17.21	15.58	12.42	22.01	12.00	8.00	22.00	90.54
RTT (T/1000 GR)	39	18.27	16.51	12.92	23.62	12.00	4.00	30.00	90.39
LDH (U/L)	31	1751.0	1297.4	1275.1	2226.9	1482.9	403.5	2360.5	74.10
CPK (U/L)	33	949.8	512.7	768.0	1131.6	881.9	432.0	1323.9	53.98
TGP (U/L)	25	90.5	52.0	69.0	111.9	83.5	12.4	90.3	57.45
TGO (U/L)	27	235.7	156.1	174.0	297.5	204.1	20.4	278.3	66.22
FA (U/L)	1	148.0				148.0	148.0	148.0	
PT (g/dL)	36	4.9	1.2	4.5	5.3	4.9	3.9	5.7	25.14
Alb (g/dL)	35	1.4	0.3	1.4	1.5	1.4	1.3	1.6	17.66
Glob (g/dL)	34	3.1	0.5	2.9	3.2	3.1	2.7	3.5	16.31
A/G	34	0.5	0.1	0.5	0.6	0.5	0.4	0.6	24.43
COL (mg/dL)	29	208.8	97.5	171.7	245.9	217.6	134.8	266.9	46.70
TGC (mg/dL)	31	71.0	46.1	54.1	87.9	69.7	36.8	92.6	64.95
HDL (mg/dL)	25	29.4	17.3	22.2	36.5	26.7	2.2	35.7	58.89
LDL (mg/dL)	32	72.4	42.5	57.1	87.7	56.1	44.3	116.4	58.68
VLDL (mg/dL)	0								
Ca (mg/dL)	34	9.5	1.7	8.9	10.1	9.4	8.4	10.7	17.40
P (mg/dL)	35	5.8	2.8	4.9	6.8	6.1	4.1	8.5	48.44
Mg (mg/dL)	32	2.2	0.3	2.1	2.3	2.2	2.0	2.4	12.07
Creat (U/L)	33	0.7	0.3	0.6	0.8	0.7	0.5	0.9	46.41
Ur (mg/dL)	31	5.0	3.1	3.9	6.1	3.9	2.8	7.0	60.88
Ami (U/L)	28	1038.9	899.7	690.1	1387.8	714.9	344.8	1239.8	86.60

* expresados en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteínas. GR: glóbulos rojos, GB: glóbulos blancos; T: trombocitos.

Tabla 2.4: Estadística descriptiva correspondiente al agrupamiento “datos de individuos de *L. lactator* de la tesis”.

	N	Media	SD	IC 95%		Mediana	Q1	Q3	CV
ICC	266	0.107	0.018	0.105	0.11	0.107	0.095	0.12	16.45
ICG	268	0.021	0.007	0.021	0.02	0.020	0.017	0.02	31.01
IHS	190	0.007	0.008	0.006	0.01	0.004	0.001	0.01	117.14
IGS	268	0.040	0.064	0.032	0.05	0.004	0.002	0.04	159.78
Hto (%)	262	30.7	8.6	29.7	31.7	30.0	24.5	36.0	27.89
RGR (GR/L)	266	0.89	0.32	0.85	0.93	0.87	0.66	1.08	36.35
Hb (g/dL)	220	7.69	2.88	7.31	8.07	6.91	5.72	9.42	37.40
VCM (fL)	259	375.2	139.2	358.2	392.2	356.0	285.7	429.4	37.11
HCM (pg)	218	85.55	27.96	81.82	89.29	79.70	67.00	102.00	32.69
CHCM (g/dL)	215	25.53	10.28	24.15	26.92	23.05	17.62	31.46	40.25
GST hígado*	216	6.94	3.62	6.45	7.42	6.24	4.48	8.57	52.16
CAT hígado*	213	1116.32	483.68	1050.99	1181.65	1013.75	738.42	1405.29	43.33
AChE hígado*	215	13.59	5.29	12.88	14.30	12.53	9.53	16.96	38.94
GST riñón*	213	2.53	1.18	2.37	2.69	2.21	1.75	2.85	46.49
CAT riñón*	209	469.25	318.14	425.87	512.64	354.42	226.89	626.99	67.80
GST músculo*	213	0.05	0.03	0.05	0.06	0.05	0.03	0.08	60.47
AChE músculo*	213	10.03	6.89	9.10	10.96	8.48	4.20	14.55	68.62
AChE plasma*	182	8.44	3.79	7.88	8.99	8.13	6.01	10.51	44.95
GST plasma*	194	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	94.35
Neu (%)	267	10.4	9.5	9.2	11.5	8.0	4.0	13.6	91.29
Eos (%)	266	3.9	4.5	3.3	4.4	2.0	1.0	5.0	116.55

Bas (%)	267	3.8	5.1	3.2	4.5	2.0	0.0	5.0	134.57
Mon (%)	263	2.8	2.9	2.5	3.2	2.0	1.0	4.0	98.97
Lin (%)	267	78.3	14.7	76.6	80.1	83.0	70.0	89.0	18.94
N:L	259	0.14	0.16	0.12	0.16	0.09	0.04	0.16	111.52
RTGB (GB/1000 GR)	267	0.04	0.01	0.04	0.04	0.04	0.03	0.05	31.80
RTT (T/1000 GR)	267	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	62.38
LDH (U/L)	25	5732.2	3334.8	4355.7	7108.7	4644.0	3114.0	8574.0	58.18
CPK (U/L)	27	9583.4	4142.9	7944.5	11222.3	9821.0	6603.0	13073.0	43.23
TGP (U/L)	23	22.0	13.8	16.0	28.0	20.0	11.0	29.0	62.70
TGO (U/L)	28	1342.8	1183.8	883.7	1801.8	1041.0	608.0	1553.0	88.16
FA (U/L)	27	991.3	298.4	873.2	1109.3	861.0	807.0	1246.0	30.10
PT (g/dL)	28	2.8	1.0	2.4	3.2	2.7	2.3	3.2	36.93
Alb (g/dL)	27	1.4	0.5	1.2	1.6	1.3	1.1	1.8	36.56
Glob (g/dL)	27	1.4	0.6	1.2	1.6	1.3	1.1	1.6	40.37
A/G	27	1.0	0.2	1.0	1.1	1.1	0.9	1.2	17.51
COL (mg/dL)	28	92.9	40.1	77.3	108.4	84.0	62.5	111.5	43.15
TGC (mg/dL)	26	22.0	9.5	18.2	25.8	19.5	15.0	26.0	42.97
HDL (mg/dL)	28	16.6	6.0	14.2	18.9	16.0	11.5	20.5	36.33
LDL (mg/dL)	27	72.9	38.3	57.8	88.1	62.0	48.0	92.0	52.48
VLDL (mg/dL)	27	4.7	2.5	3.7	5.7	4.0	3.0	5.0	53.01
Ca (mg/dL)	27	6.2	1.8	5.5	6.9	6.6	5.8	7.2	28.62
P (mg/dL)	26	5.6	2.0	4.7	6.4	5.4	4.7	6.3	36.80
Mg (mg/dL)	27	1.4	0.9	1.1	1.8	1.3	1.0	1.6	62.15
Creat (U/L)	27	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2	0.3	25.55
Ur (mg/dL)	29	18.8	13.9	13.5	24.1	16.0	9.0	23.0	73.86
Ami (U/L)	27	690.4	337.4	557.0	823.9	714.0	428.0	919.0	48.87

* expresados en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteínas. GR: glóbulos rojos, GB: glóbulos blancos; T: trombocitos.

Tabla 2.5: Estadística descriptiva correspondiente al agrupamiento “datos de individuos de *L. lactator* de los sitios de referencia”.

	N	Media	SD	IC 95%		Mediana	Q1	Q3	CV
ICC	121	0.111	0.018	0.108	0.11	0.111	0.101	0.12	16.90
ICG	123	0.021	0.006	0.020	0.02	0.020	0.018	0.02	26.15
IHS	97	0.004	0.006	0.003	0.01	0.002	0.001	0.00	136.04
IGS	123	0.037	0.055	0.027	0.05	0.008	0.002	0.04	151.82
Hto (%)	119	27.7	7.9	26.3	29.2	26.5	23.0	32.0	28.05
RGR (GR/L)	122	0.81	0.32	0.75	0.87	0.81	0.60	1.03	40.22
Hb (g/dL)	99	7.72	3.04	7.12	8.33	6.75	5.86	9.07	41.04
VCM (fL)	117	374.5	130.1	350.7	398.3	359.3	285.7	428.6	35.50
HCM (pg)	98	89.68	27.33	84.20	95.16	84.15	69.40	107.00	30.83
CHCM (g/dL)	97	27.46	7.70	25.91	29.02	27.23	21.76	31.56	30.83
GST hígado*	97	7.37	3.26	6.71	8.03	6.95	4.85	9.19	44.90
CAT hígado*	96	1336.56	536.83	1227.79	1445.33	1342.70	958.27	1628.78	40.57
AChE hígado*	98	14.45	5.54	13.34	15.56	13.54	10.17	18.11	37.06
GST riñón*	97	2.32	1.03	2.12	2.53	2.15	1.67	2.49	51.30
CAT riñón*	94	399.28	280.16	341.90	456.66	317.28	215.51	434.87	77.64
GST músculo*	97	0.04	0.03	0.04	0.05	0.04	0.02	0.05	69.16
AChE músculo*	97	7.21	4.95	6.21	8.21	5.64	3.31	9.85	74.78
AChE plasma*	85	8.23	4.36	7.30	9.17	7.47	5.14	9.97	52.49
GST plasma*	91	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	98.35
Neu (%)	123	8.8	8.1	7.3	10.2	6.0	3.0	11.0	89.70
Eos (%)	122	1.9	2.5	1.5	2.4	1.0	0.0	2.1	131.22
Bas (%)	123	2.7	3.0	2.1	3.2	2.0	0.0	4.0	117.40

Mon (%)	123	2.3	2.1	1.9	2.7	2.0	1.0	3.0	92.41
Lin (%)	123	83.7	11.3	81.7	85.7	87.0	80.0	91.0	13.65
N:L	119	0.10	0.10	0.08	0.12	0.06	0.03	0.13	99.11
RTGB (GB/1000 GR)	123	0.04	0.01	0.04	0.04	0.04	0.03	0.05	34.78
RTT (T/1000 GR)	123	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	60.95
LDH (U/L)	13	7003.1	3637.0	4805.2	9200.9	8304.0	3416.0	9116.0	51.93
CPK (U/L)	15	9745.3	4432.8	7290.5	12200.1	9821.0	6603.0	13351.0	45.49
TGP (U/L)	11	29.4	15.3	19.1	39.6	29.0	11.0	42.0	52.12
TGO (U/L)	15	1763.4	1449.5	960.7	2566.1	1201.0	727.0	2294.0	82.20
FA (U/L)	14	987.4	353.5	783.3	1191.5	855.0	707.0	1365.0	35.80
PT (g/dL)	15	2.7	0.8	2.3	3.1	2.6	2.1	3.2	28.57
Alb (g/dL)	15	1.3	0.4	1.1	1.6	1.2	1.1	1.5	33.26
Glob (g/dL)	15	1.3	0.4	1.1	1.5	1.3	1.1	1.6	26.88
A/G	15	1.0	0.2	0.9	1.1	1.1	0.9	1.2	19.90
COL (mg/dL)	15	89.3	45.9	63.8	114.7	78.0	54.0	109.0	51.44
TGC (mg/dL)	13	25.3	9.6	19.5	31.1	23.0	18.0	30.0	37.91
HDL (mg/dL)	15	13.5	4.5	11.0	16.1	14.0	11.0	16.0	33.61
LDL (mg/dL)	14	72.6	45.7	46.3	99.0	59.5	43.0	91.0	62.91
VLDL (mg/dL)	14	5.6	2.7	4.1	7.2	5.0	4.0	7.0	48.46
Ca (mg/dL)	15	5.6	2.0	4.5	6.7	6.1	4.7	6.7	36.00
P (mg/dL)	14	6.2	2.1	5.0	7.5	5.7	4.7	7.3	34.29
Mg (mg/dL)	15	1.7	1.1	1.1	2.3	1.4	1.3	1.6	62.27
Creat (U/L)	14	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2	0.3	24.97
Ur (mg/dL)	15	18.6	15.8	9.9	27.3	13.0	6.0	23.0	84.83
Ami (U/L)	15	592.1	239.4	459.5	724.7	576.0	402.0	739.0	40.44

* expresados en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteínas. GR: glóbulos rojos, GB: glóbulos blancos; T: trombocitos.

Tabla 2.6: Estadística descriptiva correspondiente al agrupamiento “datos de individuos de *R. arenarum* de la tesis”.

	N	Media	SD	IC 95%		Mediana	Q1	Q3	CV
ICC	214	0.107	0.018	0.104	0.109	0.105	0.096	0.12	17.28
ICG	208	0.028	0.007	0.027	0.029	0.028	0.023	0.03	23.52
IHS	120	0.016	0.022	0.012	0.020	0.009	0.004	0.02	137.82
IGS	207	0.007	0.012	0.005	0.008	0.002	0.002	0.00	177.62
Hto (%)	199	33.5	7.2	32.5	34.5	33.0	29.0	39.0	21.54
RGR (GR/L)	203	0.57	0.24	0.54	0.60	0.52	0.42	0.68	41.23
Hb (g/dL)	135	7.63	2.09	7.27	7.99	7.65	6.13	9.10	27.44
VCM (fL)	199	663.79	262.91	627.04	700.55	627.45	479.04	790.12	39.61
HCM (pg)	124	134.95	50.21	126.02	143.87	136.00	98.00	166.50	37.21
CHCM (g/dL)	122	24.06	5.56	23.07	25.06	23.67	20.98	27.17	23.10
Neu (%)	196	5.6	4.9	4.9	6.3	4.0	2.0	8.0	86.77
Eos (%)	199	6.2	5.6	5.4	7.0	5.0	3.0	8.0	90.26
Bas (%)	199	2.8	3.9	2.3	3.4	1.0	0.0	4.0	137.78
Mon (%)	198	1.6	2.2	1.3	1.9	1.0	0.0	2.0	136.42
Lin (%)	198	83.3	7.9	82.2	84.5	85.0	79.0	89.0	9.51
N:L	195	0.07	0.07	0.06	0.08	0.05	0.02	0.09	96.51
RTGB (GB/1000 GR)	198	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	35.59
RTT (T/1000 GR)	198	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	49.85
LDH (U/L)	74	4379.8	2420.4	3819.1	4940.6	4368.5	2728.0	5850.0	55.26
CPK (U/L)	76	7392.8	4236.7	6424.7	8360.9	7336.5	3422.0	10990.0	57.31
TGP (U/L)	75	55.3	65.5	40.3	70.4	19.0	11.0	94.0	118.43
TGO (U/L)	73	1351.8	786.0	1168.4	1535.2	1222.0	832.0	1752.0	58.14
FA (U/L)	74	203.3	130.6	173.1	233.6	172.5	120.0	252.0	64.22

PT (g/dL)	76	3.7	0.9	3.5	3.9	3.6	3.1	4.3	24.86
Alb (g/dL)	76	2.3	0.5	2.2	2.4	2.3	2.0	2.6	23.11
Glob (g/dL)	76	1.4	0.5	1.3	1.5	1.3	1.1	1.7	35.58
A/G	76	1.7	0.4	1.6	1.8	1.7	1.5	2.0	25.84
COL (mg/dL)	75	63.8	24.8	58.1	69.5	60.0	44.0	82.0	38.85
TGC (mg/dL)	75	52.5	57.9	39.2	65.9	26.0	18.0	59.0	110.25
HDL (mg/dL)	76	19.0	8.0	17.1	20.8	17.0	13.0	25.5	42.30
LDL (mg/dL)	75	35.6	19.4	31.1	40.0	33.0	20.0	48.0	54.53
VLDL (mg/dL)	73	9.8	11.0	7.2	12.4	5.0	4.0	10.0	112.32
Ca (mg/dL)	76	8.2	2.6	7.6	8.8	8.8	6.1	9.9	31.86
P (mg/dL)	72	3.8	1.5	3.4	4.1	3.6	2.8	4.4	38.69
Mg (mg/dL)	76	2.1	0.9	1.9	2.4	2.0	1.5	2.5	42.48
Creat (U/L)	75	0.3	0.1	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	38.83
Ur (mg/dL)	76	78.2	36.2	70.0	86.5	74.5	47.0	102.5	46.25
Ami (U/L)	76	6352.8	3714.1	5504.1	7201.5	5974.5	3540.5	8426.5	58.46

* expresados en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteínas. GR: glóbulos rojos, GB: glóbulos blancos; T: trombocitos.

Tabla 2.7: Estadística descriptiva correspondiente al agrupamiento “datos de individuos de *R. arenarum* de los sitios de referencia”.

	N	Media	SD	IC 95%		Mediana	Q1	Q3	CV
ICC	48	0.116	0.018	0.110	0.12	0.113	0.105	0.12	15.47
ICG	43	0.033	0.007	0.031	0.04	0.033	0.028	0.04	19.77
IHS	29	0.021	0.019	0.014	0.03	0.013	0.008	0.03	89.96
IGS	43	0.012	0.021	0.006	0.02	0.003	0.002	0.00	170.68
Hto (%)	46	34.72	6.51	32.78	36.65	33.75	30.00	40.50	18.76
RGR (GR/L)	48	0.71	0.30	0.63	0.80	0.60	0.50	0.87	42.65
Hb (g/dL)	34	8.23	1.84	7.59	8.87	8.41	6.85	9.10	22.35
VCM (fL)	46	551.2	214.6	487.5	614.9	522.3	384.6	709.1	38.93
HCM (pg)	34	120.62	48.52	103.69	137.55	126.00	75.50	144.00	40.22
CHCM (g/dL)	34	24.10	3.97	22.71	25.48	23.43	21.07	27.52	16.46
Neu (%)	40	6.98	5.14	5.34	8.62	5.36	3.00	10.00	73.61
Eos (%)	42	6.72	4.64	5.28	8.17	6.00	4.00	8.00	69.08
Bas (%)	42	2.10	2.82	1.22	2.98	1.00	0.00	3.70	134.04
Mon (%)	42	1.79	2.91	0.88	2.69	1.00	0.00	2.00	162.88
Lin (%)	42	81.49	8.02	78.99	83.99	81.00	77.50	87.00	9.85
N:L	40	0.090	0.073	0.066	0.11	0.071	0.034	0.12	81.84
RTGB (GB/1000 GR)	42	0.023	0.010	0.020	0.03	0.021	0.017	0.03	44.33
RTT (T/1000 GR)	42	0.008	0.005	0.007	0.01	0.007	0.005	0.01	58.02
LDH (U/L)	11	2509.5	1839.9	1273.4	3745.5	1738.0	1018.0	4726.0	73.32
CPK (U/L)	13	3214.7	2063.5	1967.7	4461.7	3336.0	1574.0	4219.0	64.19
TGP (U/L)	12	89.6	69.6	45.3	133.8	88.5	22.0	139.0	77.72
TGO (U/L)	12	1217.1	838.1	684.6	1749.6	913.5	796.5	1862.0	68.86
FA (U/L)	13	107.5	59.6	71.4	143.5	119.0	47.0	148.0	55.46
PT (g/dL)	13	3.7	1.3	2.9	4.5	3.9	2.5	4.7	35.57
Alb (g/dL)	13	2.4	0.9	1.9	2.9	2.6	1.7	3.0	36.54
Glob (g/dL)	13	1.3	0.5	1.0	1.6	1.3	1.0	1.7	37.43
A/G	13	1.9	0.5	1.5	2.2	1.8	1.6	2.2	29.01
COL (mg/dL)	12	74.4	23.4	59.5	89.3	80.5	54.5	90.0	31.47
TGC (mg/dL)	13	113.1	87.0	60.5	165.6	66.0	42.0	167.0	76.93
HDL (mg/dL)	13	15.9	6.2	12.2	19.7	16.0	11.0	17.0	38.92
LDL (mg/dL)	12	37.4	22.4	23.2	51.7	38.0	17.5	54.0	59.99
VLDL (mg/dL)	13	22.5	17.4	11.9	33.0	13.0	8.0	33.0	77.64
Ca (mg/dL)	13	6.8	3.0	5.0	8.6	6.4	4.4	8.1	43.75

P (mg/dL)	12	3.8	1.6	2.8	4.8	3.5	2.9	4.2	41.81
Mg (mg/dL)	13	2.1	1.1	1.4	2.7	1.8	1.4	2.3	51.62
Creat (U/L)	12	0.3	0.2	0.2	0.4	0.3	0.2	0.3	60.81
Ur (mg/dL)	13	60.9	39.0	37.3	84.5	45.0	33.0	73.0	64.03
Ami (U/L)	13	8421.2	5001.0	5399.1	11443.2	8356.0	5836.0	12796.0	59.39

* expresados en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteínas. GR: glóbulos rojos, GB: glóbulos blancos; T: trombocitos.

Enfoque teórico

Al considerar los valores de coeficiente de variación de los agrupamientos “todos” y “datos de la bibliografía”, se puede observar que existen varios parámetros que muestran una gran variabilidad. Los valores de los coeficientes de variación toman valores entre 24,9 y 490,55 para el agrupamiento “todos”, y entre 12,06 y 353,88 para el agrupamiento “datos de la bibliografía”. Al separar los datos según su CV, se puede observar que de los 47 parámetros evaluados en el agrupamiento “todos”, 17 (36,1%) presentaron un $\text{CV}>100$; 15 (31,9%) un CV entre 50 y 100; y 15 (31,9%) un $\text{CV}<50$. Por otro lado, al considerar el agrupamiento “datos de la bibliografía”, de los 39 parámetros evaluados, 8 (20,5%) presentaron un $\text{CV}>100$; 14 (35,8%) presentaron un CV entre 50 y 100; y 17 (43,5%) de ellos presentaron un $\text{CV}<50$ (tabla 2.8 y figura 2.1).

Enfoque práctico

En cuanto a la información obtenida a partir de la presente tesis, se obtuvieron datos de un total de 268 individuos de *L. luctator* y 214 individuos de *R. arenarum*, siendo 123 individuos de *L. luctator* y 48 individuos de *R. arenarum* provenientes de sitios de referencia. Los parámetros plasmáticos fueron evaluados solamente un año para *L. luctator* y dos años para *R. arenarum* por lo que la cantidad de datos para estos biomarcadores es mucho menor al total de individuos colectados de cada especie ($n=29$ para *L. luctator* y $n=76$ para *R. arenarum*). Los parámetros bioquímicos no fueron medidos en *R. arenarum* ni en los individuos de *L. luctator* colectados durante el año 2019.

Al considerar los valores de coeficiente de variación correspondientes a los agrupamientos de *L. luctator* y *R. arenarum* de la tesis y de los individuos provenientes de sitios de referencia se pudo observar que para ambas especies la cantidad de parámetros que muestran una gran variabilidad ($\text{CV}>100\%$) es menor que la cantidad existente para los agrupamientos “todos” y “datos de la bibliografía” (tabla 2.8 y figura 2.1). Los valores de los coeficientes de variación tomaron valores entre 16,45 y 159,78

para “datos de individuos de *L. luctator* de la tesis”, y entre 13,65 y 151,82 para “datos de individuos de *L. luctator* provenientes de los sitios de referencia”.

Por otro lado, para “datos de individuos de *R. arenarum* de la tesis” los coeficientes de variación tomaron valores entre 9,51 y 177,61 y para “datos de individuos de *R. arenarum* provenientes de los sitios de referencia” tomaron valores entre 9,84 y 170,67.

Tal como se puede observar en la Tabla 2.8 y en la Figura 2.1, al considerar las categorías de $CV > 100$; CV entre 50 y 100; $CV < 50$, de los 47 parámetros evaluados en el agrupamiento “datos de individuos de *L. luctator* de la tesis”, 6 (12,7%) presentaron un $CV > 100$; 14 (29,7%) presentaron un CV entre 50 y 100; y 27 (57,4%) presentaron un $CV < 50$. Con respecto al agrupamiento “datos de individuos de *L. luctator* provenientes de los sitios de referencia”, 4 (8,5%) presentaron un $CV > 100$; 17 (36,1%) presentaron un CV entre 50 y 100; y 26 (55,3%) presentaron (55%) un $CV < 50$.

Por otro lado, al considerar el agrupamiento “datos de individuos de *R. arenarum* de la tesis” de los 38 parámetros evaluados, 7 (18,4%) presentaron un $CV > 100$; 9 (23,6%) presentaron un CV entre 50 y 100; y 22 (57,8%) de ellos presentaron un $CV < 50$. Con respecto al agrupamiento “datos de individuos de *R. arenarum* provenientes de los sitios de referencia” de los 38 parámetros evaluados, 3 (7,8%) presentaron un $CV > 100$; 17 (44,7%) presentaron un CV entre 50 y 100; y 18 (47,3%) de ellos presentaron un $CV < 50$.

Tabla 2.8: Cantidad de parámetros clínicos que presentan $CV > 100$; $50 < CV < 100$ y $CV < 50$.

Agrupamiento	n parámetros	$CV > 100$	$50 < CV < 100$	$CV < 50$
Todos	47	36,1% (17)	31,9% (15)	31,9% (15)
Bibliografía	39	16,3% (8)	35,8% (14)	43,5% (17)
<i>L. luctator</i> tesis	47	12,7% (6)	29,7% (14)	57,4% (27)
<i>L. luctator</i> referencia	47	8,5% (4)	36,1% (17)	55,3% (26)
<i>R. arenarum</i> tesis	38	18,4% (7)	23,6% (9)	57,8% (22)
<i>R. arenarum</i> referencia	38	7,8% (3)	44,7% (17)	47,3% (18)

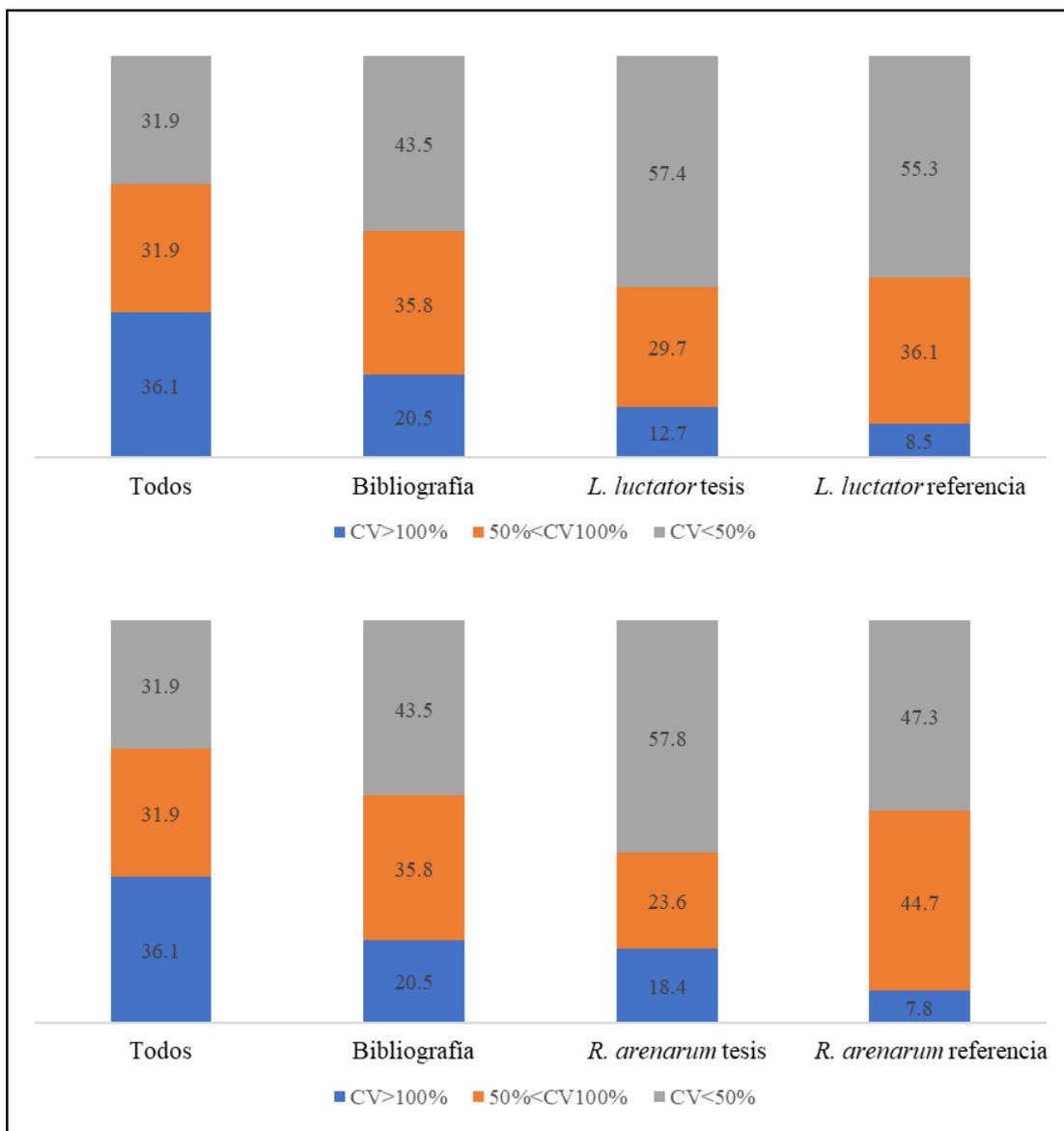


Figura 2.1: Porcentaje de parámetros pertenecientes a las categorías CV > 100%, 50% < CV < 100% y CV < 50% para los diferentes agrupamientos.

En la figura 2.1, se puede observar que a medida que el agrupamiento es más específico existen menor cantidad de parámetros con CV mayor a 100%. La mayor disminución se nota entre el agrupamiento “todos” y el agrupamiento “*L. luctator* o *R. arenarum* de la tesis”, donde se produce un cambio de 16 parámetros para el agrupamiento todos a 6 parámetros para *L. luctator* de la tesis y 7 parámetros para *R. arenarum* de la tesis. Además, entre *L. luctator* y *R. arenarum* de la tesis y dichas especies de los sitios de referencias también existe una reducción en el número de parámetros con CV mayor a 100, siendo en estos últimos de 4 y 3, respectivamente.

Al evaluar el comportamiento de la variabilidad de cada parámetro a partir de los gráficos Line plot, para *L. luctator* se determinó que 20 de los 47 parámetros evaluados

se mantienen en la misma categoría (estables) en todos los agrupamientos. Con CV menor a 50%: ICC, IHS, Hto, Hb, HCM, Lin, PT, Alb, Glob, A/G, Ca. Con CV entre 50 y 100%: RTT, TGO, Urea. Y con CV mayor a 100%: ICG, IGS, Eos, Bas, Mon, N:L.

Entre los parámetros que pasan de categoría mayor a menor (disminuye el CV) a medida que cambian los agrupamientos, se encuentran: RGR, VCM, CHCM, GST (H), CAT (H), AChE (H), Neu, RTGB, LDH, CPK, TGP, TGC, HDL, LDL, P, Creat y Ami. Por otro lado, el CV del parámetro COL, es menor en los datos de la bibliografía y *L. luctator* de la tesis, pero mayor en el agrupamiento “todos” y “*L. luctator* de sitio de referencia”. Y el CV del parámetro Mg, es menor en los agrupamientos “todos” y “bibliografía” que en los agrupamientos “*L. luctator* de la tesis” y “*L. luctator* de sitio de referencia”.

Al evaluar el comportamiento de cada parámetro para *R. arenarum*, se determinó que 15 de los 38 parámetros evaluados, se mantienen en la misma categoría (estables) en todos los agrupamientos. Con CV menor a 50%: ICC, IHS, Hto, Hb, HCM, PT, Alb, Glob, A/G, Ca. Con CV entre 50 y 100%: CPK, TGO y Ami. Y con CV mayor a 100%: IGS y Bas.

Entre los parámetros que pasan de categoría mayor a menor (disminuye el CV) a medida que cambian los agrupamientos se encuentran: ICG, RGR, VCM, MCHC, Neu, Lin, N:L, RTGB, RTT, LDH, COL, HDL, LDL y P. Por otro lado, los CVs de los parámetros Mon y Mg aumentaron al ir cambiando de agrupamiento, siendo mayor en *R. arenarum*. Para el parámetro Eos, se observa que en el agrupamiento *R. arenarum* tesis el CV es menor que en el resto de los agrupamientos. Para los parámetros TGP y TGC se observa que en los agrupamientos bibliografía y *R. arenarum* de referencia son menores que en los otros dos agrupamientos. Mientras que los parámetros Urea y Creat presentan un menor CV en el agrupamiento *R. arenarum* tesis y bibliografía, respectivamente. Al comparar las dos especies, de los 38 parámetros compartidos, 22 de ellos presentaron el mismo comportamiento, ya sea manteniéndose estables, disminuyendo o variando su CV a medida que cambian los agrupamientos.

Al evaluar la diferencia en la magnitud de la variación de cada parámetro clínico mediante la resta de los coeficientes de variación de cada parámetro entre los agrupamientos “todos” y *L. luctator* provenientes de los sitios de referencia, y “todos” y *R. arenarum* provenientes de los sitios de referencia (cálculos no mostrados), pudimos observar que el agrupamiento de *L. luctator* provenientes de los sitios de referencia

produjo una reducción en la variabilidad de todos los parámetros clínicos evaluados con respecto al agrupamiento “todos”, menos de ocho de ellos: Hb, GST (riñón), CAT (riñón), GST (músculo), AChE (músculo), Eos, Ca y Mg, siendo Eos y Mg los parámetros que mostraron una mayor diferencia (mayor a 20 puntos), mientras que Hb, GST (riñón), CAT (riñón), GST (músculo), AChE (músculo) y Ca presentaron una diferencia menor a 10 puntos. Por otro lado, el agrupamiento de *R. arenarum* provenientes de los sitios de referencia produjo una reducción en la variabilidad de todos los parámetros clínicos con respecto al agrupamiento “todos”, menos de cinco de ellos: Mon, PT, Alb, Ca y Mg, siendo Mon el parámetro que presentó una mayor diferencia (27 puntos), mientras que PT, Alb, Ca y Mg presentaron una diferencia entre 3 y 12 puntos.

En las figuras 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6 se muestran los intervalos de referencia graficados como box plot para cada parámetro evaluado en los agrupamientos “bibliografía”, “*L. luctator* de la tesis”, “*L. luctator* provenientes de los sitios de referencia”, “*R. arenarum* de la tesis” y “*R. arenarum* provenientes de los sitios de referencia”.

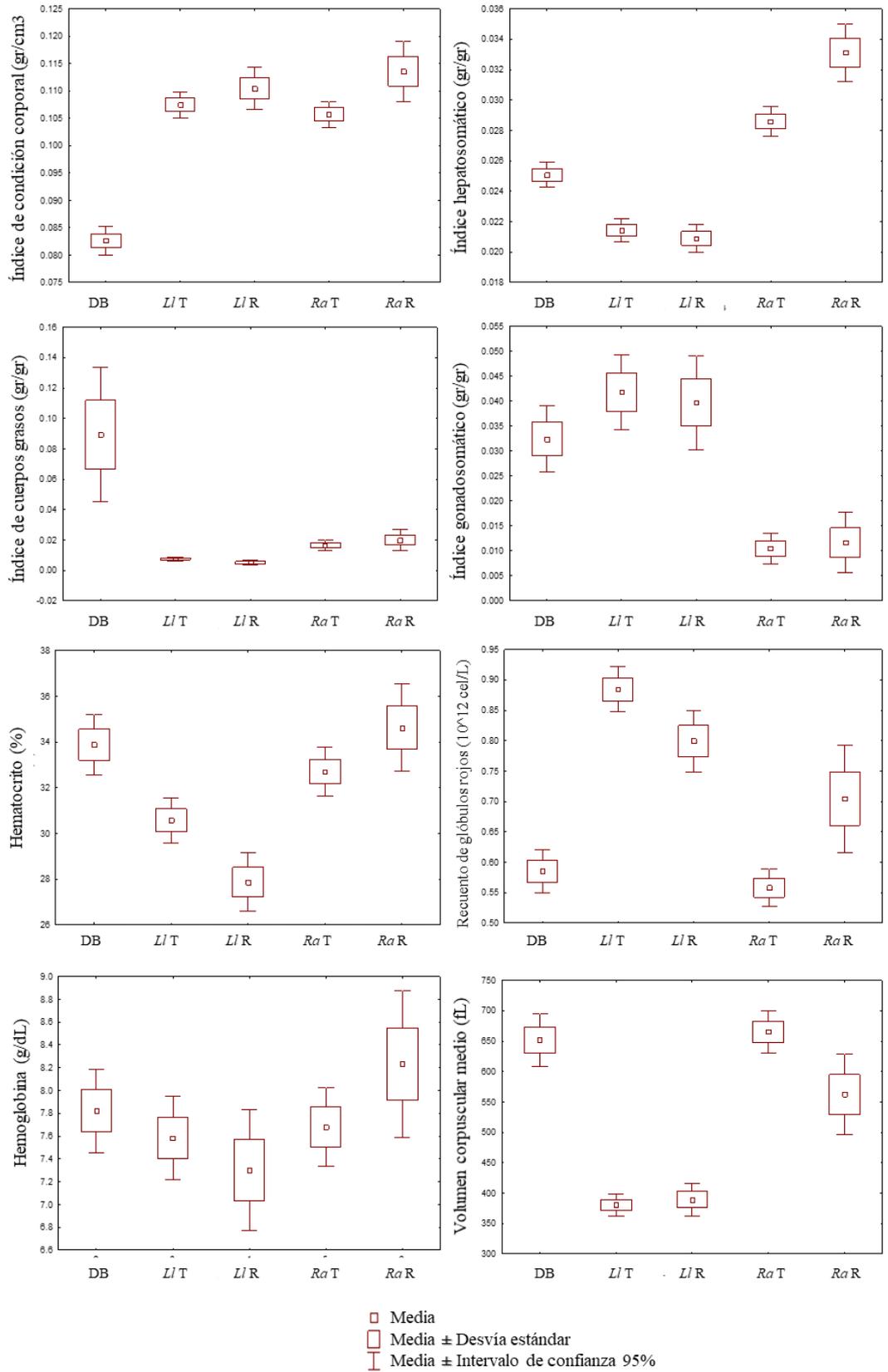


Figura 2.2: Box plot con los intervalos de referencia. DB: datos de la bibliografía. *L/T*: datos de *L. luctator* de la tesis. *L/R*: datos de *L. luctator* de sitios de referencia. *Ra T*: datos de *R. arenarum* de la tesis. *Ra R*: datos de *R. arenarum* de sitios de referencia.

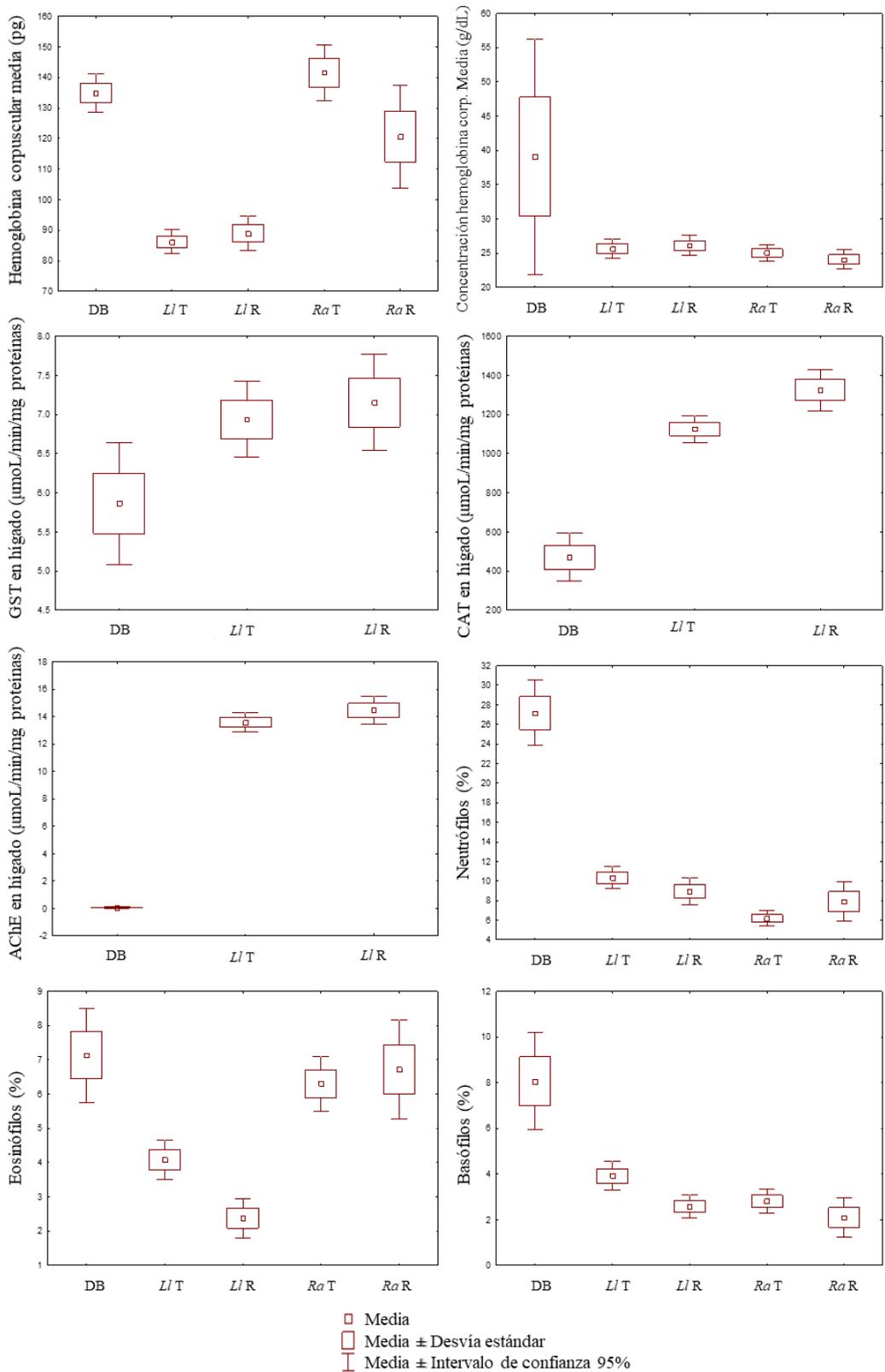


Figura 2.3: Box plot con los intervalos de referencia. DB: datos de la bibliografía. *L/T*: datos de *L. luctator* de la tesis. *L/R*: datos de *L. luctator* de sitios de referencia. *Ra T*: datos de *R. arenarum* de la tesis. *Ra R*: datos de *R. arenarum* de sitios de referencia.

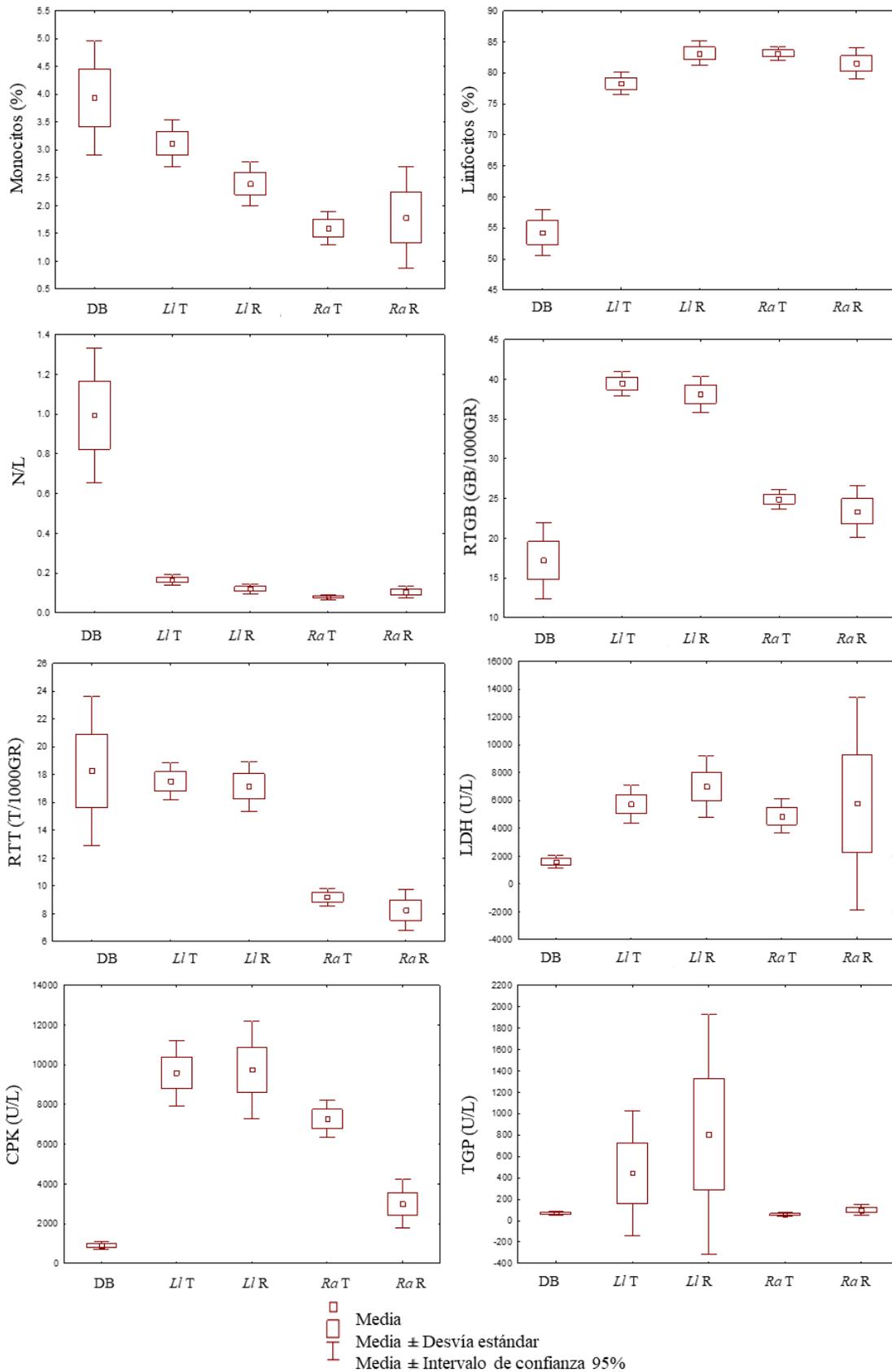


Figura 2.4: Box plot con los intervalos de referencia. DB: datos de la bibliografía. Ll T: datos de *L. luctator* de la tesis. Ll R: datos de *L. luctator* de sitios de referencia. Ra T: datos de *R. arenarum* de la tesis. Ra R: datos de *R. arenarum* de sitios de referencia.

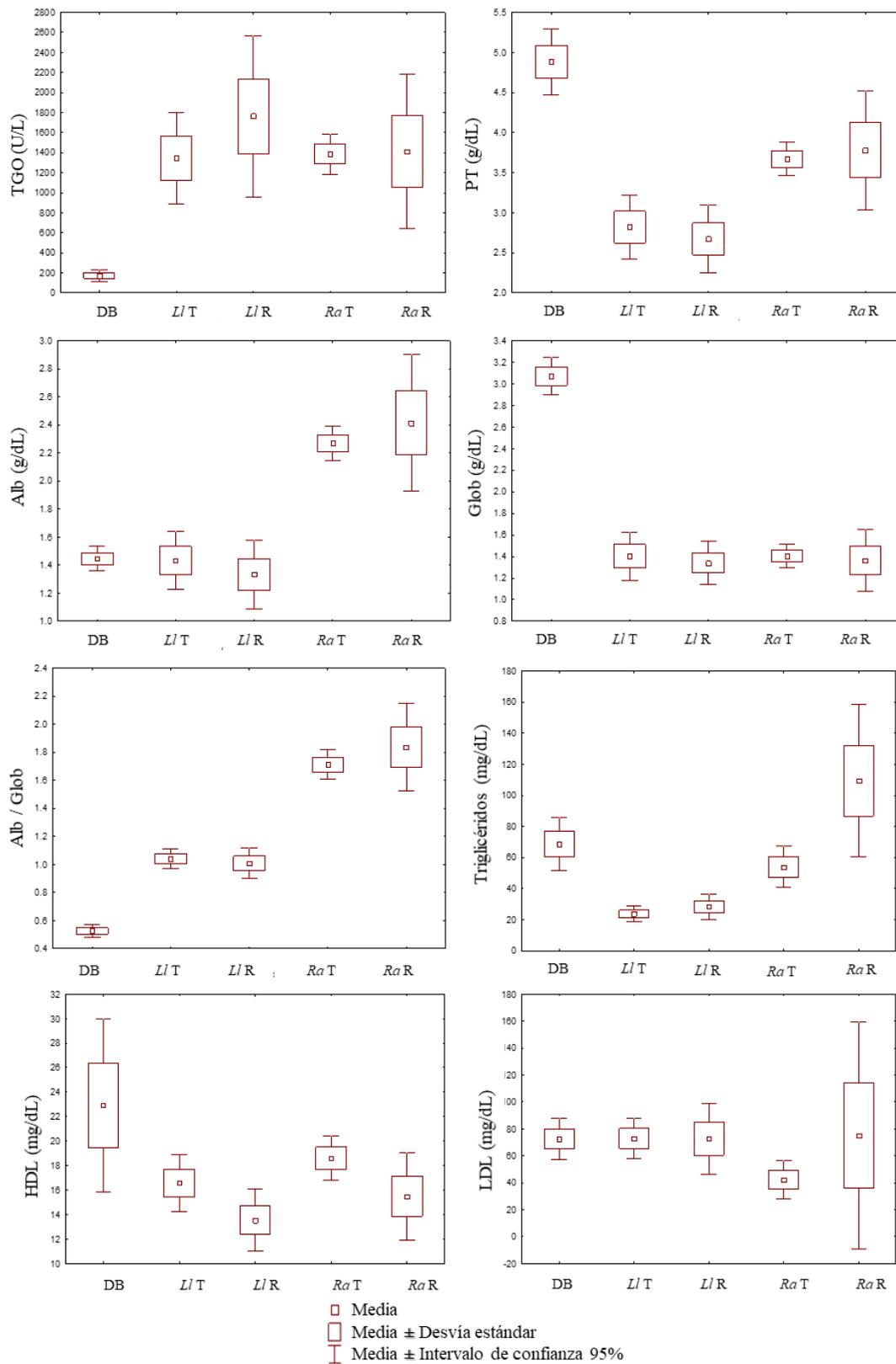


Figura 2.5: Box plot con los intervalos de referencia. DB: datos de la bibliografía. *Ll T*: datos de *L. luctator* de la tesis. *Ll R*: datos de *L. luctator* de sitios de referencia. *Ra T*: datos de *R. arenarum* de la tesis. *Ra R*: datos de *R. arenarum* de sitios de referencia.

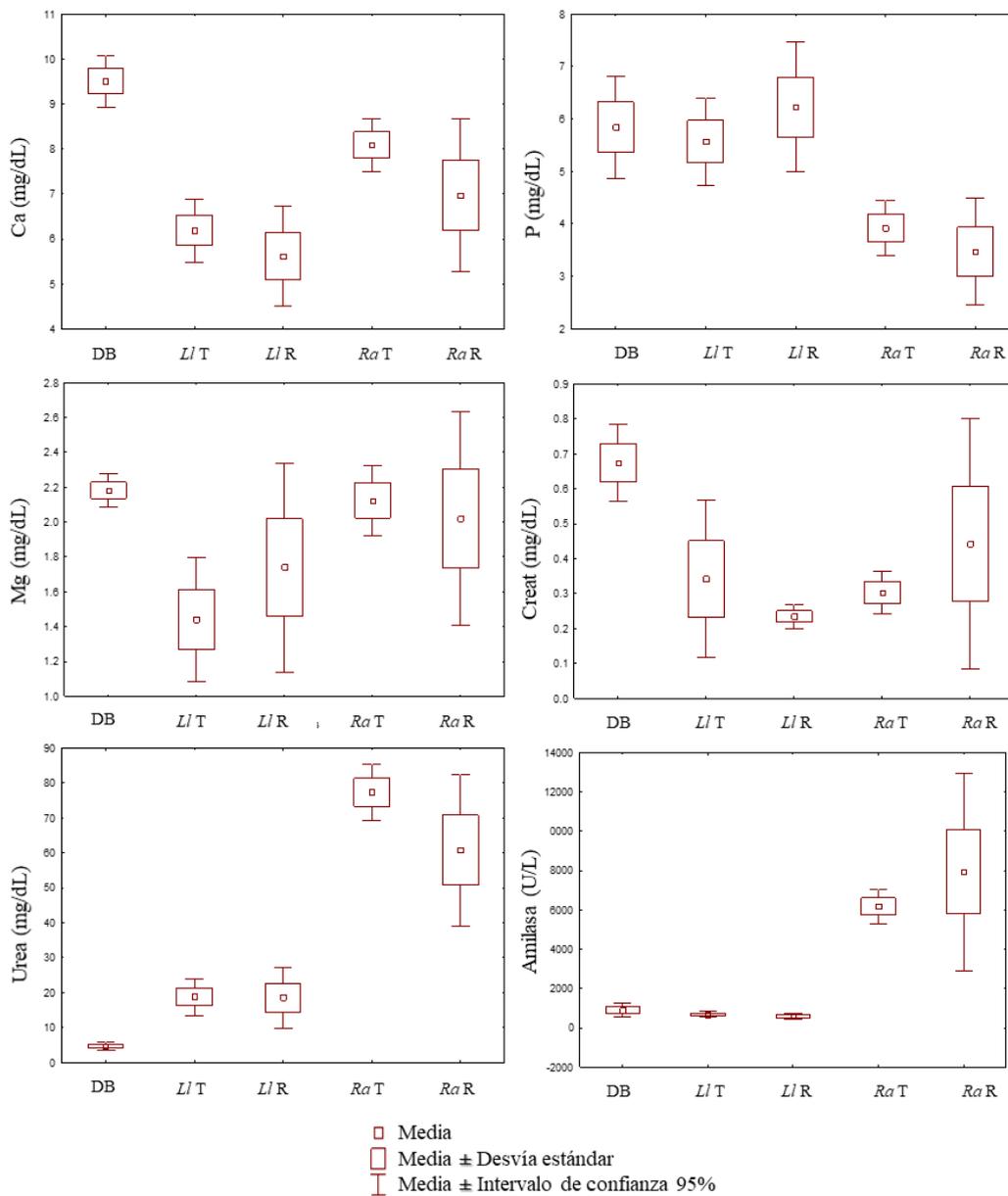


Figura 2.6: Box plot con los intervalos de referencia. DB: datos de la bibliografía. Ll T: datos de *L. luctator* de la tesis. Ll R: datos de *L. luctator* de sitios de referencia. Ra T: datos de *R. arenarum* de la tesis. Ra R: datos de *R. arenarum* de sitios de referencia.

Se puede observar que 19 de los parámetros evaluados tanto en *L. luctator* como en *R. arenarum* provenientes de los sitios de referencia presentan intervalos de referencia diferentes a los que presenta el agrupamiento “bibliografía”. Además, sumado a esos 19 parámetros, *L. luctator* y *R. arenarum* presentan 8 y 5 parámetros más que no coinciden con los intervalos de referencia de la bibliografía, respectivamente. Por otro lado, ambos presentan 3 parámetros que coinciden en una parte de los intervalos de confianza, y

sumado a esos 3 parámetros, *L. luctator* y *R. arenarum* presentan uno y cuatro parámetros que coinciden en parte con los intervalos de confianza de los datos de la bibliografía, respectivamente. Por último, solamente dos parámetros coincidieron totalmente en los intervalos de referencia de *L. luctator* o *R. arenarum* con los valores de la bibliografía (TGP y LDL) mientras que hubo coincidencia entre la bibliografía y *R. arenarum* para Eos y Mg y entre la bibliografía y *L. luctator* para RTT, Alb, P y Ami.

Al comparar los gráficos box plot de *L. luctator* y *R. arenarum* provenientes de los sitios de referencia, se puede observar que, de los 38 parámetros en ambas especies, 21 no coinciden en los intervalos de referencia.

La calificación de los parámetros realizada teniendo en cuenta: 1-la probabilidad de cometer errores en la medición, 2-la dificultad (baja, media, alta) del método, 3-el costo del método (bajo, medio, alto), 4-si requiere sacrificar al animal (si/no), 5-la variabilidad en los agrupamientos propuestos, se resume en la tabla 2.9. Los parámetros están ordenados teniendo en cuenta principalmente la variabilidad, la probabilidad de cometer un error en el momento de realizar la toma de muestra y posterior medición, y si se requiere sacrificar al animal para realizar su medición. En el **anexo 2** se presenta una descripción detallada de estos criterios para cada parámetro clínico evaluado bajo el título “Estudio de la variabilidad. Ventajas y desventajas del uso de los parámetros clínicos propuestos”.

Tabla 2.9: Calificación y ranking de parámetros clínicos según diferentes criterios.

Parámetro	Error	Dificultad	Costo	Sacrificio	Variabilidad
Índice de condición corporal (ICC)	bajo	baja	bajo	no	1
Hematocrito (Hto)	bajo	baja	medio	no	1
Hemoglobina (Hb)	bajo	media	medio	no	1
Índice hepato-somático (IHS)	bajo	baja	bajo	si	1
Recuento total de eritrocitos (RGR)	medio	media	medio	no	1
Volumen corpuscular medio (VCM)	medio	media	medio	no	1
Hemoglobina corpuscular media (HCM)	medio	media	medio	no	1
Fosfatasa alcalina (FA)	medio	baja	medio	no	1
Proteínas totales (PT)	medio	baja	medio	no	1
Albumina (Alb)	medio	baja	medio	no	1
Globulina (Glob)	medio	baja	medio	no	1
Albumina/Globulina (A/G)	medio	baja	medio	no	1
Calcio (Ca)	medio	baja	medio	no	1
Fosforo (P)	medio	baja	medio	no	1
Creatinina (Creat)	medio	baja	medio	no	1
Recuento total de glóbulos blancos (RTGB)	alto	media	medio	no	1

Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)	bajo	media	medio	no	1 o 2
Acetilcolinesterasa en plasma (AChE pl)	medio	media	medio	no	1 o 2
Glutación S-transferasa en plasma (GST pl)	medio	media	medio	no	1 o 2
Creatina fosfocinasa (CPK)	medio	baja	medio	no	1 o 2
Colesterol total (COL)	medio	baja	medio	no	1 o 2
Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	medio	baja	medio	no	1 o 2
Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL)	medio	baja	medio	no	1 o 2
Magnesio (Mg)	medio	baja	medio	no	1 o 2
Amilasa (Ami)	medio	baja	medio	no	1 o 2
Glutación S-transferasa en hígado (GST H)	alto	media	medio	si	1 o 2
Catalasa en hígado (CAT H)	alto	media	medio	si	1 o 2
Acetilcolinesterasa en hígado (AChE H)	alto	media	medio	si	1 o 2
Glutación S-transferasa en riñón (GST R)	alto	media	medio	si	1 o 2
Catalasa en riñón (CAT R)	alto	media	medio	si	1 o 2
Glutación S-transferasa en músculo (GST M)	alto	media	medio	si	1 o 2
Acetilcolinesterasa en músculo (AChE M)	alto	media	medio	si	1 o 2
Lactato deshidrogenasa (LDH)	medio	baja	medio	no	2
Alanina aminotransferasa (TGP)	medio	baja	medio	no	2
Aspartato aminotransferasa (TGO)	medio	baja	medio	no	2
Lipoproteínas de baja densidad (LDL)	medio	baja	medio	no	2
Urea (Ur)	medio	baja	medio	no	2
Neutrófilos/100 leucocitos (Neu)	alto	media	medio	no	2
Recuento total de trombocitos (RTT)	alto	media	medio	no	2
Linfocitos/100 leucocitos (Lin)	alto	media	medio	no	1 o 3
Eosinófilos/100 leucocitos (Eos)	alto	media	medio	no	2 o 3
Monocitos/100 leucocitos (Mon)	alto	media	medio	no	2 o 3
Índice de cuerpos grasos (ICG)	bajo	baja	bajo	si	3
Índice gonadosomático (IGS)	bajo	baja	bajo	si	3
Basófilos/100 leucocitos (Bas)	alto	media	medio	no	3
índice neutrófilos/linfocitos (N:L)	alto	media	medio	no	3
Triglicéridos (TGC)	medio	baja	medio	no	1 2 3

En la columna correspondiente a variabilidad, el 1, 2 y 3 indican si el coeficiente de variación en los agrupamientos es menor al 50%, entre 50 y 100%, o mayor a 100%, respectivamente.

A partir de la tabla 2.9 podemos determinar que 32 de los 47 parámetros clínicos evaluados, presentan una mayor precisión en su medición, presentando coeficientes de variación de categoría 1 o 2 (menor a 50%, y entre 50 y 100%). De esos 32 parámetros, a excepción de las mediciones de la actividad enzimática, todos presentaron probabilidad entre baja y media de cometer error en la obtención de muestras y posterior medición, entre baja y media. Cabe destacar que, para la mayoría de los parámetros clínicos evaluados en la presente tesis, no se requiere el sacrificio del animal.

Influencia del sexo de los individuos sobre la variabilidad

De los 133 individuos de *L. luctator* colectados en sitios de referencia, 59 correspondieron a individuos machos y 74 a individuos hembras. Los parámetros plasmáticos fueron evaluados solamente un año por lo que la cantidad de datos para estos biomarcadores es mucho menor al total de individuos colectados (n=5 para machos y n=10 para hembras). En la tabla 2.10 se presentan los valores de coeficiente de variación correspondientes a los agrupamientos “todos”, “machos” y “hembras” de *L. luctator*. Se observó que los coeficientes de variación presentan valores entre 16,45 y 159,78 para el agrupamiento “todos”; entre 13 y 131,71 para el agrupamiento “machos” y entre 15,23 y 135,04 para el agrupamiento “hembras”.

Tabla 2.10: Coeficientes de variación para los agrupamientos “todos”, “machos” y “hembras” correspondientes a *L. luctator* de sitios de referencia.

Parámetro	Todos	Machos	Hembras
ICC	16.4520	17.1548	15.2350
ICG	31.0067	32.1727	29.8013
IHS	117.1446	101.8748	135.0423
IGS	159.7841	83.4084	91.8488
Hto (%)	27.8892	27.2087	26.2850
RGR (GR/L)	36.3547	36.6846	35.0749
Hb (g/dL)	37.4043	41.0793	31.8022
VCM (fL)	37.1100	33.1968	40.7695
HCM (pg)	32.6852	33.0074	32.4327
CHCM (g/dL)	40.2524	42.7303	37.8004
GST hígado*	52.1606	50.8276	52.8057
CAT hígado*	43.3280	40.7465	44.3186
AChE hígado*	38.9359	39.5783	38.3812
GST riñón*	46.4913	45.5809	47.5690
CAT riñón*	67.7965	62.9420	73.2930
GST músculo*	60.4742	60.1905	61.0473
AChE músculo*	68.6249	69.3240	67.6225
AChE plasma*	44.9534	42.5201	47.8122
GST plasma*	94.3479	91.6058	97.7034
Neu (%)	92.0057	87.0620	95.2424
Eos (%)	115.3495	109.2271	119.3341
Bas (%)	133.4091	131.7177	133.3545
Mon (%)	101.2784	99.9964	102.2582
Lin (%)	18.7654	17.1300	20.3549
N:L	112.3963	96.5710	121.5766
RTGB (GB/1000 GR)	31.8159	31.4379	31.9603
RTT (T/1000 GR)	63.1553	66.6646	59.8154

LDH (U/L)	58.1768	58.5121	53.0532
CPK (U/L)	43.2301	50.7418	34.2709
TGP (U/L)	62.6997	68.3403	52.0671
TGO (U/L)	88.1601	61.3051	85.0036
FA (U/L)	30.1049	25.4816	36.5040
PT (g/dL)	36.9263	44.2330	26.6780
Alb (g/dL)	36.5608	41.1608	31.6432
Glob (g/dL)	40.3712	48.6392	26.3911
A/G	17.5077	13.0051	21.7317
COL (mg/dL)	43.1484	36.9840	50.0407
TGC (mg/dL)	42.9684	48.2863	39.1996
HDL (mg/dL)	36.3300	37.4526	35.8386
LDL (mg/dL)	52.4810	39.9608	64.1457
VLDL (mg/dL)	53.0071	49.3484	54.9216
Ca (mg/dL)	28.6157	22.8808	35.0546
P (mg/dL)	36.7976	48.5184	24.3109
Mg (mg/dL)	62.1485	39.3531	69.8052
Creat (U/L)	25.5489	27.2597	24.2891
Ur (mg/dL)	73.8599	63.4669	87.9943
Ami (U/L)	48.8715	57.1595	40.0814

* expresados en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteínas. GR: glóbulos rojos, GB: glóbulos blancos; T: trombocitos.

Al evaluar la diferencia en la magnitud de la variación de cada parámetro clínico mediante la resta de los coeficientes de variación de cada parámetro entre los agrupamientos “todos” y “machos”; y “todos” y “hembras”, pudimos observar que solamente para 3 de los 47 parámetros clínicos evaluados, se produjo una reducción en variabilidad tanto para machos como para hembras al realizar los agrupamientos (IGS, Hto y TGO).

De los 48 individuos de *R. arenarum* colectados de los sitios de referencia, 34 corresponden a individuos machos y 14 a individuos hembras. Esto, sumado a que en la mayoría de los sitios se colectaron solamente individuos machos, nos llevó a tomar la decisión de abordar el estudio de la presente tesis solamente con individuos machos de *R. arenarum*.

2.3.2 Obtención de valores de referencia para *L. luctator* y *R. arenarum*

Considerando que la variabilidad en los agrupamientos correspondientes a *L. luctator* y *R. arenarum* es menor que en los otros agrupamientos para la mayoría de los parámetros, y que, sumado a esto, los valores de referencia para la mayoría de los parámetros evaluados no coinciden con los valores de referencia de los datos provenientes

de la bibliografía, e incluso existen diferencias entre los valores para ambas especies, en la tabla 2.11 y tabla 2.12 se presentan los intervalos de referencia de cada parámetro evaluado para adultos macho y hembra de *L. luctator* colectados en los sitios de referencia entre los meses de octubre y noviembre, en estado pre-reproductivo, y para machos de *R. arenarum* colectados en el mes de septiembre en periodo reproductivo (canto nupcial), respectivamente, los cuales serán utilizados a lo largo de la tesis para clasificar a los individuos como afectados o normales para cada parámetro y así evaluar el estado de salud de los individuos provenientes de los diferentes sitios afectados por las actividades antrópicas mencionadas en el capítulo 1. Los mismos fueron calculados como intervalo de confianza 95% (media \pm 2 desvíos estándar) si presentaban distribución gaussiana, o mediante el uso de percentiles como límites (percentil 2,5 para límite inferior y percentil 97,5 para límite superior) en los casos de no presentar distribución gaussiana.

Tabla 2.11: Intervalos de referencia de los parámetros evaluados para machos y hembras de *L. luctator* provenientes de sitios de referencia.

Parámetro clínico	<i>L. luctator</i>
Índice de condición corporal (ICC)	0.11 - 0.114
Índice hepatosomático (IHS)	0.02 - 0.023
Índice de cuerpos grasos (ICG)	0 - 0.005
Índice gonadosomático (IGS)	0 - 0.043
Hematocrito (%)	23 - 32
Recuento total de eritrocitos (GR/L)	0.6 - 1.03
Hemoglobina (g/dL)	5.86 - 9.069
Volumen corpuscular medio (fL)	286 - 428.6
Hemoglobina corpuscular media (pg)	69.4 - 107
Concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dL)	25.9 - 29.02
GST hígado*	4.85 - 9.19
CAT hígado*	958 - 1629
AChE hígado*	13.3 - 15.56
GST riñón*	1.67 - 2.49
CAT riñón*	216 - 434.9
GST músculo*	0.02 - 0.05
AChE músculo*	3.31 - 9.85
AChE plasma*	5.14 - 9.97
GST plasma*	0.01 - 0.019
Neutrófilos (%)	3 - 11
Eosinófilos (%)	0 - 2
Basófilos (%)	0 - 4
Monocitos (%)	1 - 3
Linfocitos (%)	80 - 91
Neutrófilos/Linfocitos	0.03 - 0.133

Recuento total de glóbulos blancos (GB/1000 GR)	0.03 - 0.05
Recuento total de trombocitos (T/1000 GR)	0.01 - 0.021
Lactato deshidrogenasa (U/L)	4805 - 9201
Creatina fosfocinasa (U/L)	7290 - 12200
Alanina aminotransferasa (U/L)	11 - 42
Aspartato aminotransferasa (U/L)	727 - 2294
Fosfatasa alcalina (U/L)	707 - 1365
Proteínas totales (g/dL)	2.25 - 3.1
Albúmina (g/dL)	1.09 - 1.58
Globulina (g/dL)	1.14 - 1.54
Albúmina/Globulina	0.9 - 1.12
Colesterol total (mg/dL)	54 - 109
Triglicéridos (mg/dL)	19.5 - 31.11
Lipoproteínas de alta densidad (mg/dL)	11 - 16.05
Lipoproteínas de baja densidad (mg/dL)	43 - 91
Lipoproteína de muy baja densidad (mg/dL)	4 - 7
Calcio (mg/dL)	4.7 - 6.7
Fosforo (mg/dL)	5 - 7.46
Magnesio (mg/dL)	1.3 - 1.6
Creatinina (U/L)	0.19 - 0.26
Urea (mg/dL)	6 - 23
Amilasa (U/L)	459 - 725

* expresados en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteínas. GR: glóbulos rojos, GB: glóbulos blancos; T: trombocitos.

Tabla 2.12: Intervalos de referencia de los parámetros evaluados para *R. arenarum* provenientes de sitios de referencia

Parámetro clínico	<i>R. arenarum</i>	
Indice de condición corporal (ICC)	0.111	0.12
Indice hepatosomático (IHS)	0.031	0.04
Indice de cuerpos grasos (ICG)	0.01	0.04
Indice gonadosomático (IGS)	0.002	0.003
Hematocrito (%)	34	39
Recuento total de eritrocitos (GR/L)	0.46	0.76
Hemoglobina (g/dL)	7.985	9.29
Volumen corpuscular medio (fL)	529.22	682.92
Hemoglobina corpuscular media (pg)	116.5	155.3
Concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dL)	23.12	26.51
Neutrófilos (%)	3	10
Eosinófilos (%)	4	9
Basófilos (%)	0	4
Monocitos (%)	0	2
Linfocitos (%)	79	85
Neutrófilos/Linfocitos	0.033	0.12

Recuento total de glóbulos blancos (GB/1000 GR)	0.02	-	0.03
Recuento total de trombocitos (T/1000 GR)	0.005	-	0.01
Lactato deshidrogenasa (U/L)	1012	-	5033
Creatina fosfocinasa (U/L)	1896	-	4662
Alanina aminotransferasa (U/L)	64	-	175
Aspartato aminotransferasa (U/L)	733	-	2225
Fosfatasa alcalina (U/L)	88	-	171
Proteínas totales (g/dL)	3.26	-	5.16
Albúmina (g/dL)	2.6	-	3.2
Globulina (g/dL)	1.14	-	1.83
Albúmina/Globulina	1.48	-	2.18
Colesterol total (mg/dL)	47	-	82
Triglicéridos (mg/dL)	37	-	172
Lipoproteínas de alta densidad (mg/dL)	10.12	-	18.54
Lipoproteínas de baja densidad (mg/dL)	10	-	47
Lipoproteína de muy baja densidad (mg/dL)	7	-	34
Calcio (mg/dL)	4.1	-	7
Fosforo (mg/dL)	2.02	-	5.28
Magnesio (mg/dL)	1.1	-	2.9
Creatinina (U/L)	0.24	-	0.35
Urea (mg/dL)	29	-	56
Amilasa (U/L)	3354	-	12056

* expresados en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteínas. GR: glóbulos rojos, GB: glóbulos blancos; T: trombocitos.

2.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La interpretación de datos utilizando un intervalo de referencia inadecuado puede llevar a realizar diagnóstico erróneo del estado de salud de los individuos. A menos que un intervalo de referencia sea representativo de los individuos a analizar, y para su determinación se utilicen procedimientos preanalíticos similares y métodos analíticos comparables, no es apropiado como referencia de diagnóstico para la toma de decisiones clínicas (Friedrichs y col., 2012). En este capítulo se presentaron intervalos de referencia para los agrupamientos correspondientes a 1-todos los datos (bibliografía, base de datos del grupo de trabajo y datos de la tesis), 2- datos provenientes de la bibliografía (datos de la bibliografía y los datos obtenidos de la base de datos del grupo de trabajo), 3- datos de individuos de *L. luctator* de la tesis, 4-datos de individuos de *L. luctator* provenientes de los sitios de referencia, 5- datos de individuos de *R. arenarum* de la tesis, y 6- datos de individuos de *R. arenarum* provenientes de los sitios de referencia. Además, se evaluó la influencia del sexo de los individuos en la variabilidad de los datos. A partir de la información generada se puede observar que, tal como lo esperábamos, los intervalos de

referencia difieren para cada agrupamiento, incluso existen diferencias entre los intervalos de referencia correspondientes a los individuos de *L. luctator* y *R. arenarum* provenientes de los sitios de referencia calculados para la presente tesis. Al interpretar los resultados obtenidos de la influencia del sexo de los individuos sobre la variabilidad de los datos, observamos que para *L. luctator*, solamente hubo una disminución de la variabilidad en tres parámetros (IGS, Hto y TGO), lo que nos llevó a generar el intervalo de referencia para *L. luctator* utilizando datos de todos los individuos. Aquí, nosotros generamos un intervalo de referencia para individuos de la misma especie, provenientes de sitios de referencia, aparentemente sanos, que habitan una misma zona geográfica, en el mismo estado reproductivo, y colectados en la misma época del año. Además, mediante un análisis de la variabilidad de datos realizado con los diferentes agrupamientos pudimos demostrar que, si bien la variabilidad de los datos es elevada para todos los agrupamientos, evidentemente disminuye el CV (aumenta la precisión) al utilizar el agrupamiento de individuos de la misma especie provenientes de sitio de referencia para generar el intervalo de referencia, a diferencia de lo que sucede si utilizamos todas las especies de anuros. Esto nos permite demostrar que aumenta la precisión de la medición (disminuye la variabilidad), siendo esta una característica buscada al momento de generar intervalos de referencias, ya que nos indica la capacidad de dar el mismo resultado en mediciones diferentes.

Por lo antes dicho, podemos **concluir que la medición de parámetros en agrupamientos específicos disminuye la variabilidad de los datos, permitiendo generar intervalos de referencia más acotados, lo que permitirá mejorar la precisión al momento de realizar diagnósticos sobre el estado de salud de los individuos.**

Al observar las publicaciones correspondientes a las especies estudiadas en la presente tesis, pudimos observar que para *R. arenarum* existen más trabajos que publican información sobre los parámetros clínicos aquí evaluados en adultos (Chiesa y col., 2003; Rosemberg y col., 2003; Arrieta y col., 2004; Chiesa y col., 2006; Cabagna y col., 2005; Lajmanovich y col., 2008, Gül y Tok, 2009, Cabagna, 2012) que para *L. luctator* (Brodeur y col., 2011; Cabagna, 2012; Damonte, 2019). Esto puede ser debido a que *R. arenarum* presenta una amplia distribución en el territorio argentino, y habita una gran variedad de ambientes. Sin embargo, remarca la importancia de generar información en otras especies.

Como se mencionó en la introducción, se destaca la importancia de realizar estudios integrales para el estudio del estado de salud de los individuos, ya que la salud

es un atributo que se aplica principalmente a los individuos como sistemas integrados y complejos. En esta tesis, se evalúan entre 27 y 47 parámetros para determinar el estado de salud de los individuos, por lo que surgen preguntas como: ¿cuándo consideramos a un individuo enfermo? ¿cuántos parámetros afectados debe tener para considerarlo enfermo? ¿es lo mismo la suma de cualquier parámetro afectado? ¿hay parámetros más informativos que otros? ¿existen variaciones de ciertos parámetros asociadas a ciertas alteraciones ambientales? Queda claro que el abordaje del estudio de la salud es un tema complejo, y que la integración de resultados obtenidos a partir de estudios a diferentes niveles (interdependientes), permitirá una mejor interpretación y comprensión de los resultados (Triquet y col., 2013). Esta discusión de cómo abordar el estudio del estado de salud será un tema recurrente a lo largo de la tesis, e intentaremos brindar herramientas para que al finalizar la misma, podamos responder estas preguntas y construir una herramienta para evaluar el estado de salud de los individuos.

La calificación de los parámetros evaluados permitió distinguir grupos de parámetros que resultan más convenientes y confeccionar una lista de parámetros recomendados para su utilización en el diagnóstico del estado de salud. Teniendo en cuenta la calificación y ranking de los parámetros clínicos según diferentes criterios, podemos distinguir a ICC, Hto, RGR, Hb, VCM, HCM, CHCM, FA, PT, Alb, Glob, A/G, Ca, P, Creat, RTGB, AChE y GST en plasma, CPK, COL, HDL, VLDL, Mg, Ami como los parámetros que presentaron una baja variabilidad, no requieren el sacrificio del individuo, presentan un error de medición bajo-medio, dificultad baja y un costo bajo-medio.

CAPITULO 3: DESARROLLO DE HERRAMIENTA PARA EVALUACIÓN DEL ESTADO DE SALUD DE ANUROS PROVENIENTES DE SITIOS ALTERADOS POR LAS ACTIVIDADES ANTRÓPICAS

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1 Estudios ecotoxicológicos en campo

Desde principios del siglo XIX hasta la actualidad se han registrado alrededor de 183 millones de sustancias orgánicas e inorgánicas (CAS, 2021), por lo que la evaluación de los efectos biológicos que estas pueden tener sobre los ecosistemas, y la población humana plantea un desafío difícil. Como ya se mencionó en la introducción de la tesis, las sustancias ingresan a los ecosistemas mediante fuentes puntuales, mediante lixiviación o escorrentía desde zonas de aplicación de plaguicidas, aguas residuales urbanas o industriales y mediante deposición atmosférica, y según sus propiedades fisicoquímicas y las características del ambiente, interactúan con los diferentes compartimientos (aire, suelo, agua, biota) (Vitousek y col., 1997; Linder y Grillitsch 2000; Hill, 2010). Entre las herramientas utilizadas para evaluar la presencia de contaminantes en el ambiente se encuentran los análisis químicos del agua y el suelo, los cuales son una medición directa de la concentración de contaminantes que presenta un ambiente (Manahan, 2007). Sin embargo, esto no alcanza para predecir el impacto que los componentes que ingresan a los ecosistemas tendrán sobre la biota, ya que los efectos que estos provoquen dependerán no sólo de su concentración, solubilidad, toxicidad, sino también de la biodisponibilidad, duración de la exposición y sensibilidad de los organismos expuestos (Rand y col., 1995). Existen diferentes maneras de evaluar los efectos que las sustancias pueden causar en los organismos (Sparling, 2010; Kokkali y van Delft, 2014; Newman, 2014). Se pueden medir efectos letales y subletales, a corto (agudo) o largo (crónico) plazo, a partir de exposiciones a una o más sustancias en bioensayos de laboratorio o en bioensayos *in-situ*, o a través de mediciones de características en individuos colectados del sitio que se desea estudiar. Generalmente, la utilización de pruebas de laboratorio para medir la toxicidad de los compuestos sobre los organismos se limita a un número reducido de compuestos a utilizar (uno o mezclas de unos pocos) y no tienen en cuenta otros factores estresantes

(físicos, químicos y/o biológicos) a los que los organismos se encuentran expuestos en su hábitat natural. Además, la exposición continua a muestras de agua colectadas en el ambiente o una concentración constante de compuestos individuales no refleja los escenarios de exposición intermitente que comúnmente sucede en entornos naturales por lo que no es posible replicar la complejidad del ambiente en un ensayo de laboratorio (Boone y James, 2005). Si bien la evaluación de los compuestos mediante bioensayos controlados de laboratorio resulta de gran interés al momento de estudiar la toxicidad y el modo de acción de los compuestos, y comprender los efectos que estos generan en diferentes especies, etapas de vida y en diferentes dosis, los entornos de campo son más complejos y dinámicos, e incluyen tanto las interacciones de los individuos con los contaminantes a lo largo de su vida (exposiciones agudas, crónicas e intermitentes) como la influencia de factores intrínsecos y extrínsecos (de origen natural o antrópico). Por lo tanto, evaluar efectos en individuos colectados a campo o expuestos *in situ* resulta más representativo de la problemática ambiental particular, y le da un mayor realismo ecológico al estudio (Bridges y Semlitsch, 2005; Sparling y col., 2010; Connon y col., 2012).

3.1.2 Anfibios como bioindicadores-biomonitores

La ecotoxicología propone el uso de bioindicadores, biomonitores y biomarcadores como herramientas útiles para detectar, cuantificar y monitorear el impacto de factores externos en los ecosistemas (Newman, 2014). A partir del estudio de los cambios producidos en los organismos evaluados, se pueden realizar inferencias sobre procesos, actuales o de la historia reciente, ocurridos en el ambiente estudiado (Newman y Clements, 2008). Como se mencionó en la introducción general, los anfibios son considerados bioindicadores por presentar ciertas características bioecológicas que los hacen sensibles a los cambios en el ambiente (Stebbin y Cohen, 1995). El hecho de presentar un ciclo bifásico, con huevo y larva generalmente en medio acuático y adultos generalmente terrestres con dependencia del agua, genera que los individuos interactúen con diferentes factores de estrés a lo largo de gran parte de su ciclo y que lleguen a estadio adulto atravesando todas las etapas sensibles de su ciclo a partir de exposición a través de numerosas vías (absorción por membrana del huevo; por piel, branquias y alimento en estadio larval, y por piel y alimento en estadio juvenil-adulto) (McDiarmid y Altig, 1999). Por otro lado, se asume que los efectos evaluados en individuos adultos provenientes del campo son producto de la exposición en un escenario real, que incluye tanto las

interacciones de los individuos con los contaminantes a lo largo de gran parte de su ciclo, como la influencia de factores intrínsecos y extrínsecos (de origen natural o antrópico), lo que resulta representativo de la problemática ambiental particular, y por lo tanto le da un mayor realismo ecológico al estudio (Bridges y Semlitsch, 2005). Los factores de estrés afectan a los anfibios a nivel molecular, fisiológico, individual, poblacional y comunidad (Blaustein y col., 2012), por lo que resulta relevante identificar y determinar la influencia y magnitud de los efectos producidos por las amenazas sobre las poblaciones de anfibios a partir de la obtención de datos de campo para evaluar el estado de salud de una población mediante técnicas de biomonitorio y uso de biomarcadores (Egea-Serrano y col., 2012).

3.1.3 Uso de biomarcadores en anuros adultos provenientes del campo

Uno de los principales objetivos de la Ecotoxicología es comprender cómo los factores de estrés afectan la supervivencia de los individuos y así desarrollar medidas adecuadas para prevenir los resultados adversos que estos ocasionan. Generalmente, las concentraciones de los compuestos que existen en el ambiente no suelen provocar efectos letales en los individuos expuestos, sino que provocan efectos subletales, los cuales, de todas maneras, pueden provocar grandes impactos en las poblaciones (Connon y col., 2012). Es por eso que se plantea la necesidad de detectar efectos a niveles de organización inferiores en los organismos expuestos a diferentes factores de estrés antes de que resulte en daños perjudiciales en niveles de organización superiores (Newman, 2014).

Los tipos de respuestas biológicas se pueden medir desde niveles molecular y bioquímico, hasta niveles de población, comunidad, y presentan diferentes grados de relevancia ecológica y toxicológica, y también gradientes en el tiempo de respuesta (corto o largo plazo) (figura 3.1).

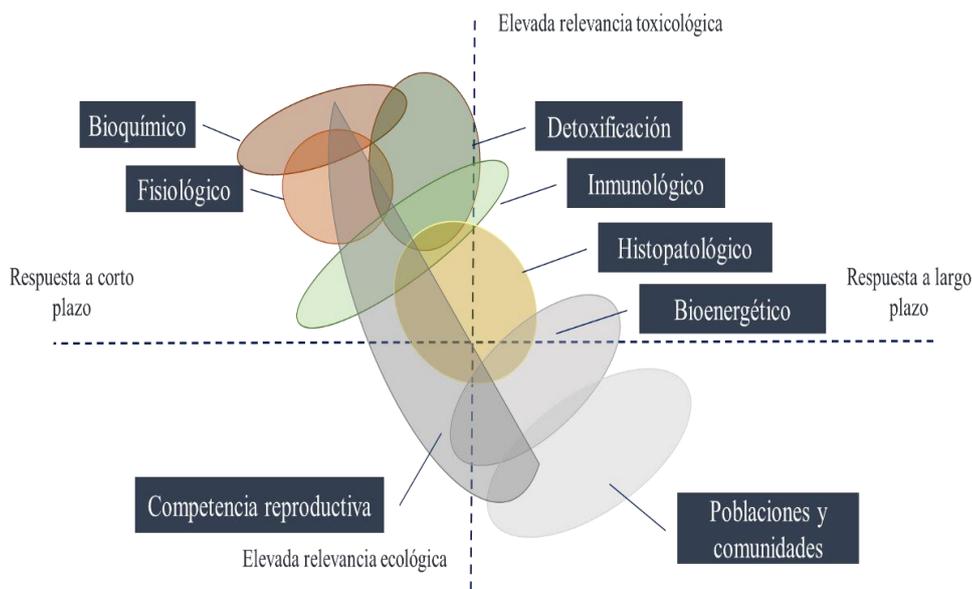


Figura 3.1: Niveles de respuesta biológica. Se muestran gradientes de tiempo de respuesta, y gradientes de relevancia toxicológica y ecológica. Tomado de Adams y col., (1989).

Como ya se mencionó anteriormente un biomarcador es una herramienta para evaluar la exposición o efecto de un factor de estrés. Los biomarcadores pueden indicar que hay suficiente tóxico biodisponible (o un factor de estrés presente durante el tiempo suficiente) para provocar una respuesta o efecto (van der Oost y col., 2003). La evaluación de los cambios en la fisiología de los mecanismos involucrados en el metabolismo, detoxificación y excreción de xenobióticos y la protección inmunológica, proporciona información importante sobre cómo los organismos responden al contacto con los xenobióticos, y como estos afectan el estado de salud de los individuos, y, por lo tanto, pueden ser considerados biomarcadores (Zhelev y col., 2020). En anfibios, la lista de parámetros de respuestas biológicas que puede evaluarse como posibles biomarcadores, es extensa y dependerá principalmente del objetivo de estudio (Sparling y col. 2010). En la presente tesis utilizaremos los términos biomarcadores, parámetros clínicos y parámetros para referirnos a los biomarcadores evaluados.

Biomarcadores a nivel individuo:

Entre los biomarcadores más utilizados en biomonitoreos de anfibios adultos se encuentran los parámetros morfológicos como los índices de condición corporal, índices somáticos, y la frecuencia de anomalías morfológicas. El estudio de estos biomarcadores es importante ya que una alteración en éstos tiene una gran incidencia en la supervivencia de los individuos al alterar el fitness y comprometer diversas funciones

(Lannoo 2008, Egea-Serrano y col. 2012). Además, a pesar de no ser específicos, son fácilmente medibles y calculables, con un bajo costo.

El **índice de condición corporal** es utilizado para estimar el estado fisiológico de un organismo. Es un método de estimación no cruento de la cantidad de reserva energética que posee un individuo y está relacionado con la salud, el vigor y el estado físico (fitness) (Stevenson y Woods 2006; Wilder y col., 2016; Brodeur y col., 2020). Un índice de condición corporal elevado indica que el individuo presenta mayores reservas energéticas disponibles para el crecimiento, mantenimiento y reproducción, probablemente una mayor resistencia al ayuno y a las enfermedades y una mayor probabilidad de supervivencia que aquellos individuos con un bajo índice de condición corporal (Schulte-Hostedde y col., 2005; Gómez-Hoyos y González-Maya, 2014). Se utilizan varios métodos para su cálculo, todos basados en la relación entre la masa corporal y las medidas de longitud (Fulton, 1904; Schulte-Hostedde y col., 2005; Peig y Green, 2009).

Los **índices somáticos** relacionan el peso de un determinado órgano con el tamaño corporal de los individuos. Entre los índices somáticos utilizados se encuentran el índice hepatosomático (**IHS**), gonadosomático (**IGS**) y de cuerpos grasos (**ICG**) que relacionan el peso del hígado, gónadas y cuerpos grasos con el peso de los individuos, respectivamente. Estos índices brindan información sobre la función de los órganos, la dinámica energética, y el estado reproductivo y/o nutricional de los individuos (Martin Diaz y col., 2005; Chaves y col., 2017; Brodeur y col., 2020). La información provista por este índice puede ser utilizada para identificar la exposición a sustancias hepatotóxicas y/o enfermedades hepáticas (Schlenk y col., 2008). El hígado es un órgano detoxificador, por lo que un aumento en su tamaño puede significar una adaptación relacionada con un aumento en la metabolización de un contaminante (van der Oost y col., 2003; Thammachoti, 2012). Sin embargo, existen estudios que sustentan la disminución del IHS en organismos expuestos a ciertos contaminantes (van der Oost y col., 2003), e incluso en organismos con agotamiento de reservas (Goede y Barton; 1990). El índice gonadosomático, nos brinda información sobre el estado reproductivo de los individuos. En anfibios, hay que tener en cuenta que varía estacionalmente. En época reproductiva se produce un aumento del peso de las gónadas debido a la maduración gonadal, mientras que luego del desove, el peso de las gónadas disminuye (Htun-Han, 1978). El índice de cuerpos grasos es otro indicador de la cantidad de reserva energética de un individuo, y un aumento en este puede tener relación con la actividad reproductiva que demanda mucha energía (Quiroga y Sanabria, 2012).

Por último, las **anormalidades morfológicas** generalmente se producen por alteraciones en las primeras etapas de desarrollo de los anfibios (embrión, larva), con efectos en la vida adulta de los individuos, por lo que han sido muy utilizadas para evaluar influencia de diferentes actividades antrópicas en diferentes etapas del desarrollo (embrión, larva y adultos). Su presencia resulta relevante ya que es evidencia directa de un daño, y, dependiendo de su gravedad, influirá negativamente en el desarrollo y comportamiento de los individuos (Sparling y col., 2010).

Entre las investigaciones que evalúan efectos de contaminantes empleando estos parámetros a nivel individual se encuentran Porter y Janz (2003), Stolyar y col. (2008), Agostini y col. (2010), Brodeur y col. (2011), Agostini y col. (2013), Jelodar y Fazli (2013), Zhelev y col. (2015), Guerra y Aráoz (2016), Peluso y col. (2020).

Biomarcadores a nivel sanguíneo:

La sangre es el fluido corporal que transporta nutrientes y gases respiratorios a las células de los tejidos y transporta los productos de desecho de las células a los órganos excretores para su eliminación. Está compuesta por una parte líquida, el plasma, y una sólida que incluye eritrocitos, leucocitos y plaquetas (Arikan y Çiçek, 2010).

La evaluación de los cambios producidos en estos niveles en individuos expuestos a los factores estresantes, brindan información valiosa sobre su estado de salud, y el hecho de no tener que sacrificar a los organismos para la toma de muestras resulta de gran importancia a la hora de realizar monitoreos ambientales, favoreciendo la incorporación de estos parámetros en la evaluación de especies en peligro de extinción, y en programas de muestreo-remuestreo (Davis y col., 2008; Zhelev y col., 2015; Forzán y col., 2017).

El hematocrito, recuento de glóbulos rojos y la concentración de hemoglobina proporcionan información sobre los eritrocitos y nos indican principalmente si un individuo está anémico (valores por debajo de lo normal) o presenta policitemia (valores por encima de lo normal). El **hematocrito**, generalmente expresado en porcentaje, constituye la fracción de sangre ocupada por los glóbulos rojos, sin incluir los leucocitos ni los trombocitos (Lassen y Weiser, 2004). El **recuento de glóbulos rojos** representa la cantidad de glóbulos rojos por unidad de volumen de sangre (Allender y col., 2008). La **hemoglobina** constituye uno de los componentes más importantes de los glóbulos rojos ya que presenta capacidad de fijar en forma reversible el oxígeno, y realizar su transporte para la oxigenación de los tejidos (Thrall, 2012). La concentración de hemoglobina

representa la cantidad de hemoglobina en un volumen determinado de sangre y se expresa como gramo por decilitro (g/dl) o gramo por litro (g/l).

A partir de estos tres parámetros, se pueden calcular tres índices eritrocitarios, y el cambio en los valores de estos índices brindan información sobre el estado anémico de los individuos (Harrison y col., 2016). El **volumen corpuscular medio** (VCM) se calcula a partir de Hto y RGR, es una medida del tamaño de los eritrocitos y representa el volumen de un solo eritrocito. A partir de este parámetro se define el tamaño de los eritrocitos como normocitos (normales), macrocitos (grandes), y microcitos (pequeños). La **hemoglobina corpuscular media** (HCM) se calcula a partir de RGR y Hb e indica la concentración promedio de hemoglobina en cada eritrocito. Por último, la **concentración media de hemoglobina corpuscular** (CHCM), se calcula a partir de Hto y Hb y representa una medida de la concentración de Hb en un volumen dado de eritrocitos (no en volumen de sangre completa) y define los conceptos de hipocromía (baja), normocromía (normal) e hipercromía (alta) (Allender y col., 2008).

Entre las investigaciones que aportan información sobre los efectos que causa la exposición a los contaminantes empleando biomarcadores sanguíneos se encuentran Cabagna y col., (2005), Chiesa y col., (2006), Ilizaliturri-Hernández y col., (2013), Zhelev y col., (2013), Carvalho y col., (2017), Zhelev y col., (2018).

Biomarcadores a nivel inmunológico

El sistema inmune es un mecanismo desarrollado por los seres vivos para proteger a los organismos de agentes infecciosos como las bacterias, virus, hongos, parásitos y de otros efectos nocivos causados por estresores químicos y físicos (Calder, 2007). Su función principal es combatir estos agentes extraños y mantener la integridad de los tejidos. Está formado por un conjunto de órganos, tejidos, células y moléculas, que elaboran una respuesta rápida y coordinada para diferenciar lo no propio de lo propio y eliminarlo (respuesta inmune) (Calder, 2007). El sistema inmune es muy sensible a la exposición a factores estresantes ya que es uno de los primeros sistemas que se moviliza y responde frente a las amenazas, por lo que la utilización de ciertos parámetros involucrados en la respuesta inmune resulta de gran interés para evaluar el estado de salud de los organismos expuestos a diferentes factores de estrés (van der Oost y col., 2003; Davis y col., 2008).

Los glóbulos blancos son parte importante del sistema inmune, se originan en la médula ósea y bazo, y llevan a cabo tareas de detección de agentes patógenos y su

eliminación mediante fagocitosis o mediante inducción de producción de anticuerpos (Song y col., 2000). La interpretación de las concentraciones de glóbulos blancos en sangre proporciona información sobre los procesos fisiológicos o enfermedades que pueden estar ocurriendo en los organismos, y permite dar indicios del proceso patológico que está ocurriendo, brindando información importante para la realización de un diagnóstico (Thrall, 2012).

Los parámetros de la respuesta inmune estudiados en la presente tesis incluyen el recuento total de leucocitos y trombocitos, el recuento diferencia de leucocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos) y el índice N:L que relaciona neutrófilos y linfocitos.

El **recuento total de leucocitos** comprende el número total de leucocitos de cualquier tipo sobre cierta unidad. El recuento diferencial de glóbulos blancos proporciona información sobre la cantidad relativa de los diferentes tipos de leucocitos (**neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos, monocitos**), por lo que el aumento o disminución de alguno de ellos puede estar asociado a enfermedades o procesos como inflamaciones e infecciones (Campuzano Maya, 2007). El índice **N:L**, es un indicador de estrés en los individuos ya que está relacionado con la presencia de glucocorticoides en plasma (Davis y col., 2008). Por último, el **recuento total de trombocitos** comprende el número total de trombocitos sobre cierta unidad. Los trombocitos juegan un papel activo en la formación del trombo, coagulación sanguínea y cicatrización de heridas (Allender & Fry, 2008). Además, se ha estudiado que tienen la habilidad de fagocitar material extraño y son capaces de llevar oxígeno si una condición anémica extrema así lo exige (Galvez Martinez, 2009).

Entre las investigaciones que evalúan efectos de contaminantes empleando estos parámetros a nivel inmunológico se encuentran Barni y col. (2007), Zhelev (2007), Davis y col. (2008), Attademo y col. (2014), Zhelev y col. (2015), Shutler y Marcogliese (2011), Salinas y col. (2015), Medina y col. (2016), Zhelev y col. (2020).

Biomarcadores a nivel bioquímico

Según Newman (2014), todos los efectos tóxicos comienzan con el tóxico interactuando con las biomoléculas, con la consecuente cascada a través de los niveles superiores (subcelular, celular, tejido, órgano, individuo, población, etc), por lo que los parámetros a nivel bioquímico han sido ampliamente estudiados con el objetivo de

proporcionar información para explicar la causa de los efectos observados en los niveles superiores.

En la presente tesis se evalúan parámetros bioquímicos como la actividad de las enzimas **glutación-S-transferasa (GST)**, **catalasa (CAT)** y de la **acetilcolinesterasa (AChE)**. La GST pertenece a una super-familia multigénica de enzimas multifuncionales (Van der Oost y col., 2003). Es una de las enzimas que provee protección celular contra los efectos tóxicos de los compuestos endógenos y exógenos a partir del proceso de biotransformación. La biotransformación es un proceso que se divide en dos subsistemas: fase I y fase II. En la fase I, participa el sistema de monoxigenasa dependiente del citocromo P450, que oxida a los xenobióticos lipofílicos, produciendo metabolitos electrofílicos. En el sistema de fase II, la GST es una de las enzimas que cataliza el ataque nucleofílico del glutación reducido a sustratos electrofílicos (xenobióticos y otros), convirtiéndolos en un compuesto polar y disminuyendo así su reactividad con las macromoléculas celulares y facilitando además su excreción por vía biliar o renal (Hayes & Pulford, 1995; van der Oost y col., 2003; Pesce, 2008). La actividad de GST se puede inducir o inhibir según la intensidad y duración del estrés aplicado (Ballesteros y col., 2009). Su inducción implica la activación de los sistemas de detoxificación en presencia de una sustancia tóxica. Mientras que la inhibición de su actividad podría ser explicada por la competencia por los sitios activos de la enzima de los metabolitos generados en la fase I de biotransformación con los sustratos de GST (Egaas y col., 1999) o por una disminución en la síntesis de proteínas a nivel molecular (Gallagher y Sheehy, 2000).

Catalasa (CAT) es una enzima que se encuentra presente en todos los órganos, pero en mayor concentración en el hígado, y su localización en la célula son los peroxisomas (Halliwell y Gutteridge, 2007). Participa en la detoxificación de especies reactivas del oxígeno (ERO), siendo parte del sistema de defensa antioxidante de los organismos aerobios para resistir el estrés oxidativo causado por exceso de radicales libres como radical superóxido (O_2^-), radical hidroxilo ($OH\bullet$), y por el peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Un radical libre es cualquier especie química que posee uno o más electrones desapareados lo que los hace altamente reactivos, pudiendo reaccionar indiscriminadamente con constituyentes celulares como las membranas lipídicas, proteínas, y ADN (Newman y Unger, 2003; Halliwell y Gutteridge, 2007). El estrés oxidativo se produce cuando existe un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la defensa antioxidante del cuerpo y se produce daño oxidativo a las proteínas, lípidos y ADN, lo que trae como consecuencia citotoxicidad, genotoxicidad e incluso

carcinogénesis cuando las células dañadas (mutadas) pueden proliferar. La función antioxidante de la enzima catalasa consiste en degradar al peróxido de hidrógeno (un precursor de radicales libres) en agua y oxígeno, los cuales son inofensivos para el organismo. Entre los factores que causan estrés oxidativo se encuentran la presencia de xenobióticos y la activación del sistema inmunológico en respuesta a los microorganismos invasores (inflamación) (Abdollahi y col., 2004; Francois Gagne, 2014).

El hígado y los riñones suelen ser órganos diana para los contaminantes ambientales debido a su función detoxificante y su participación en la homeostasis, por lo que la evaluación de la actividad enzimática en dichos órganos brindará información valiosa en el estudio de los procesos que ocurren en individuos expuestos a contaminantes ambientales (Marques y col. 2009).

La enzima acetilcolinesterasa se encuentra en el sistema nervioso, en la hendidura sináptica, y juega un papel importante en la sinapsis colinérgica y placas musculares ya que cataliza la hidrólisis de la acetilcolina (Reigart y col., 1999). La acetilcolina es un neurotransmisor liberado por la neurona presináptica para unirse a un receptor de la neurona postsináptica o en la placa muscular, para transmitir un impulso, y luego se hidroliza a colina y ácido acético. Una inhibición de esta enzima genera una acumulación de acetilcolina en la hendidura sináptica, alterando el normal funcionamiento del sistema nervioso (Lionetto y col., 2013). Muchos insecticidas (organofosforados, carbamatos) fueron diseñados para la inhibición de la actividad de esta enzima, provocando la acumulación de acetilcolina en la hendidura sináptica, con la posterior muerte de los organismos blanco.

Entre las investigaciones que evalúan efectos de contaminantes empleando estos parámetros a nivel bioquímico se encuentran Brodeur y col. (2011), Lascano y col. (2011), Ferrari y col. (2011), Attademo y col. (2014), Mardirosian y col. (2015); Mardirosian y col. (2017), Barreto y col. (2020).

Biomarcadores a nivel genético

Se define a la genotoxicidad como el daño producido por un agente físico o químico sobre el material genético alterando su estructura normal (Newman, 2014). Entre los biomarcadores a nivel genético más utilizados se encuentra la presencia de **micronúcleos** y las **anormalidades nucleares** los cuales son indicadores indirectos de

daño cromosómico que demuestra un defecto en la capacidad de la célula para dividirse correctamente (Newman 2014). Estos biomarcadores han sido ampliamente utilizados debido a que es un proceso sencillo, de bajo costo, puede realizarse en cualquier tejido que se divida y permite evaluar de manera simultánea la inestabilidad cromosómica, el estatus mitótico y la viabilidad celular en una misma célula (Fenech 2007). Existen numerosas investigaciones que evalúan efectos de contaminantes empleando estos parámetros a nivel genético, como por ejemplo Lajmanovich y col. (2005), Vera Candioti y col. (2010), Ruiz de Arcaute y col. (2014), Pérez-Iglesias y col. (2014).

Biomarcadores a nivel plasmáticos

(Estos biomarcadores serán evaluados en el próximo capítulo)

3.1.4 Integración de biomarcadores de diferentes niveles

Según la teoría presentada anteriormente, se puede decir que la exposición de los organismos a factores estresantes puede interferir en diferentes procesos que ocurren a diferentes niveles, por lo que el uso y la interpretación de los parámetros aquí mencionados resultan útiles para aplicar en estrategias de biomonitorio y evaluación de sitios afectados por diferentes factores (contaminación, transformación del hábitat, etc) (van der Oost y col., 2003). El estudio de los biomarcadores a niveles inferiores (bioquímico, por ejemplo) puede proporcionar información sobre efectos potencialmente nocivos sobre los individuos (Moore y col., 2006), pero su estudio de manera independiente tiene ciertas limitaciones al momento de realizar inferencias sobre niveles de mayor relevancia ecológica (poblaciones y comunidades) (Cairns, 1996; Francois Gagne, 2014). Es por esto que la realización de estudios integrales constituye una buena herramienta para establecer vínculos causales entre los diferentes niveles de organización y así demostrar la relevancia ecológica que presentan las respuestas observadas a niveles inferiores (Clements, 2000).

La utilización de una batería de biomarcadores de diversos campos de investigación y su estudio en un marco integrado es muy prometedora para avanzar en la comprensión de los efectos ambientales en la salud animal (Warne y col., 2015). Se han identificado numerosos biomarcadores para evaluar los procesos que ocurren en los organismos a diferentes niveles (procesos endocrinos, inmunes, nutricionales, metabólicos, conductuales), los cuales son componentes interdependientes de las redes fisiológicas, por lo que una vez más, es necesario un enfoque integrador para contextualizar e interpretar la relevancia de cualquier perfil de biomarcadores dado

(Martin y col., 2011; Cohen y col., 2012; Milot y col., 2014). Los estudios integrales permiten mejorar la interpretación de la respuesta observada entre varios biomarcadores para entender las relaciones que existen entre éstos y los diferentes niveles, lo que llevará a identificar y cuantificar los efectos de los factores de estrés e inferir de manera relevante sobre el estado general de los individuos que habitan los sitios de interés, además de permitir contextualizar e interpretar los resultados en un marco teórico más amplio (Forbes y col., 2006; Moore y col., 2013).

3.1.5 Camino al desarrollo de un índice de salud

A medida que aumenta el nivel de complejidad biológica, aumenta la relevancia ecológica del efecto observado, pero disminuye la capacidad de respuesta inmediata, la detectabilidad (alerta temprana) y la comprensión mecanicista del efecto observado. La evaluación del estado de salud de los individuos a partir de un enfoque integral resulta una herramienta valiosa ya que involucra el estudio de biomarcadores a diferentes niveles, determina relaciones entre los parámetros y los niveles, establece la contribución de cada parámetro al estado de salud, y permite contextualizar e interpretar los resultados en un marco teórico más amplio (Thain y col., 2008; Moore y col., 2013). Es así que a partir de esta herramienta se han desarrollado índices capaces de detectar y monitorear la salud de los organismos. Los índices desarrollados se basan en diferentes enfoques, pero todos integran los datos de las respuestas de biomarcadores desencadenadas por diferentes factores estresantes, relacionan diferentes biomarcadores y niveles e intentan detectar efectos a medida que el estrés aumenta (Beliaeff y Burgeot, 2002; Broeg y Lehtonen, 2005; Dagnino y col., 2007). Además, tienen en cuenta el significado biológico de las respuestas de los biomarcadores en los organismos estudiados para realizar una interpretación correcta de los resultados complejos (Moore y Viarengo 1987, Hyne y Maher 2003). Por último, la importancia de desarrollar un índice que integre la información radica en que puede proporcionar una síntesis gráfica o un único valor numérico que integran las respuestas de los diferentes biomarcadores (generalmente de interpretaciones complejas que requieren de conocimiento y experiencia en el campo de investigación específico), siendo de gran utilidad en la comunicación de los resultados a personas vinculadas con la gestión ambiental y otras partes interesadas en la toma de decisiones (Leonard 2002, Handy y col., 2003).

3.1.6 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Existe una influencia de los diferentes sitios de estudio (sitios de referencia, industria petroquímica, descargas cloacales y agricultura) sobre los parámetros clínicos evaluados.

Existen parámetros clínicos que varían de manera específica para cada problemática evaluada.

Existen relaciones entre los parámetros clínicos y entre los diferentes niveles evaluados.

Existe una influencia de los diferentes sitios de estudio (sitios de referencia, industria petroquímica, descargas cloacales y agricultura) sobre el estado de salud de los individuos de *Leptodactylus luctator* que habitan dichos sitios.

Los parámetros clínicos permiten detectar diferencias entre las problemáticas evaluadas

Es posible la construcción de un índice de salud a partir de la información obtenida.

Objetivos

1. Evaluar la influencia de los diferentes sitios de estudio (sitios de referencia, cinturón florihortícola, industria petroquímica y descargas cloacales) sobre los parámetros clínicos evaluados
2. Evaluar en qué magnitud influyen los sitios estudiados sobre los parámetros clínicos evaluados
3. Evaluar si existen parámetros clínicos que varían de manera específica en cada sitio, y cuáles
4. Realizar un estudio integral de los parámetros clínicos evaluados
5. Detectar si existen relaciones entre los diferentes parámetros clínicos y entre los parámetros pertenecientes a los diferentes niveles (individuo, sanguíneo,

inmunológico, bioquímico, plasmático) y cómo se relacionan bajo la influencia de los sitios estudiados

6. Evaluar el estado de salud de individuos provenientes de los diferentes sitios de estudio (sitios de referencia, cinturón florihortícola, industria petroquímica y descargas cloacales)
7. Seleccionar los parámetros clínicos que permiten detectar diferencias entre los sitios estudiados
8. Construir un índice de salud a partir de la información obtenida para ser utilizado en anuros
9. Proponer una herramienta a ser utilizada para la evaluación del estado de salud de anuros provenientes de sitios afectados para las actividades antrópicas

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de cumplir los objetivos propuestos en el presente capítulo, se siguió el esquema presentado a continuación (figura 3.2):

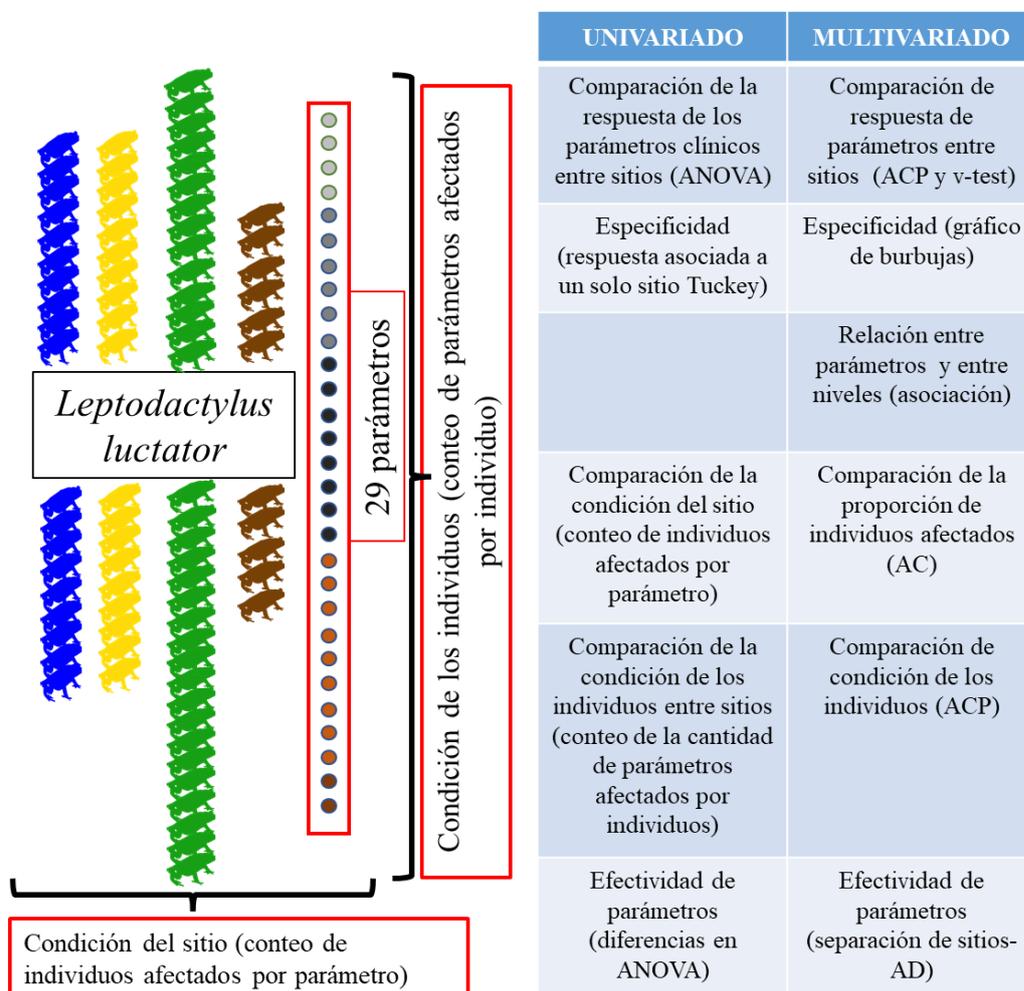


Figura 3.2: Esquema de metodología del capítulo. ACP: análisis de componentes principales. AC: análisis de contingencia. AD: análisis discriminante. : cinturón florihortícola. : industria petroquímica. : sitio de referencia. : descargas cloacales. : parámetros a nivel individual. : parámetros a nivel sanguíneo. : parámetros a nivel inmunológico. : parámetros a nivel bioquímico. : parámetros a nivel genético.

3.2.1 Sitios de muestreo y colecta de individuos:

Durante las noches de los meses de octubre-noviembre del año 2016, se llevaron a cabo campañas de muestreo en diferentes sitios de estudio, cada uno de ellos situado en alguna de las problemáticas ambientales estudiadas en la presente tesis (cinturón florihortícola, industria petroquímica, descargas cloacales, y sitios de referencia) (figura 3.3). En los sitios donde se detectó su presencia, se capturaron individuos adultos de *Leptodactylus luctator* de manera manual, se colocaron en bolsas de polietileno con agua del lugar de captura y fueron trasladados al laboratorio, donde al día siguiente se procedió

a realizar la toma de muestras. Para la colección de individuos se contó con los permisos correspondientes a Dirección de Flora y Fauna de la Provincia de Buenos Aires (Exp. 22500-41820/17 - Disposición 73 y Exp. EX-2019-37803203 - Disposición número DI-2019-101-GDEBA-DFYFMAGP).

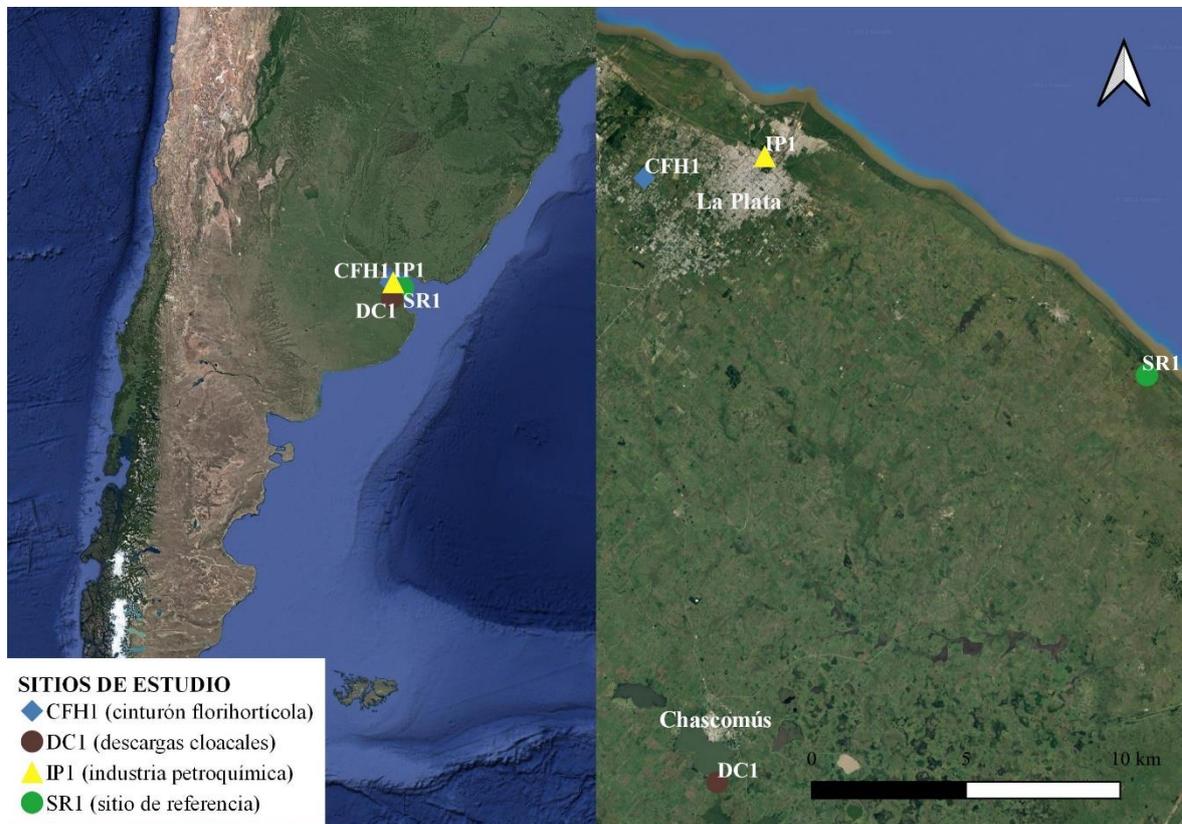


Figura 3.3: Mapa de los sitios de muestreo correspondientes a cinturón florihortícola (CFH1), descargas cloacales (DC1), industria petroquímica (IP1) y sitio de referencia (SR1).

3.2.2 Obtención de muestras biológicas y medición de biomarcadores:

Como parte de la herramienta propuesta, se llevó a cabo un protocolo (el cual será presentado y puesto a prueba posteriormente) teniendo en cuenta la bibliografía consultada al momento de comenzar la tesis (Wright y col., 2001; Allender y col. 2008; Heatley y col., 2009), aprendiendo y poniendo a punto técnicas de obtención y procesamiento de las diferentes muestras requeridas para la posterior medición de los diferentes parámetros clínicos evaluados.

Los individuos fueron anestesiados individualmente sumergiéndolos en una solución de 2 g de metanosulfonato de triclaína (MS 222)/L de agua con 2 g de bicarbonato de sodio para neutralizar el ácido del MS 222, durante 15 minutos (Wright y col., 2001; Lalonde-Robert y col., 2012). Una vez que los individuos fueron anestesiados, se tomaron

fotografías dorsales y ventrales con referencia de hoja milimetrada, se pesaron con balanza digital de 0,001 g de precisión, y se midieron con calibre digital de 0,01 mm de precisión para determinar la longitud hocico cloaca (LHC); además se examinaron en detalle en búsqueda de presencia de parásitos externos, anormalidades morfológicas externas y caracteres sexuales secundarios, entre otras características llamativas. Luego se procedió a realizar la disección de los individuos siguiendo protocolos previamente publicados (Wright, 2001; Pessier y col., 2003; Campbell, 2015). Se realizó un corte ventral desde la cloaca hasta la región intermandibular, exponiendo la musculatura la cual fue cortada por la línea media teniendo cuidado de no dañar los órganos. Se obtuvo sangre directamente del corazón latiendo mediante capilares heparinizados los que se vaciaron en un eppendorf heparinizado, y se realizaron frotis para la posterior evaluación de parámetros sanguíneos e inmunológicos. El resto de la sangre obtenida fue centrifugada durante 5 min para obtención de plasma, del cual una parte fue conservada en eppendorf a -80°C para posteriores análisis de parámetros bioquímicos. Posteriormente se realizó una prospección interna detallada en búsqueda de parásitos, anormalidades morfológicas en los órganos y estructuras internas, y se examinaron las gónadas para el sexado final del individuo. Finalmente se extrajeron los órganos (hígado, vesícula biliar, estómago, intestino, gónadas, riñones, cuerpos grasos), nervios y el paquete muscular del fémur derecho. El hígado, gónadas, y cuerpos grasos se pesaron con balanza de 0,001 gramos de precisión para el cálculo de diferentes índices; mientras que las muestras de hígado, riñón y músculo fueron conservadas en eppendorf a -80°C para posteriores análisis de parámetros bioquímicos. De cada órgano además se tomó una muestra de 0,5 gramos para análisis histológicos y 0,5 gramos para análisis de residuos, las cuales fueron guardadas en eppendorf con solución de Karnovsky y en bolsa en freezer -80°C, respectivamente. Si bien el análisis de estas muestras no entra en el presente trabajo de tesis, este procedimiento se llevó a cabo para aprovechar la mayor cantidad de muestras y obtener la máxima información de cada individuo procesado. La totalidad de los procedimientos con animales se realizaron con el aval del Comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL - protocolo número 023-22-15).

Parámetros sanguíneos:

Los parámetros sanguíneos evaluados fueron el hematocrito (Hto), el recuento de glóbulos rojos (RGR), y la hemoglobina (Hb). Además, se calcularon los siguientes índices sanguíneos: el volumen corpuscular medio (VCM), la hemoglobina corpuscular

media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), siguiendo protocolo descrito por Brodeur y col., (2020). Para el cálculo del hematocrito, se tomaron entre 50 y 80 μl de sangre mediante capilares heparinizados, los cuales fueron sellados y llevados a la centrífuga de microhematocrito a 15000 rpm durante 5 minutos, para posterior lectura utilizando tabla para hematocrito (figura 3.4).

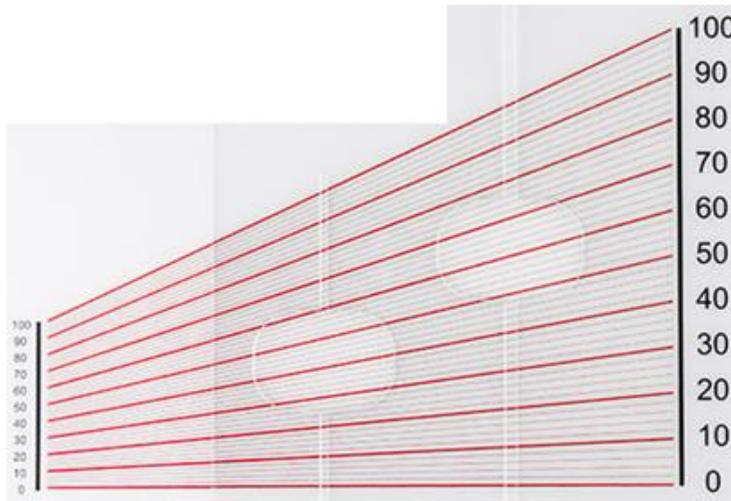


Figura 3.4: Tabla para medir hematocrito.

Para el cálculo de RGR, se siguió el método de Natt & Herrick (1952). Se diluyeron 10 μl de sangre en 2 ml de solución Natt Herrick's, de los cuales, se colocaron 10 μl en cámara de Neubauer para conteo de glóbulos rojos (GR) en microscopio con aumento 40x. Se dejó reposar la muestra durante 5 minutos para que sedimenten las células, y luego se procedió a la observación y conteo de GR utilizando el cuadrado central de la cámara, que presenta 25 cuadrados. El conteo se realizó en los cuatro cuadrados de las esquinas y en el cuadrado central (figura 3.5). Cada cuadrado posee un área de $0,04 \text{ mm}^2$ y la profundidad de la cámara es de 0,1 mm; por lo tanto, se calculó el volumen de sangre al que correspondía el número de GR contados de la siguiente manera: $0,04 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} \times 5 = 0,02 \text{ mm}^3$ (0,02 μl). Los datos de RGR se expresaron en n° de GR/L, por lo que teniendo en cuenta el factor de dilución y la transformación de la unidad de volumen a litros, se realizó la siguiente cuenta para obtener el valor final:

$$\text{n}^\circ \text{ GR/L} = (\text{n}^\circ \text{ GR contados} / 0,02) * 200 * 1000000$$

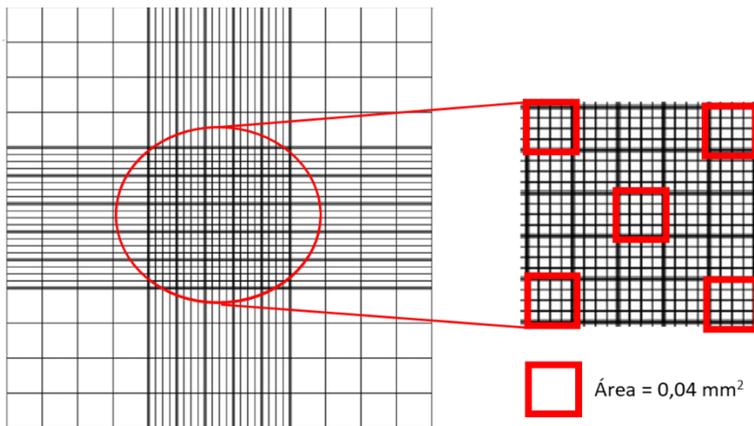


Figura 3.5: Detalle de la cámara de Neubauer donde se realizó el conteo de glóbulos rojos.

Para determinar la concentración de Hb, se diluyeron 10 μl de sangre en 2 ml de solución de Drabkin. La concentración de hemoglobina fue determinada utilizando el método de cianmetahemoglobina (Drabkin and Austin, 1935). Previo a la medición, todas las muestras se centrifugaron durante 5 min a 5000 rpm para lisar las células y eliminar los restos celulares y núcleos. Además, se prepararon soluciones de 0 a 0,12 g/dL de hemoglobina a partir de una solución madre de concentración conocida (standard Wiener 14,5 g/dL) para realizar una curva de calibración. Se colocaron 300 μl de cada muestra en la microplaca, y se midieron las absorbancias a 540 nm en lector de microplacas UV-visible modelo SPECTRO star nano marca BMG. Con los datos de la curva de calibración, se graficó la concentración (y) en función de la absorbancia (x), y se obtuvo la ecuación de la misma. Finalmente, con el valor de absorbancia de cada muestra, se calculó la concentración utilizando la ecuación de la recta. Para obtener el valor de concentración final, se multiplicó la concentración obtenida por 200 (factor de dilución).

El estudio de hematocrito, recuento de glóbulos rojos y hemoglobina se realizó por duplicado. A partir de estos datos se calcularon tres índices sanguíneos: volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración de hemoglobina corpuscular media (Ver sección tratamiento de los datos).

Parámetros inmunológicos:

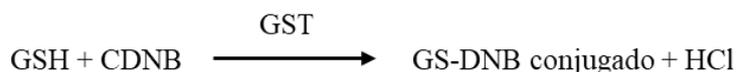
Para la evaluación de parámetros inmunológicos se siguieron protocolos descritos por Brodeur y col., (2020). Se realizaron frotis sanguíneos inmediatamente después de la toma de muestra de sangre, los cuales fueron secados al aire, fijados con metanol, y teñidos con solución Wrigth-Giemsa. Se colocaron 30 gotas de tinción sobre cada portaobjetos, luego de 1 minuto se colocaron 30 gotas de agua destilada y se dejó

reposar durante 12-15 minutos. Una vez pasado el tiempo indicado, se enjuagaron con agua de la canilla para quitar cualquier tipo de residuo, y se dejaron secando al aire para su posterior análisis bajo microscopio en una capa monocelular a 1000x. Los parámetros evaluados fueron recuento total de glóbulos blancos (RTGB) y recuento total de trombocitos (RTT), a partir del conteo de estas células cada 1000 glóbulos rojos (Shutler y Marcogliese, 2011); y el recuento diferencial de glóbulos blancos (RDGB): neutrófilos (Neu), eosinófilos (Eos), basófilos (Bas), monocitos (Mon), linfocitos (Lin), para el cual se contaron 100 células a 1000x en una capa monocelular de un frotis de sangre o hasta que se alcanzaron 150 campos de visión (Allender y col., 2008; Davis y col., 2009). Los diferentes tipos de glóbulos blancos fueron identificados siguiendo a Hadji-Azimi y col. (1987) y Campbell (2015). En estos frotis también se registró la presencia de parásitos sanguíneos cada 1000 glóbulos rojos.

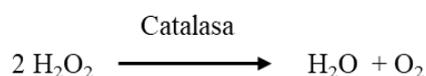
Parámetros bioquímicos:

Se midió actividad de las enzimas GST, CAT y AChE en hígado, riñón, músculo y plasma siguiendo protocolos descritos por Brodeur y col (2011, 2020). Se pesaron 0,2 gramos de hígado, riñón y músculo de cada individuo, los cuales fueron homogeneizados en frío en una solución buffer de 50 mM tris (hidroximetil) aminometano (pH 7.4) con 1 mM de ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) y 0.25 M de sucrosa utilizando un homogeneizador teflón-vidrio tipo Potter-Elvehjem. Los homogeneizados obtenidos fueron centrifugados durante 5 minutos a 12.500 rpm y 4°C para que precipiten los residuos sólidos. El sobrenadante fue recolectado y almacenado a -80°C hasta la medición de la actividad enzimática. La determinación de la actividad de las tres enzimas fue realizada por duplicado, en microplaca de 96 pocillos, a 25°C utilizando un lector de microplacas UV-visible modelo SPECTRO star nano marca BMG.

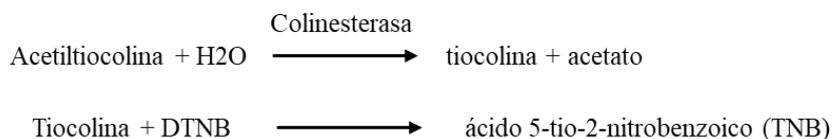
Para la determinación de la actividad GST se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 300 µl de tampón fosfato (100 mM, pH 7.0) con glutatión reducido agregado, 10 µl de homogeneizado diluido (1/200 para hígado y riñón; 1/2 para músculo y plasma) y 10 µl de una solución de 1-cloro-2,4 dinitrobenceno (CDNB). El cambio en la absorbancia se registró durante 4 minutos por espectrofotometría a 340 nm de longitud de onda. La actividad enzimática se obtuvo en términos de cantidad de GS-DNB conjugado producido por minuto utilizando un coeficiente de extinción molar de $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y se expresó por mg de proteínas ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteínas).



Para la determinación de la actividad CAT se siguió la técnica de Baudhin y col. (1964) para la cual se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 300 µl de tampón fosfato (100 mM, pH 7.0), 10 µl de homogeneizado diluido (1/200 para hígado, 1/100 para riñón) y 10 µl de solución de H₂O₂ al 5%. El cambio en la absorbancia se registró durante 2 min por espectrofotometría UV a 240 nm de longitud de onda. La actividad enzimática se obtuvo en términos de cantidad de H₂O₂ degradado por minuto utilizando un coeficiente de extinción molar de 43.6 M⁻¹ cm⁻¹, y se expresó por mg de proteínas (µmol/min/mg proteínas).



Para la determinación de AChE se siguió la técnica de Ellman y col. (1961) para la cual se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 200 µl de tampón fosfato (100 mM, pH 8.0), 50 µl de homogeneizado diluido (1/2 para hígado y músculo), 10 µl de una solución de 2.5 mM de ácido 5-5'-dinitrobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB), y 10 µl de una solución de 5 mM de acetiltiocolina iodada. El cambio en la absorbancia se registró durante 3 min por espectrofotometría a 412 nm de longitud. La actividad enzimática se determinó indirectamente cuantificando la cantidad de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico producido por minuto utilizando un coeficiente de extinción molar de 14 150 M⁻¹ cm⁻¹. y se expresó por mg de proteínas (µmol/min/mg proteínas).



La concentración de proteínas fue medida siguiendo el método colorimétrico de Lowry y col. (1951). Para las determinaciones, se incubó 50 µl del homogeneizado de tejido (1/50 para hígado, 1/20 para riñón; 1/100 para músculo y plasma) con 100 µl de del reactivo de Lowry, preparado en el momento (96.5% de Na₂CO₃, 2% de CuSO₄, 1% de KNaC₄H₄O₆·4H₂O y 0.5% de NaOH al 1 M). a temperatura ambiente y durante 10 minutos. Luego se agregaron 50 µl de solución de Folin-Ciocalteau fenol 2N diluido 1/10

y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, para luego ser leído a 700 nm de longitud de onda.

Parámetros genéticos:

A partir de los frotis realizados para la evaluación de parámetros inmunológicos, también se evaluó la presencia de micronúcleos (MNs) y otras anormalidades nucleares (ANuc) (núcleo escotado, mellado, lobulado, binucleado, anucleado) cada 1000 eritrocitos siguiendo protocolo original (Fenech 2007) con adaptaciones según Pérez Iglesias y col. (2016).

3.2.3 Tratamiento de los datos:

A partir del peso y la LHC se calculó el índice de condición corporal (ICC)= peso individuo (gr)/LHC (mm)³ (Fulton, 1904). El peso del hígado, gónadas, cuerpos grasos se utilizó para calcular diferentes índices: índice hepatosomático (IHS)= gr hígado/peso (gr) individuo; índice gonadosomático (IGS)= gr gónada/ peso (gr) individuo e índice de cuerpos grasos (ICG)= gr cuerpos grasos/ peso (gr) individuo (Brodeur y col., 2011). Con los datos de Hto, RGR y Hb se calcularon los siguientes índices (Allender y col., 2008):
Volumen corpuscular medio - VCM (fL) = (Hto (L/L) / RGR (10¹²células/L);
Hemoglobina corpuscular media - HCM (pg)= [Hb (g/dL)*10] / RGR (10¹²células/L);
Concentración de hemoglobina corpuscular media - CHCM (g/dL)= [Hb (g/dL)*100] /Hto (%).

A partir del conteo de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, y linfocitos se calculó el porcentaje de cada leucocito (Davis y col., 2009) y a partir del conteo de neutrófilos y linfocitos se calculó el índice de estrés N:L (Davis y col., 2008).

Además, a partir de la comparación de los valores obtenidos de los parámetros clínicos de cada individuo con los valores de referencia obtenidos en el capítulo 2 (Tabla 2.4), se determinó si cada parámetro presentaba valores afectados (por fuera del intervalo de referencia) o valores normales (por dentro del intervalo de referencia). Finalmente teniendo en cuenta la cantidad de parámetros clínicos con valores afectados, y nuestra percepción a partir del conocimiento adquirido, se construyó una nueva variable llamada **condición del individuo** (normal-afectado) para cada individuo proveniente de los diferentes sitios de estudio, lo que se utilizó como insumo para la realización de análisis multivariados.

3.2.4 Análisis estadístico:

Enfoque univariado

Se realizaron análisis univariados a partir del esquema de la figura 3.6.

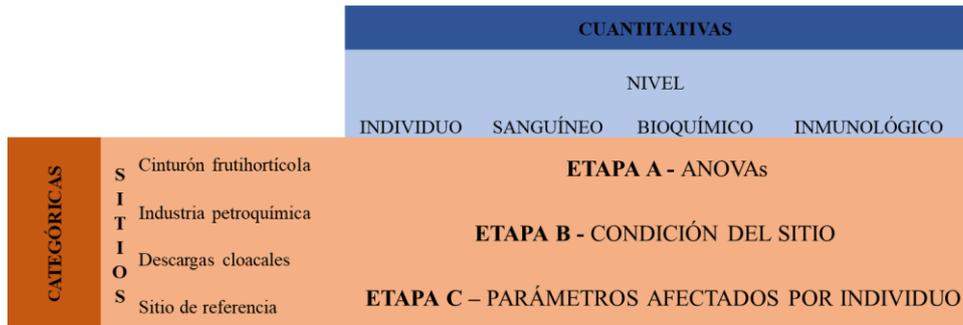


Figura 3.6: Esquema seguido para llevar a cabo el análisis univariado.

Con el objetivo de comparar la respuesta de cada parámetro clínico medido entre los individuos provenientes de los diferentes sitios de estudio se realizaron ANOVAs univariados con los valores obtenidos de cada parámetro (**Etapa A**). Los supuestos se corroboraron mediante un test Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de los datos y un test de Barlett para comprobar la homogeneidad de varianza. En los casos que no se cumplieron los supuestos, se realizó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Para los parámetros clínicos que mostraron diferencias significativas entre los sitios se realizaron tests de comparaciones múltiples a posteriori de Tukey o Dunn respectivamente, según correspondiera.

Además, con el objetivo de evaluar la **condición del sitio** se calculó la proporción de individuos con valores afectados en cada sitio para cada parámetro (**Etapa B**). Con el objetivo de comparar la cantidad de parámetros clínicos afectados por individuo que presentó cada sitio se calculó la cantidad de parámetros afectados que presentó cada individuo en total y por nivel (**Etapa C**). Como se mencionó anteriormente, esta información se utilizó para determinar la **condición de cada individuo** y esta nueva variable fue utilizada como insumo para la realización de análisis multivariados.

Finalmente, junto con la interpretación de los resultados se aplicaron los conceptos de **efectividad** y **especificidad** para caracterizar los parámetros clínicos evaluados, considerándose **efectivo** aquel parámetro que permitió distinguir entre los individuos provenientes de los diferentes sitios; y **específico** a aquel parámetro que solamente mostró

su respuesta asociada con un sitio en particular. La efectividad fue evaluada en total y por niveles.

Enfoque multivariado

Con el fin de cumplir los objetivos propuestos en el presente capítulo, se realizaron varios análisis multivariados exploratorios empleando el siguiente esquema (figura 3.7):

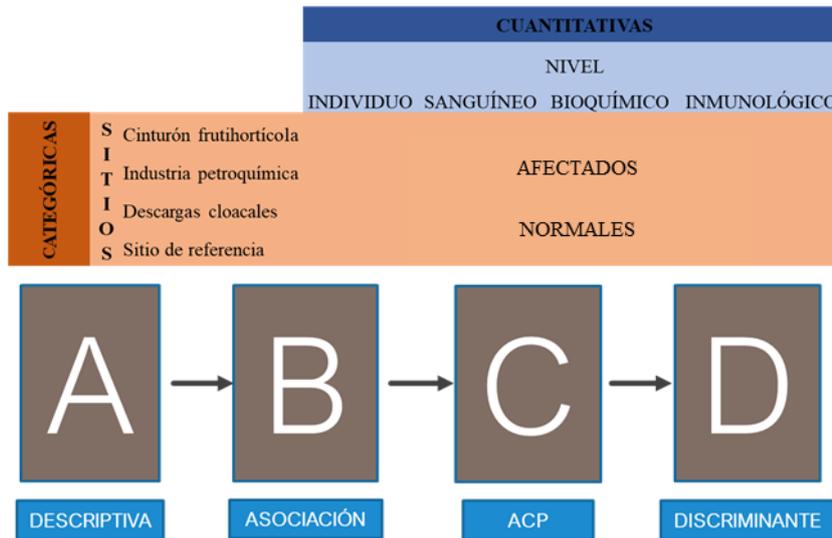


Figura 3.7: Esquema seguido para llevar a cabo el análisis multivariado.

Los resultados obtenidos en las diferentes etapas del esquema (A-D) aportaron elementos para cumplir los objetivos propuestos en el presente capítulo. La realización de la etapa A brindó información para evaluar la magnitud en la que influyen los sitios estudiados sobre los parámetros clínicos evaluados, y evaluar si existen parámetros clínicos que varíen de manera específica en cada sitio. La realización de la etapa B brindó información para detectar relaciones entre los diferentes parámetros clínicos. La realización de las etapas C y D brindó información para evaluar la influencia de los diferentes sitios de estudio sobre los parámetros clínicos evaluados y sobre el estado de salud de los individuos de *L. lactator*, y evaluar la magnitud en que los sitios influyen sobre los parámetros clínicos. Por último, la realización de todas las etapas aportó elementos para seleccionar los parámetros clínicos que permiten detectar diferencias entre los sitios evaluados, y recomendar parámetros clínicos para su incorporación en un índice de salud.

A- Se realizó un análisis de estadística descriptiva para las variables categóricas (**sitio** y **condición del individuo**) y para las variables cuantitativas (**parámetros clínicos**), acompañado de gráficos de burbujas. Los gráficos de burbujas consisten en

forma de esferas de tamaños proporcionales, que muestran la magnitud de la distancia de cada variable escalada (-3 negro hasta +5 gris), lo que se utilizó para poder identificar formas gráficas distinguibles (patrones), que permitan conocer la variabilidad de respuesta de cada parámetro en los sitios de estudio y en los niveles.

B- Se realizó un análisis de asociación presentando matrices de correlación entre los parámetros clínicos analizados, el cálculo de coeficientes de correlación de Pearson y sus correspondientes pruebas de significancia (prueba de $p=0$; considerando un $\alpha=0,05$), cuyo resumen se presentó en un diagrama de asociación piramidal o mapa de color. En el diagrama se mostraron los valores del coeficiente de correlación en colores (+1: azul; -1: rojo; ausencia de significancia: blanco) y se buscó identificar formas gráficas distinguibles (patrones), las cuales permitieron identificar redundancia en la información.

C- Se realizaron análisis de componentes principales (ACP). Se presentaron los resultados numéricos, y la descripción de las dimensiones junto con los biplot proyectando la contribución de cada una de las variables (**parámetros clínicos**). Además, se presentaron gráficos complementarios para el mismo set de datos con rótulos de las categorías de las variables categóricas **sitio** y **condición del individuo** para cada individuo. Estos tres gráficos se presentaron juntos, lo que permitió, de manera comparativa, realizar asociaciones integrales entre los resultados obtenidos.

Además, se realizó una descripción de la variable categórica **sitios** empleando un χ^2 -test, lo que permitió obtener un orden de mayor a menor de los parámetros clínicos que mostraron una respuesta significativa ($p<0,05$) y caracterizaron los sitios.

Para finalizar, con el objetivo de detectar relaciones entre los **sitios** y la **condición de los individuos** se realizaron tablas de contingencia multivariado, cuyos resultados se mostraron en un gráfico de asociación, de 2*4 categorías. Se presentaron bloques con diferentes colores y tamaños, en los cuales el tamaño representa la frecuencia de ocurrencia, y los colores representan los resultados de las pruebas de contingencia (gris: no significativo, azul: significativo por encima del valor normal, y rosa: significativo por debajo de los valores normales).

D- Se realizó un análisis discriminante en el que se utilizaron las distancias como respuesta, se testeó la homogeneidad multivariada con un test de permutación, y se realizó un test de comparaciones múltiples de Tukey. Se obtuvieron como resultado las funciones discriminantes y se construyó un ranking de los parámetros clínicos que aportaron en la separación de los sitios de mayor a menor para cada una de las componentes discriminantes (DS1, DS2 y DS3).

Tal como se hizo con el enfoque univariado, junto con la interpretación de los resultados se aplicaron los conceptos de **efectividad** y **especificidad** para caracterizar los parámetros clínicos evaluados. Se consideraron efectivos aquellos parámetros que aportaron en la separación de los sitios al realizar el análisis discriminante. Para evaluar la especificidad se tuvo en cuenta los parámetros que mostraron un patrón distinguible y similar en los gráficos de burbujas.

A partir de los resultados obtenidos, se identificaron los elementos necesarios para caracterizar el estado de salud de los individuos provenientes de cada sitio, seleccionar aquellos parámetros que permiten distinguir entre sitios, y se recomiendan parámetros clínicos para su utilización en un índice de salud.

Todos los análisis fueron corridos en R 4.0.2 (librerías FactoMineR, *ade4*, *corrplot*, *emmeans*, *tidyverse*, *vcd* y *vegan*).

3.3 RESULTADOS

Se logró coleccionar un total de 82 individuos machos y hembras de *L. lucinator* provenientes de sitios afectados por la florihorticultura (CFH1; n=19), la industria petroquímica (IP1; n=19) y la descarga de efluentes cloacales (DC1; n=11), y además individuos provenientes de un sitio de referencia (SR1; n=33).

Enfoque univariado

Los resultados del análisis univariado mostraron diferencias significativas entre los sitios ($p < 0,05$) para todos los parámetros clínicos evaluados a excepción de ocho de ellos: IGS ($p=0,40$), HCM ($p=0,06$), actividad AChE en hígado ($p=0,43$), actividad GST en riñón ($p=0,28$) y en músculo ($p=0,39$), actividad AChE en músculo ($p=0,63$) y RTGB ($p=0,12$). Los biomarcadores que mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) fueron: a nivel individuo, ICC, IHS y ICG; a nivel sanguíneo, Hto, Hb, RGR y los índices VCM y CHCM; a nivel bioquímico, GST en hígado, CAT en hígado, CAT en riñón y AChE en plasma; a nivel inmunológico, Neu, Eos, Bas, Mon, Lin, N:L, RTT; y a nivel genético, MNs y ANuc. En el anexo 3 se presentan las tablas resumen de las pruebas de significancia para los análisis realizados.

En la figura 3.8 se presentan las comparaciones entre sitios de los parámetros clínicos a nivel individuo que mostraron diferencias significativas. Se observó que para ICC los individuos de CFH1 y SR1 presentaron valores significativamente mayores que los individuos de IP1 y DC1. Para IHS, los individuos de DC1 presentaron valores

significativamente mayores que los individuos del resto de los sitios. Mientras que para ICG, los individuos de CFH1 y DC1 presentaron valores significativamente mayores que los individuos de IP1 y SR1.

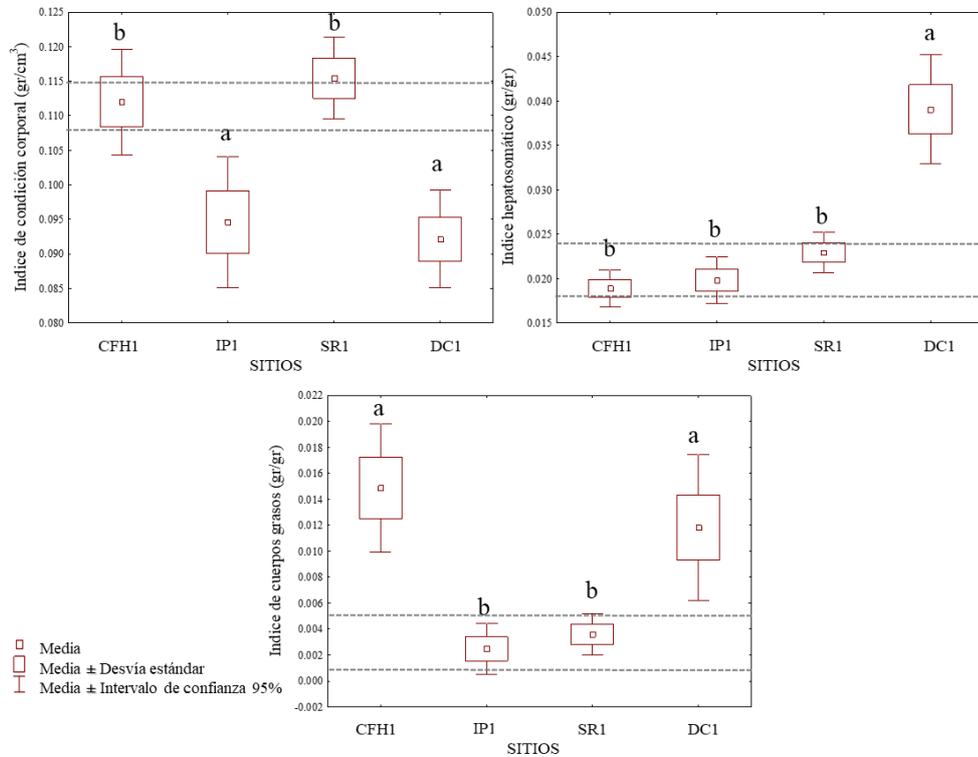


Figura 3.8: Comparación de parámetros clínicos a nivel individuo evaluados en adultos de *L. lactator* de los sitios de estudio. CFH1: cinturón florihortícola; IP1: industria petroquímica; SR1: sitio de referencia; DC1: descargas cloacales. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b).

A continuación, se presentan los resultados de la presencia de anomalías más destacadas (figura 3.9). Se pudo observar que los individuos provenientes de las descargas cloacales presentaron anomalías morfológicas como la columna vertebral inflamada (6/11=54,5%) e hígado con malformaciones (4/11=36,3%); y los individuos provenientes de la industria petroquímica presentaron malformaciones en el hígado (4/20=20%).

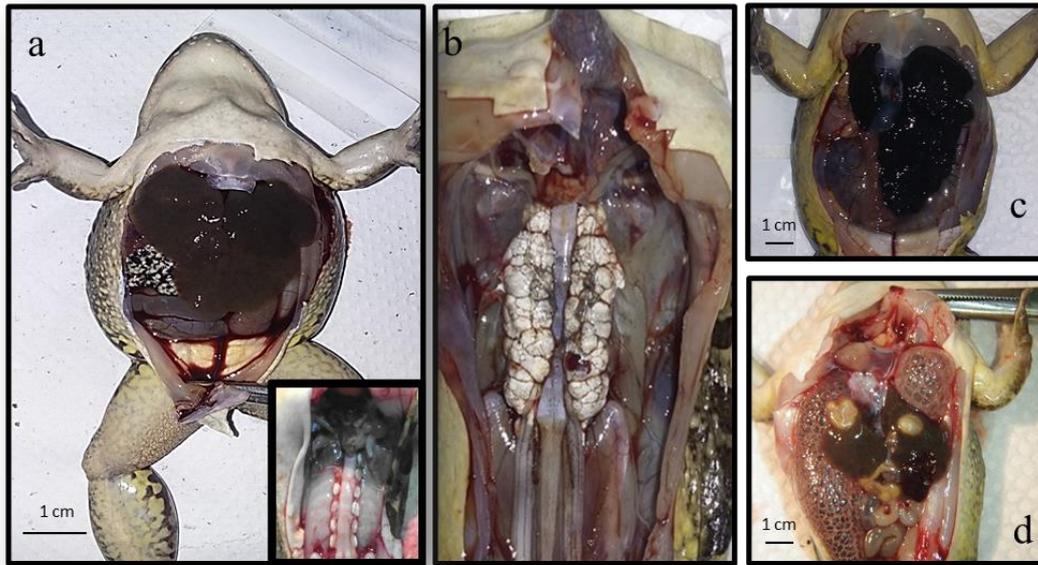


Figura 3.9: a. anatomía interna de un individuo normal adulto de *L. luctator*, con detalle de la columna vertebral normal. b. individuo con columna vertebral afectada. c. individuo de DC1 con hígado anormal. d. individuo de IP1 con hígado anormal.

En la figura 3.10 se presentan las comparaciones entre sitios de los parámetros clínicos a nivel sanguíneo que mostraron diferencias significativas. Se observó que los individuos de IP1 y SR1 presentaron valores significativamente menores de Hto que los individuos de CFH1 y DC1. Para RGR, los individuos de IP1 presentaron valores significativamente mayores que los individuos de SR1. Para Hb, los individuos de SR1 presentaron valores significativamente menores que los individuos de CFH1 y IP1, mientras que los individuos de CFH1 presentaron valores significativamente mayores que los individuos de DC1. En cuanto a los índices sanguíneos, para VCM, los individuos de DC1 presentaron valores significativamente mayores que los individuos de IP1 y SR1, y, además, los individuos de CFH1 presentaron valores significativamente mayores que los individuos de IP1. Para CHCM, los individuos de DC1 presentaron valores significativamente menores que los individuos del sitio CFH1 y IP1, mientras que los individuos de IP1 presentaron valores significativamente mayores que los individuos de SR1 y DC1.

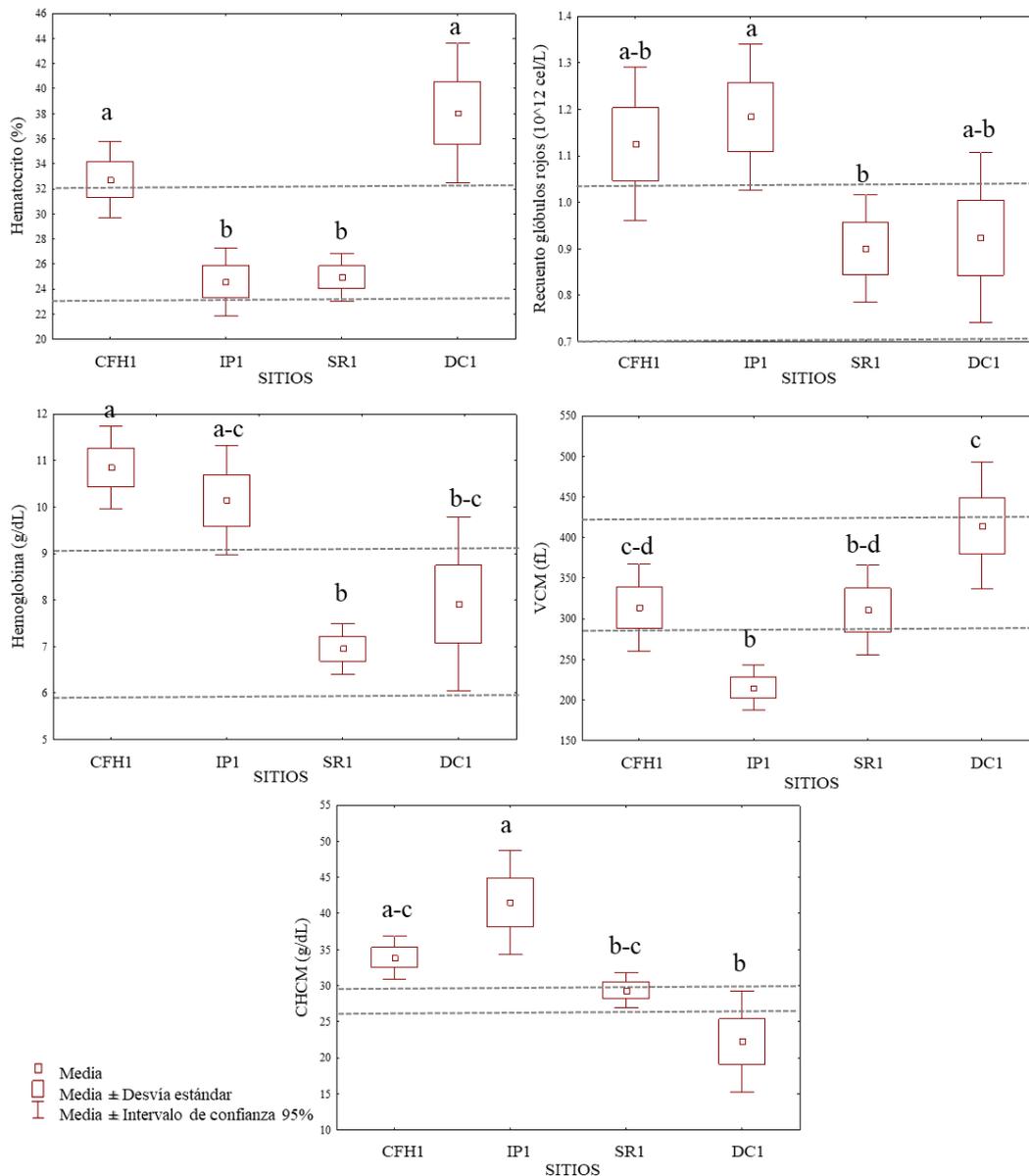


Figura 3.10: Comparación de parámetros a nivel sanguíneo evaluados en adultos de *L. luictator* de los sitios de estudio. CFH1: cinturón florihortícola; IP1: industria petroquímica; SR1: sitio de referencia; DC1: descargas cloacales. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b, c, d).

En la figura 3.11 se presentan las comparaciones entre sitios de los parámetros clínicos a nivel bioquímico que mostraron diferencias significativas. Se observó que para GST en hígado, los individuos de DC1 presentaron valores significativamente mayores que los individuos del resto de los sitios, mientras que los individuos de IP1 presentaron valores significativamente menores que los individuos de SR1 y DC1. Para CAT en hígado, los individuos de CFH1 y IP1 presentaron valores significativamente menores que los individuos de SR1. Para CAT en riñón, los individuos de IP1 presentaron valores

significativamente menores que los individuos provenientes del resto de los sitios. Y para AChE en plasma, los individuos de DC1 presentaron valores significativamente menores que los individuos del sitio IP1 y SR1.

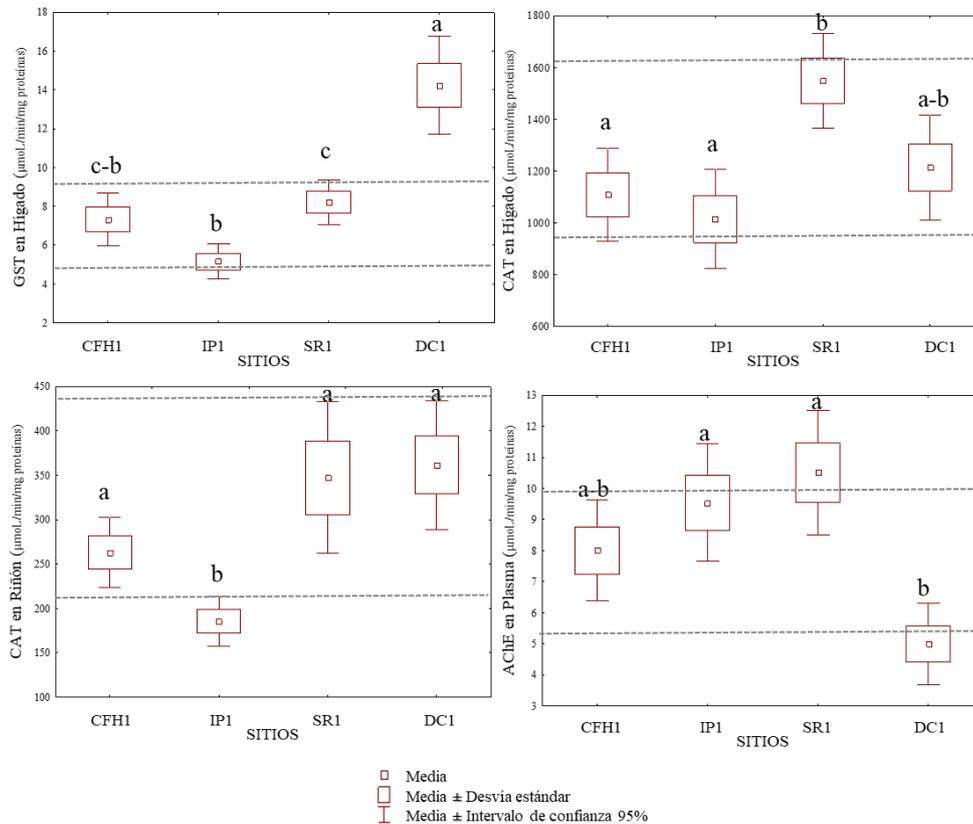


Figura 3.11: Comparación de parámetros a nivel bioquímico evaluados en adultos de *L. tectorius* de los sitios de estudio. CFH1: cinturón florihortícola; IP1: industria petroquímica; SR1: sitio de referencia; DC1: descargas cloacales. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b, c).

En la figura 3.12 se presentan las comparaciones entre sitios de los parámetros clínicos a nivel inmunológico que mostraron diferencias significativas y en la figura 3.13 se muestran los diferentes tipos de glóbulos blancos identificados. Se observó que, para Neu, los individuos del sitio CFH1 y IP1 presentaron valores significativamente mayores que los individuos provenientes de SR1. Para Mon, los individuos de IP1 presentaron valores significativamente mayores que los individuos provenientes de SR1. Los individuos de los sitios CFH1, IP1 y DC1 presentaron valores significativamente mayores de Eos, Bas y N:L, y menores de Lin respecto a los individuos de SR1. Por último, para RTT, los individuos de DC1 presentaron valores significativamente mayores que los individuos provenientes del resto de los sitios.

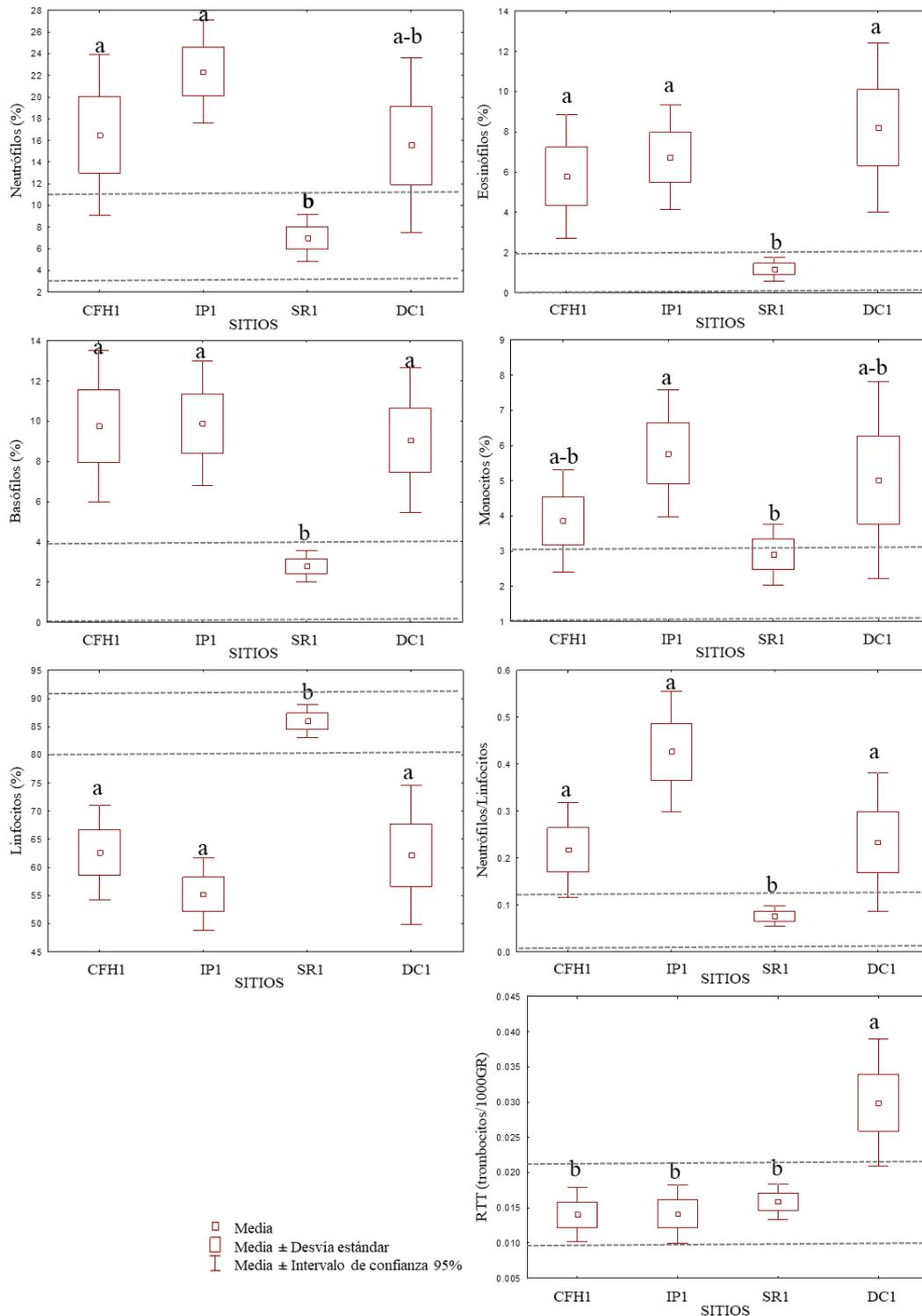


Figura 3.12: Comparación de parámetros a nivel inmunológico evaluados en adultos de *L. luctator* de los sitios de estudio. CFH1: cinturón florihortícola; IP1: industria petroquímica; SR1: sitio de referencia; DC1: descargas cloacales. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b).

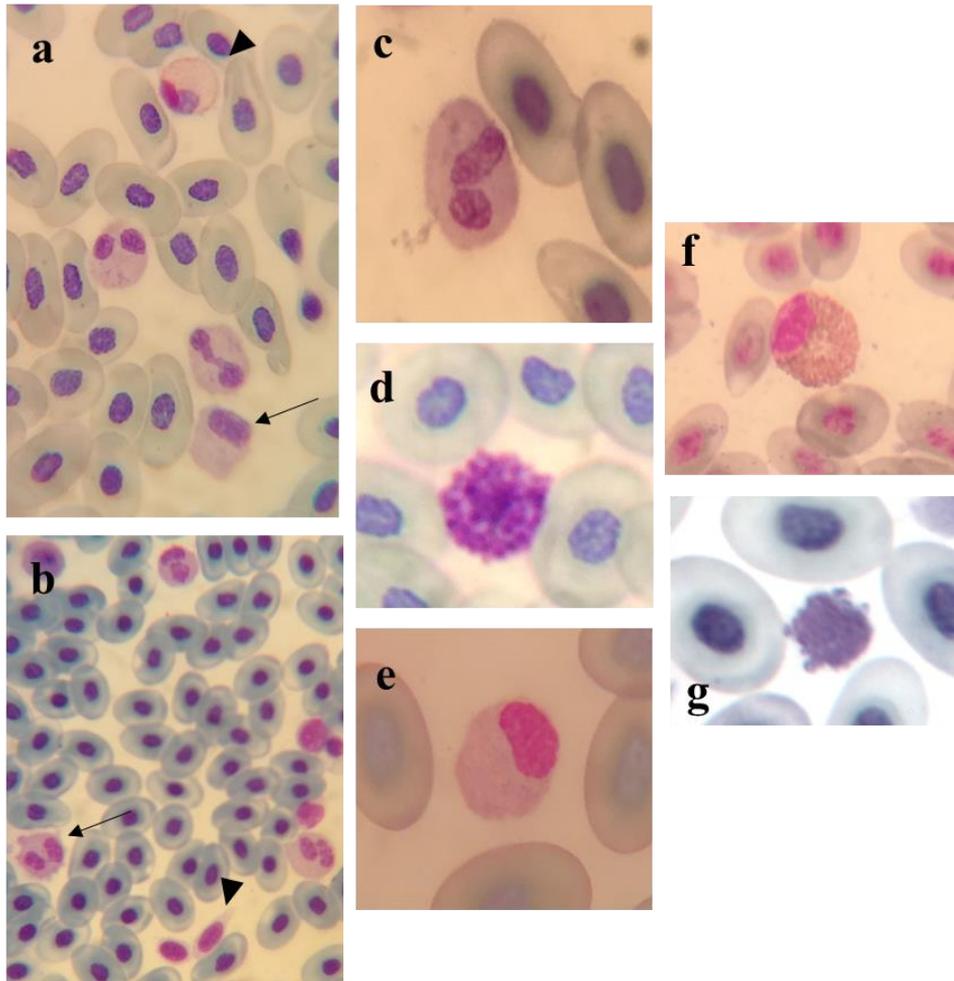


Figura 3.13: Glóbulos blancos. a: frotis donde se observa un eosinófilo (punta de flecha), dos neutrófilos y un monocito (flecha). b: frotis donde se muestra neutrófilos (flecha) y trombocitos (punta de flecha). c: Neutrófilo. d: basófilo. e: monocito. f: eosinófilo. g: linfocito. Tinción Wright. 100x.

En la Figura 3.14 se presentan las comparaciones entre sitios de los parámetros clínicos a nivel genético que mostraron diferencias significativas entre los sitios. Se observó que para MNs, los individuos de DC1 presentaron valores significativamente mayores que los individuos provenientes de SR1; mientras que, para ANuc, los individuos de CFH1, IP1 y DC1 presentaron valores significativamente mayores que los individuos de SR1. Estos parámetros no fueron incluidos en el análisis multivariado. En la figura 3.15 se muestra el detalle de los micronúcleos y las anomalías nucleares identificadas.

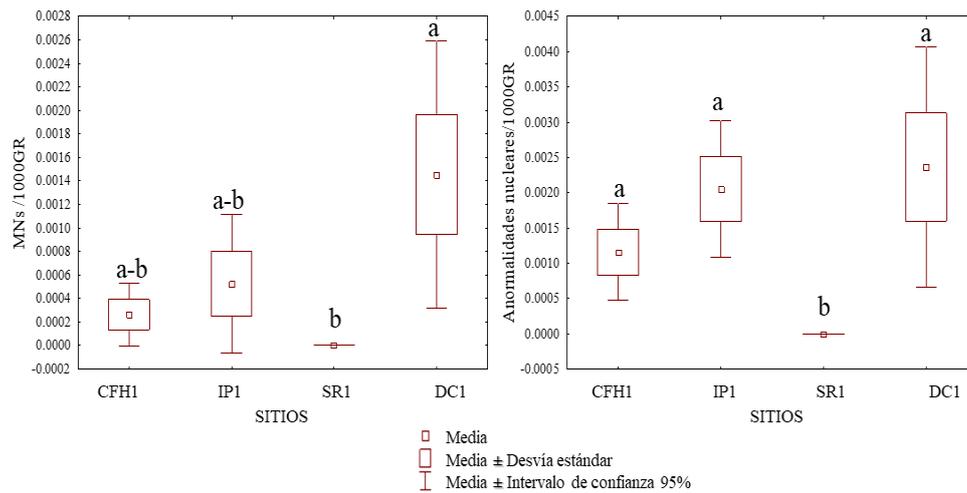


Figura 3.14: Comparación de parámetros a nivel genético evaluados en adultos de *L. luctator* de los sitios de estudio. CFH1: cinturón florihortícola; IP1: industria petroquímica; SR1: sitio de referencia; DC1: descargas cloacales. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b).

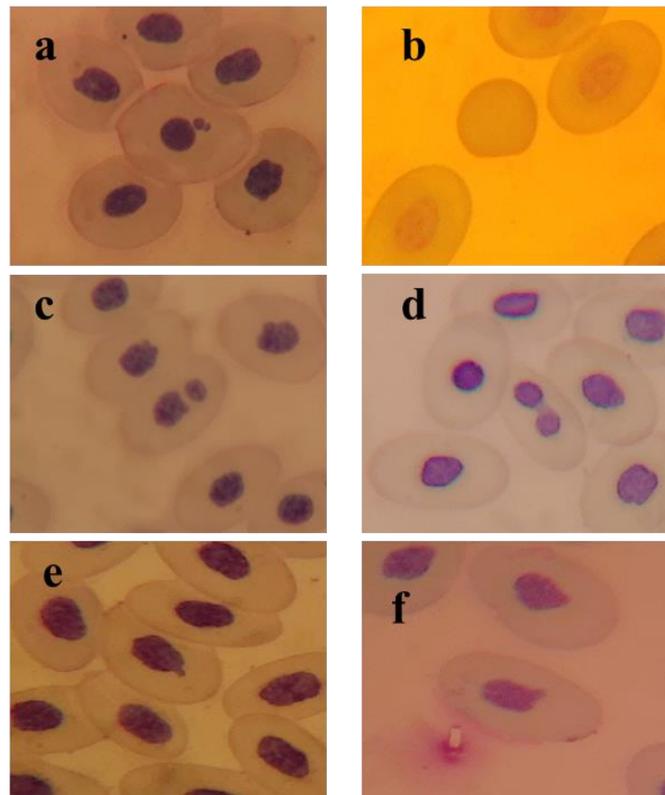


Figura 3.15: Anormalidades nucleares observadas en adultos de *L. luctator*. a: Micronúcleo. b: Anucleado. c y d: Binucleado. E y f: núcleo mellado. Tinción Wright. 100x.

La evaluación de la **condición del sitio** a partir del cálculo de la proporción de individuos con valores afectados por sitio para cada parámetro mostró que para todos los parámetros al menos el 10 % de los individuos de todos los sitios presentó valores afectados.

Tal como se observa en la tabla 3.1, para los parámetros a nivel individuo, el sitio SR1 presentó el menor porcentaje y DC1 el mayor porcentaje de individuos con valores afectados para ICC, IHS y IGS. Para ICG el sitio DC1 presentó el menor porcentaje e IP1 el mayor porcentaje de individuos con valores afectados.

Tabla 3.1: Cantidad de individuos adultos de *L. luclator* con valores afectados y normales para los parámetros a nivel individuo.

		ICC	IHS	ICG	IGS
CFH1 (n=19)	Afectados	7 (36,84%)	8 (42,11%)	14 (73,68%)	8 (42,11%)
	Normales	12 (63,16%)	11 (57,89%)	5 (26,32%)	11 (57,89%)
IP1 (n=19)	Afectados	17 (89,47%)	8 (42,11%)	17 (89,47%)	8 (42,11%)
	Normales	2 (10,53%)	11 (57,89%)	2 (10,53%)	11 (57,89%)
SR1 (n=33)	Afectados	5 (15,15%)	11 (33,33%)	23 (69,70%)	10 (30,30%)
	Normales	28 (84,85%)	22 (66,67%)	10 (30,30%)	23 (69,70%)
DC1 (n=11)	Afectados	10 (90,91%)	10 (90,91%)	7 (63,64%)	5 (45,45%)
	Normales	1 (9,09%)	1 (9,09%)	4 (36,36%)	6 (54,55%)

Al considerar los parámetros a nivel sanguíneo, tal como se observa en la tabla 3.2, para Hto, Hb y CHCM, el SR1 presentó el menor porcentaje de individuos con valores afectados; para RGR y VCM el sitio DC1 presentó el menor porcentaje de individuos con valores afectados; mientras que para HCM los sitios CFH1 e IP1 presentaron el menor porcentaje de individuos con valores afectados. Para RGR, Hb y CHCM el sitio CFH1 presentó el mayor porcentaje de individuos con valores afectados, para Hto y HCM el sitio DC1 presentó el mayor porcentaje de individuos con valores afectados, y para VCM el sitio IP1 presentó el mayor porcentaje de individuos con valores afectados.

Tabla 3.2: Cantidad y porcentaje de individuos adultos de *L. luclator* con valores afectados y normales para los parámetros a nivel sanguíneo.

		Hto	RGR	Hb	VCM	HCM	CHCM
CFH1 (n=19)	Afectados	12 (63,16%)	12 (63,16%)	15 (78,9%)	9 (47,3%)	6 (31,6%)	16 (84,2%)
	Normales	7 (36,84%)	7 (36,84%)	4 (21,1%)	10 (52,7%)	13 (68,4%)	3 (15,8%)
IP1 (n=19)	Afectados	7 (36,84%)	10 (52,6%)	13 (68,4%)	16 (88,8%)	6 (31,6%)	13 (76,5%)
	Normales	12 (63,16%)	9 (47,3%)	6 (31,6%)	2 (11,2%)	13 (68,4%)	4 (23,5%)
SR1 (n=33)	Afectados	8 (27,5%)	15 (46,8%)	4 (12,9%)	20 (68,9%)	15 (48,4%)	13 (44,8%)
	Normales	21 (72,4%)	17 (53,1%)	27 (87,1%)	9 (31,1%)	16 (51,6%)	16 (55,2%)
DC1 (n=11)	Afectados	8 (72,7%)	4 (40%)	5 (45,45%)	5 (50%)	4 (40%)	9 (81,8%)
	Normales	3 (27,3%)	6 (60%)	6 (54,55%)	5 (50%)	6 (60%)	2 (18,2%)

Al considerar los parámetros a nivel bioquímico, tal como se observa en la tabla 3.3, la respuesta fue variada, siendo IP1 y DC1 los sitios que presentaron el mayor porcentaje de individuos con valores afectados para todos los parámetros.

Tabla 3.3: Cantidad de individuos adultos de *L. luclator* con valores afectados y normales los parámetros a nivel bioquímico.

		GST (H)	CAT (H)	AChE (H)	GST (R)	CAT (R)	GST (M)	AChE (M)	AChE (P)	GST (P)
CFH1 (n=19)	Afectados	7 (36,84%)	10 (52,7%)	18 (94,7%)	6 (31,6%)	5 (26,32%)	6 (31,6%)	6 (31,6%)	7 (38,9%)	4 (21%)
	Normales	12 (63,16%)	9 (47,3%)	1 (5,3%)	13 (68,4%)	14 (73,68%)	13 (68,4%)	13 (68,4%)	11 (61,1%)	15 (79%)
IP1 (n=19)	Afectados	6 (31,6%)	12 (63,16%)	18 (94,7%)	8 (42,1%)	15 (78,9%)	5 (26,3%)	6 (31,6%)	10 (55,5%)	9 (50%)
	Normales	13 (68,4%)	7 (36,84%)	1 (5,3%)	11 (57,9%)	4 (21,1%)	14 (73,7%)	13 (68,4%)	8 (44,5%)	9 (50%)
SR1 (n=33)	Afectados	9 (29%)	9 (29%)	25 (80,6%)	8 (25,8%)	11 (39,2%)	9 (28,1%)	13 (40,6%)	10 (43,5%)	8 (30,7%)
	Normales	22 (71%)	22 (71%)	6 (19,4%)	23 (74,2%)	17 (60,8%)	23 (71,9%)	19 (59,4%)	13 (56,5%)	18 (69,3%)
DC1 (n=11)	Afectados	9 (81,8%)	3 (27,3%)	8 (72,7%)	4 (36,36%)	2 (18,2%)	3 (27,3%)	3 (27,3%)	6 (60%)	5 (50%)
	Normales	2 (18,2%)	8 (72,7%)	3 (27,3%)	7 (63,64%)	9 (81,8%)	8 (72,7%)	8 (72,7%)	4 (40%)	5 (50%)

*H: hígado; R: riñón; M: músculo; P: plasma

Al considerar los parámetros a nivel inmunológico, tal como se observa en la tabla 3.4, para Neu, Eos, Bas, Mon, Lin, N:L y RTT, el sitio SR1 presentó el menor porcentaje de individuos con valores afectados; mientras que IP1 presentó el mayor porcentaje de individuos afectados para todos los parámetros, menos para RTGB y RTT, para los cuales CFH1 y DC1 presentaron los mayores porcentajes de individuos con valores afectados, respectivamente.

Tabla 3.4: Cantidad de individuos adultos de *L. luclator* con valores afectados y normales para los parámetros a nivel inmunológico.

		Neu	Eos	Bas	Mon	Lin	N:L	RTGB	RTT
CFH1 (n=19)	Afectados	12 (63,16%)	11 (57,89%)	12 (63,16%)	9 (50%)	13 (68,4%)	12 (63,16%)	9 (47,3%)	7 (36,84%)
	Normales	7 (36,84%)	8 (42,11%)	7 (36,84%)	9 (50%)	6 (31,6%)	7 (36,84%)	10 (52,7%)	12 (63,16%)
IP1 (n=19)	Afectados	16 (84,2%)	14 (73,68%)	15 (78,9%)	14 (73,7%)	19 (100%)	15 (83,3%)	6 (31,6%)	7 (36,84%)
	Normales	3 (15,8%)	5 (26,32%)	4 (21,1%)	5 (26,3%)	0	3 (16,7%)	13 (68,4%)	12 (63,16%)
SR1 (n=33)	Afectados	7 (21,2%)	6 (18,1%)	8 (24,3%)	7 (21,2%)	5 (15,1%)	6 (18,7%)	9 (27,2%)	8 (24,3%)
	Normales	26 (78,8%)	27 (81,9%)	25 (75,7%)	26 (78,8%)	28 (84,9%)	26 (81,3%)	24 (72,8%)	25 (75,7%)
DC1 (n=11)	Afectados	4 (36,36%)	8 (72,7%)	8 (72,7%)	4 (36,36%)	9 (81,8%)	6 (60%)	4 (36,36%)	7 (63,64%)
	Normales	7 (63,64%)	3 (27,3%)	3 (27,3%)	7 (63,64%)	2 (18,2%)	4 (40%)	7 (63,64%)	4 (36,36%)

La comparación de la cantidad de parámetros afectados por individuo mostró que todos los individuos de *L. luclator* provenientes de todos los sitios presentaron al menos un parámetro afectado. Para los individuos provenientes de CFH1 se registraron entre 8 y 19 parámetros afectados, presentando la mayoría de ellos entre 14 y 16 parámetros afectados. Para los individuos provenientes de IP1 se registraron entre 11 y 21 parámetros

afectados, presentando la mayoría de ellos entre 16 y 17 parámetros afectados. Para los individuos provenientes de SR1 se registraron entre 5 y 15 parámetros afectados, y la mayoría presentó entre 8 y 10 parámetros afectados. Por último, los individuos provenientes de DC1 presentaron entre 9 y 20 parámetros afectados, presentando la mayoría de ellos entre 14 y 15 parámetros afectados.

Tabla 3.5: Cantidad de individuos clasificados por el número de parámetros afectados agrupados por sitio y por nivel.

Nivel individuo (4 parámetros)					Nivel sanguíneo (6 parámetros)				
	CFH1	IP1	SR1	DC1		CFH1	IP1	SR1	DC1
1 parámetro	5	1	6	0	0 parámetros	0	0	2	0
2 parámetros	6	4	12	2	1 parámetro	0	3	5	0
3 parámetros	7	12	14	8	2 parámetros	2	2	12	3
4 parámetros	1	2	1	1	3 parámetros	5	4	7	3
n individuos	19	19	33	11	4 parámetros	9	5	4	5
					5 parámetros	3	5	2	0
					6 parámetros	0	0	0	0
					n individuos	19	19	33	11
Nivel bioquímico (9 parámetros)					Nivel inmunológico (8 parámetros)				
	CFH1	IP1	SR1	DC1		CFH1	IP1	SR1	DC1
1 parámetro	2	0	6	0	0 parámetros	2	0	2	1
2 parámetros	2	1	7	3	1 parámetro	1	0	13	0
3 parámetros	6	2	6	1	2 parámetros	1	0	10	2
4 parámetros	4	6	7	3	3 parámetros	1	1	3	0
5 parámetros	2	5	6	1	4 parámetros	3	3	3	1
6 parámetros	2	4	1	1	5 parámetros	4	2	2	2
7 parámetros	1	1	0	2	6 parámetros	2	9	0	3
8 parámetros	0	0	0	0	7 parámetros	5	2	0	2
n individuos	19	19	33	11	8 parámetros	0	2	0	0
					n individuos	19	19	33	11

A modo de resumen, en la tabla 3.5 se muestra la cantidad de individuos por sitio que presentaron parámetros afectados para cada nivel. Se puede observar que a nivel individuo (4 parámetros), la mayoría de los individuos de todos los sitios presentaron entre dos y tres parámetros afectados; a nivel sanguíneo (6 parámetros), la mayoría presentó 3 y 5 parámetros afectados, menos los de SR1 donde la mayoría presentó 2 parámetros afectados, y dos individuos no presentaron parámetros sanguíneos afectados; a nivel bioquímico, la mayoría de los individuos de IP1 y DC1 presentaron entre 4 y 6 parámetros afectados, mientras que la mayoría de los individuos de CFH1 presentaron entre 3 y 5 parámetros afectados. Por otro lado, la mayoría de los individuos de SR1 presentaron entre 1 y 5 parámetros afectados. Por último, a nivel inmunológico, la

mayoría de los individuos de SR1 presentaron entre 1 y 2 parámetros afectados, mientras que en el resto de los sitios la mayoría de los individuos presentaron entre 4 y 7 parámetros afectados. Dos individuos de CFH1, dos de SR1 y uno de DC1 no presentaron parámetros inmunológicos afectados.

Tal como se comentó en la metodología (sección **3.2.3 Tratamiento de los datos**), la condición de cada individuo se determinó considerando el número de parámetros afectados por individuo y nuestra percepción. A partir de esa información, consideraremos afectados a aquellos individuos que presentaron 12 o más parámetros clínicos afectados y/o alguna afección reconocida, y normales aquellos individuos que presentaron menos de 12 parámetros afectados. Esta clasificación fue usada en una sección posterior como una variable categórica (**condición del individuo**) en el análisis multivariado.

Al considerar el enfoque univariado, a partir de la interpretación de los resultados de los ANOVAs, pudimos observar que, de los 29 parámetros evaluados, 21 (72,4%) resultaron efectivos para diferenciar entre sitios. A nivel individuo, 3/4 (75%) parámetros (ICC, IHS y ICG) resultaron efectivos para diferenciar entre al menos dos sitios; a nivel sanguíneo, 5/6 (83,3%) parámetros (Hto, Hb, RGR y los índices VCM y CHCM) resultaron efectivos para diferenciar entre al menos dos sitios, a nivel bioquímico, 4/9 (44,4%) parámetros (GST en hígado, CAT en hígado, CAT en riñón y AChE en plasma) resultaron efectivos para diferenciar entre al menos dos sitios; a nivel inmunológico, 7/8 (87,5%) parámetros (N, E, B, M, L, N:L, RTT) resultaron efectivos para diferenciar entre al menos dos sitios; y a nivel genético, 2/2 (100%) resultaron efectivos para diferenciar entre al menos dos sitios. De la interpretación de los resultados obtenidos al evaluar la **condición del sitio**, pudimos observar que, todos los parámetros resultaron efectivos para evidenciar individuos afectados en los sitios de estudio.

Al interpretar los resultados de los análisis univariados con la intención de detectar especificidad en la respuesta de los parámetros en los casos presentados, pudimos observar que para los ANOVAs, la disminución de CAT en riñón fue específica para individuos provenientes de IP1; la disminución de Eos, Bas, N:L, y el aumento de Lin fueron específicos para individuos provenientes de SR1; mientras que el aumento de IHS, GST en hígado, RTT y MNs fueron específicos para individuos provenientes de DC1.

Si bien la interpretación que acabamos de hacer es producto del enfoque univariado, es importante resaltar que a continuación se presentarán resultados de un enfoque multivariado lo que permitirá obtener conclusiones más precisas.

Enfoque multivariado

La salida completa del programa con los resultados de los análisis multivariados se presenta en el anexo 4.

A- Los resultados detallados de la estadística descriptiva para las variables cuantitativas (parámetros clínicos) y las variables categóricas (sitio y condición del individuo) se muestran en el anexo 4. A partir del gráfico de burbujas (figura 3.16), se pudo observar que de manera general no se distingue un patrón claro, lo que expresa una gran variabilidad en los resultados, como es de esperar al aplicar este enfoque multivariado. Sin embargo, si se mira detalladamente, se podría decir que la mayoría de los individuos la industria petroquímica (IP1) presentaron una respuesta similar para CAT en riñón. La mayoría de los individuos del sitio de referencia (SR1) presentaron una respuesta similar para los parámetros Neu, Eos, Bas, Lin, y N:L. Y la mayoría de los individuos de las descargas cloacales (DC1) presentaron una respuesta similar para los parámetros IHS, GST en hígado y RTT.

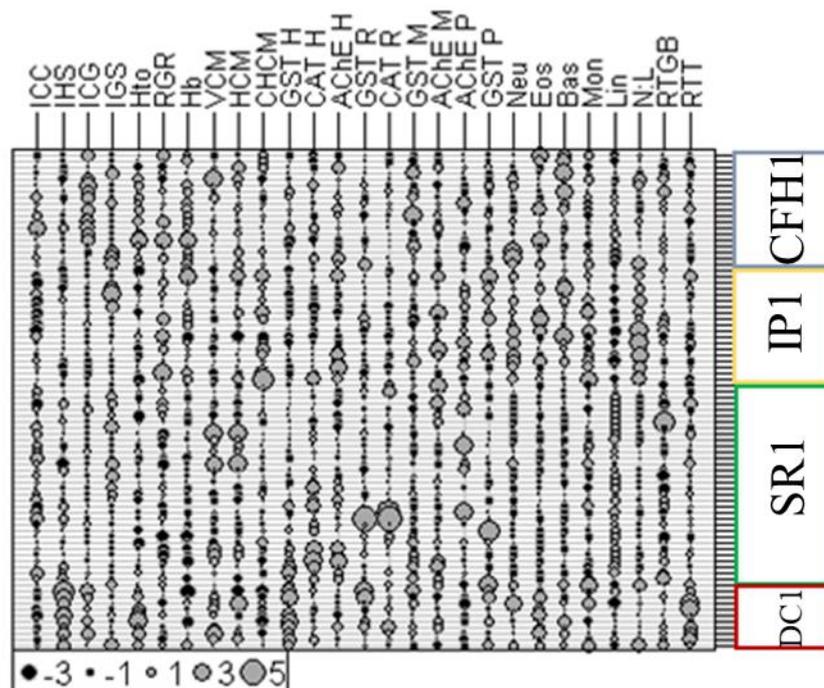


Figura 3.16: Gráfico de burbujas que representa la magnitud de la distancia de cada valor respecto al centroide para los individuos de *L. lactator* del año 2016. CFH1: cinturón florihortícola; IP1: industria petroquímica; SR1: sitio de referencia; DC1: descargas cloacales.

B- A partir del diagrama de asociación piramidal (figura 3.17), se pudo distinguir dos zonas del diagrama con un patrón de asociación significativa de gran magnitud: una expresada dentro del nivel sanguíneo, y la otra dentro del nivel inmunológico, como producto de la relación que existe entre los parámetros al calcularlos, lo que conduce a información redundante, y nos indica que su uso simultaneo no es conveniente.

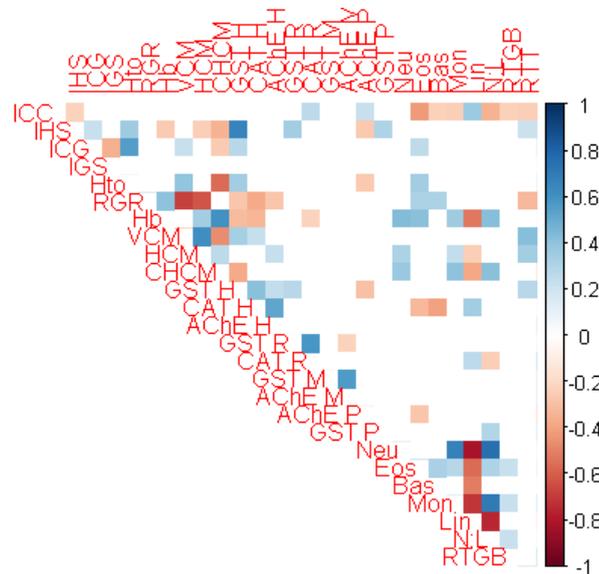


Figura 3.17: Diagrama de asociación piramidal para los individuos de *L. lactator* del año 2016. Los colores representan el coeficiente de correlación: azul: +1; rojo: -1; blanco: no significativo ($p > 0,05$).

C- A partir del ACP, se observó que el 60% de la variabilidad de los datos se alcanzó al incorporar hasta la dimensión 6. La Dim1 explicó un 18,9% y la Dim2 un 12,7% de la variabilidad total de los datos. En el biplot (figura 3.18) se distinguió una separación de los individuos provenientes del cinturón florihortícola (CFH1), la industria petroquímica (IP1), las descargas cloacales (DC1) y el sitio de referencia (SR1). Además, al graficar los rótulos de la variable **condición del individuo** y analizar el biplot, se pudo observar que existe una separación entre individuos afectados y normales, con una correspondencia entre los individuos afectados y el cinturón florihortícola (CFH1), la industria petroquímica (IP1) y las descargas cloacales (DC1).

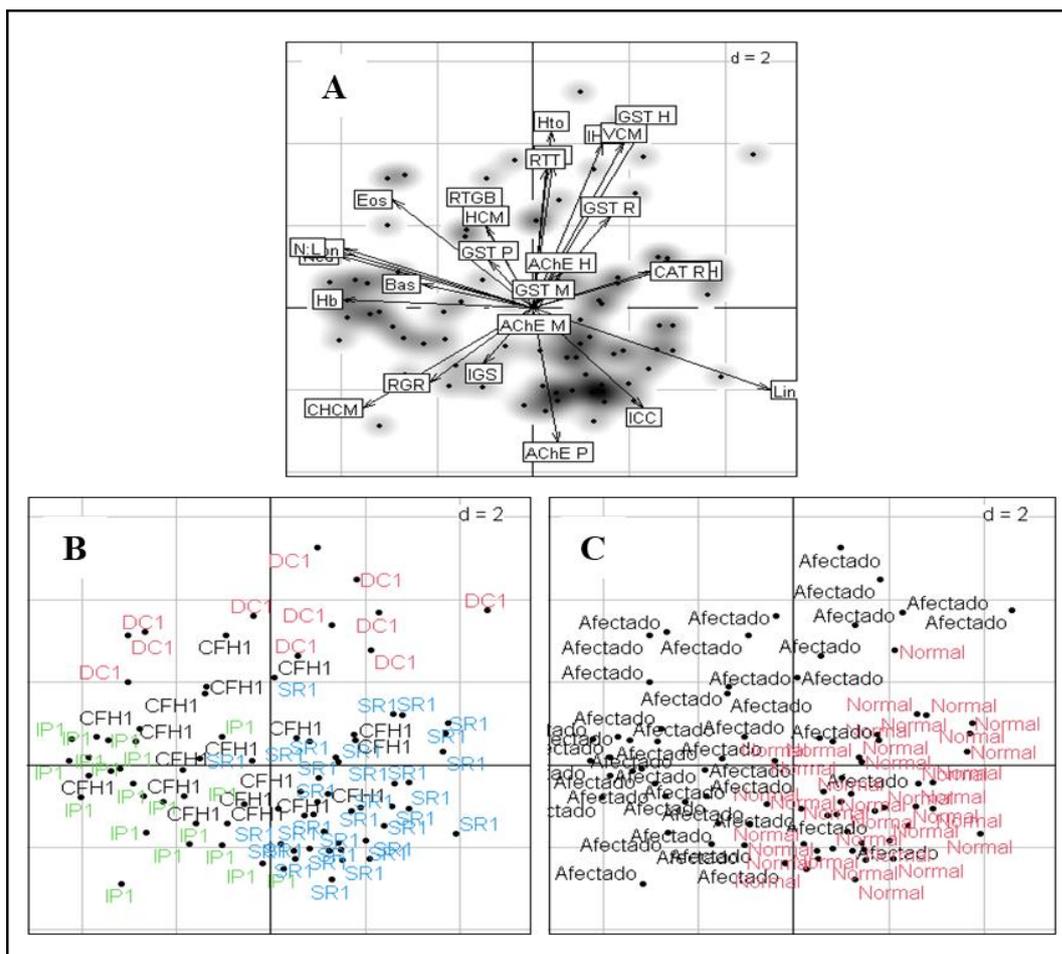


Figura 3.18: Análisis de componentes principales *L. lactator*-2016. Biplots. A: contribución de cada uno de los parámetros clínicos a cada dimensión. B: representación gráfica con los rótulos de la variable categórica sitios. C: representación gráfica con los rótulos de la variable categórica condición del individuo. CFH1: cinturón florihortícola; IP1: industria petroquímica; SR1: sitio de referencia; DC1: descargas cloacales.

A partir de los resultados del χ^2 test (ver tabla anexo) se pudo determinar que los parámetros que mostraron una respuesta significativa y caracterizaron los sitios fueron, para el cinturón florihortícola (CFH1): ICG, Hb, Hto, Bas, Lin, GST en plasma e IHS; para la industria petroquímica (IP1): N:L, CHCM, Neu, Hb, Mon, RGR, Bas, Eos, IHS, Hto, ICG, CAT en hígado, CAT en riñón, VCM, GST en hígado y Lin; para las descargas cloacales (DC1): IHS, GST en hígado, RTT, Hto, VCM, Eos, GST en plasma, ICG, GST en riñón, AChE en plasma y CHCM y para el sitio de referencia (SR1): Lin, CAT en hígado, CAT en riñón, AChE en plasma, Mon, RGR, ICG, Hto, Neu, Eos, N:L, Bas y Hb.

En la figura 3.19 se muestran los resultados del análisis de contingencia. Al interpretar la figura se pudo determinar que: el sitio de referencia (SR1) presenta una baja frecuencia de ocurrencia de individuos afectados que resultan significativamente menores ($p < 0,05$) que los valores normales, y una alta frecuencia de ocurrencia de individuos

normales con valores significativamente mayores que los valores normales (que el valor promedio); la industria petroquímica (IP1) presenta una alta frecuencia de individuos afectados con valores que resultan significativamente mayores ($p < 0.05$) que los valores normales y una baja frecuencia de ocurrencia de individuos normales con valores significativamente menores que los valores normales; los individuos del cinturón florihortícola (CFH1) y las descargas cloacales (DC1) no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) para las variables categóricas analizadas.

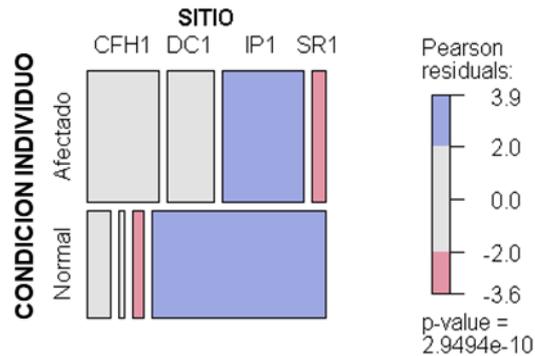


Figura 3.19: Gráfico de bloques para *L. lactator* del año 2016. Se muestra la relación entre las variables categóricas sitios y condición del individuo. Tamaño del bloque: frecuencia de ocurrencia. Colores: valores de las pruebas de contingencia (gris: no significativo, azul: significativo por encima del valor normal, y rosa: significativo por debajo del valor normal). CFH1: cinturón florihortícola; DC1: descargas cloacales; IP1: industria petroquímica; SR1: sitio de referencia.

D- Como se observa en la figura 3.20, el análisis discriminante mostró una separación significativa ($p < 0.05$) entre los cuatro sitios. Se observó que cada sitio cae en un cuadrante diferente, resultando en una separación al graficar los componentes 1 y 2. El componente 1 separa entre el grupo DC1-SR1 y el grupo CFH1-IP1. Por otro lado, el componente 2 contribuye a la separación entre los cuatro grupos en el siguiente orden: DC1-CFH1-IP1-SR1. Al momento de realizar las comparaciones post hoc, existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el sitio de referencia y el cinturón florihortícola, entre el sitio de referencia y la industria petroquímica, y entre la industria petroquímica y las descargas cloacales.

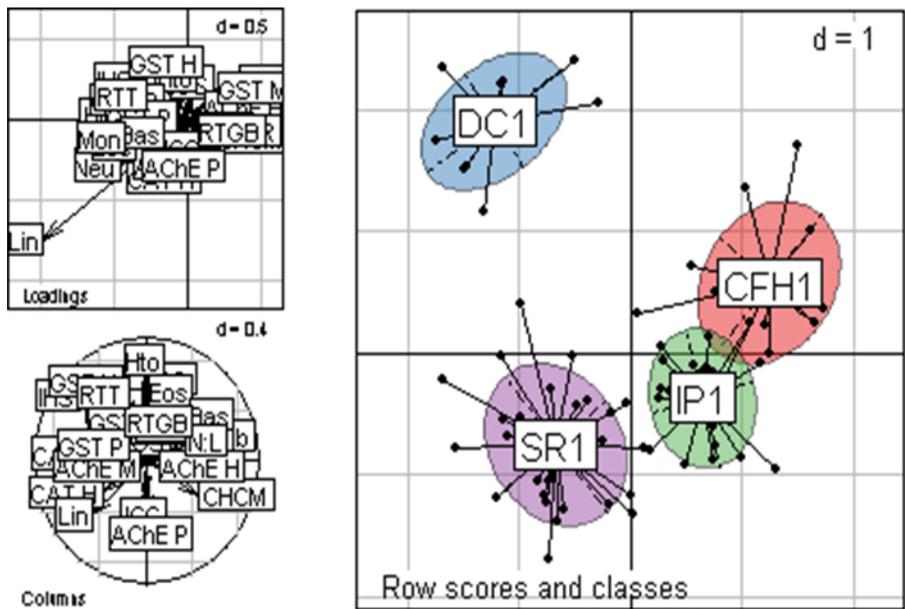


Figura 3.20: Análisis discriminante de *L. lactator* del año 2016. Biplots.

En la figura 3.21 se puede observar la contribución de cada parámetro clínico en las tres primeras dimensiones discriminantes. A partir de la interpretación de los biplots correspondientes al ACP y al análisis discriminante, los histogramas horizontales, las descripciones realizadas al momento de presentar dichos análisis, y el ranqueo generado por el aporte de cada dimensión (ds1, ds2, ds3), pudimos establecer el siguiente ranking general de parámetros que aportaron a la separación de los sitios: Lin, Neu, Eos, Bas, IHS, Mon, N:L, ICG, Hb, CAT en hígado, GST en hígado, GST en músculo y Hto.

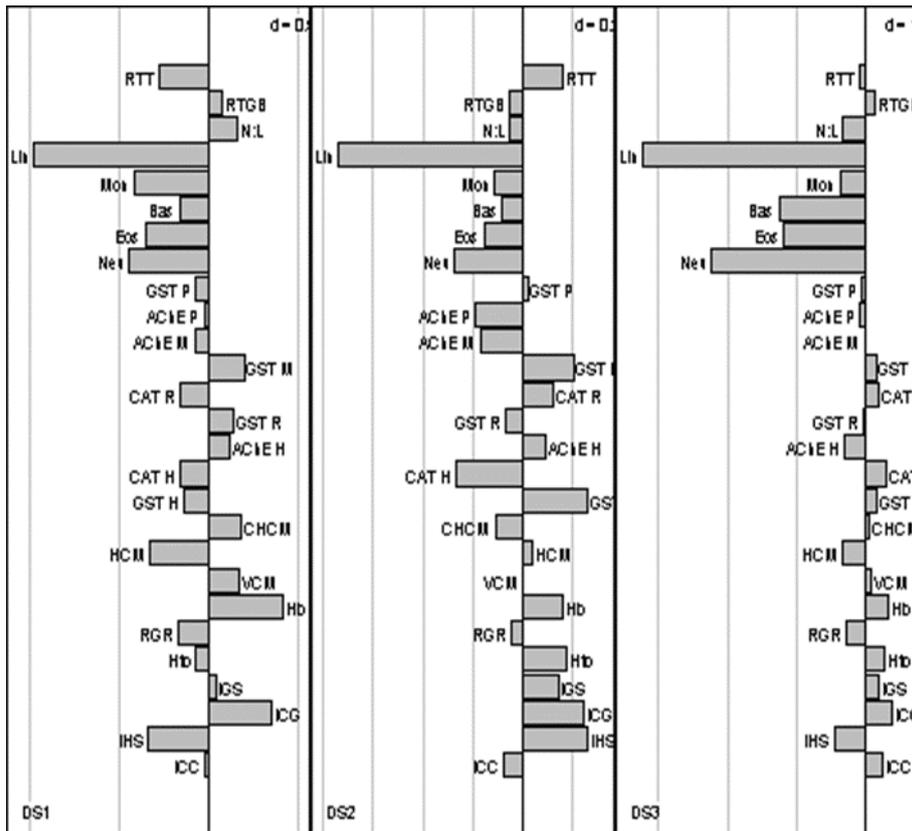


Figura 3.21: Análisis discriminante de *L. luclator* del año 2016. Histogramas horizontales. Se observa la contribución de cada parámetro clínico a cada dimensión discriminante (ds1, ds2, ds3).

Al considerar el enfoque multivariado, a partir de la interpretación de los resultados, pudimos observar que, 18 de los 27 parámetros evaluados (66,6%) resultaron efectivos para diferenciar entre sitios (a nivel individuo ICC, IHS y ICG; a nivel sanguíneo Hto, RGR, Hb y HCM; a nivel bioquímico GST en músculo, CAT en hígado, GST en hígado, AChE en hígado; y a nivel inmunológico Neu, Eos, Bas, Mon, Lin, N:L y RTT). Al interpretar el gráfico de burbujas con la intención de detectar especificidad en la respuesta de los parámetros, pudimos observar que en los casos presentados la disminución de CAT en riñón fue específica para los individuos provenientes de la industria petroquímica (IP1); el aumento de IHS, GST en hígado y RTT fueron específicos para los individuos provenientes de las descargas cloacales, mientras que la disminución de Neu, Eos, Bas, N:L, y el aumento de Lin fueron específicos para individuos provenientes del sitio de referencia (SR1).

3.4 DISCUSIÓN

En el presente capítulo se evaluó la respuesta de 29 parámetros clínicos medidos en individuos de *L. lucifera* provenientes de sitios influenciados por la actividad del cinturón florihortícola, la industria petroquímica, las descargas cloacales y, además, un sitio sin influencia directa de estas actividades (sitio de referencia). Asimismo, se determinó la **condición del individuo** a partir del cálculo de la cantidad de parámetros clínicos con valores afectados que presentó cada individuo; y la **condición del sitio** a partir del cálculo de la proporción de individuos con valores afectados para cada parámetro clínico por sitio. Posteriormente, se realizó un estudio integral para identificar aquellos parámetros que contribuyen a distinguir entre individuos provenientes de los diferentes sitios, y entre individuos afectados y normales, así como detectar cuáles relaciones entre ellos aporta a caracterizar el **estado de salud** de los individuos de cada sitio. Además, se evaluó la efectividad y especificidad de cada parámetro clínico, y se armó un ranking para establecer criterios de valoración de los parámetros que resultaron útiles para separar entre sitios. Este estudio aportó elementos para la construcción de un índice de estado de salud.

La florihorticultura, la industria petroquímica y las descargas cloacales se encuentran entre las actividades antrópicas que producen degradación del medio ambiente a partir de procesos como la contaminación química y pérdida, fragmentación y modificación del hábitat (Vitousek y col., 1997). Estos procesos se encuentran entre los factores que causan la disminución numérica de las poblaciones de anfibios a nivel mundial desde hace más de 20 años (Blaustein y Kiesecker, 2002; Wake y Vredenburg, 2009), por lo que, en este contexto, resulta necesario desarrollar herramientas de diagnóstico para evaluar el estado de las poblaciones naturales de anfibios, para generar información útil que permita conocer cuáles son las poblaciones que están en riesgo y proveer herramientas para protegerlas (Aguirre y col., 2008).

Al momento de evaluar el impacto que las actividades antrópicas generan sobre los organismos, la utilización de biomarcadores evaluados a campo como herramienta de diagnóstico resulta muy valiosa ya que representa un escenario realista de la exposición de los individuos al considerar todos los factores a los que se encuentran expuestos.

Enfoque univariado - Interpretación de los resultados por parámetro

En relación con el objetivo 1 y 2 del presente capítulo, a partir de los resultados obtenidos en el análisis univariado con la realización de los ANOVAs, podemos decir

que existe una influencia de los sitios sobre la mayoría de los parámetros clínicos evaluados en individuos de *L. luctator*. La medición de parámetros como ICC, IHS, ICG, Hto, RGR, Hb, VCM, CHCM, GST en hígado, CAT en hígado, CAT en riñón, AChE en plasma, Neu, Eos, Bas, Mon, Lin, N:L, RTT, MNs, y ANuc resultaron útiles para evidenciar diferencias entre los individuos provenientes del cinturón florihortícola, la industria petroquímica, las descargas cloacales y sitio de referencia.

En cuanto al nivel individuo, un ICC bajo, como el que presentaron los individuos de descargas cloacales y la industria petroquímica, indica una deficiencia en las reservas energéticas, lo que influye negativamente en el crecimiento, mantenimiento y reproducción de los individuos, y reduce la probabilidad de resistencia a las enfermedades, y consecuentemente la supervivencia (Schulte-Hostedde y col., 2005; Gómez-Hoyos y González-Maya, 2008). Un valor elevado de IHS como el que presentaron los individuos de las descargas cloacales puede deberse a un aumento del tamaño del hígado por hiperplasia o a la hipertrofia como una respuesta adaptativa para ampliar su capacidad de desintoxicación de xenobióticos (Arcand-Hoy y Metcalfe 1999). Los resultados aquí presentados coinciden con lo reportado por otros autores en individuos provenientes de sitios afectados por las actividades antrópicas estudiadas en la presente tesis. Por ejemplo, Brodeur y col. (2011), Thammachoti y col (2012) y Peluso y col. (2020) reportaron ICC menores en individuos provenientes de campos cultivados, con uso de agroquímicos; Zhelev y col. (2015) reportaron ICC menores e IHS elevados en individuos provenientes de sitios contaminados por aguas residuales domésticas y metales pesados; Ilizaliturri-Hernández y col. (2013) reportaron ICC menores en individuos que habitan sitios con presencia de plomo; y Porter y Janz (2003) reportaron aumento en el IHS en individuos provenientes de sitio de descargas de aguas residuales.

En cuanto a las anomalías morfológicas evaluadas, si bien no se realizaron estudios más profundos para indicar el tipo de daño que presentan los individuos tanto en la columna vertebral como en el hígado, podemos decir que su presencia es relevante ya que es evidencia directa de un daño (Sparling y col., 2010).

En cuanto al nivel sanguíneo, valores elevados de RGR, Hto y Hb (eritrosis e hiper Cromía) como los que se observan en los individuos provenientes del cinturón florihortícola, la industria petroquímica y/o las descargas cloacales, pueden estar relacionados a la deshidratación por pérdida o baja incorporación de agua, a causa de problemas cardíacos, renales o endócrinos lo que produce un aumento en el nivel de proteínas y células en sangre (policitemia) ; además varios autores reportaron un aumento

en estos parámetros como un mecanismo de compensación ante la hipoxia generada por la exposición a factores de estrés, considerándose un mecanismo de acomodación fisiológica más que un mecanismo de naturaleza patológica, aunque hay que tener en cuenta que este aumento es limitado ya que produce un aumento en la viscosidad de la sangre, pudiendo alterar la circulación sanguínea (Zhelev y col., 2013; Carvalho y col., 2017). El aumento de estos parámetros es una respuesta fisiológica para aumentar la capacidad de transportar oxígeno a los tejidos, para satisfacer la creciente demanda metabólica ocasionada por estrés causado y se traduce como una acomodación fisiológica a largo plazo al contacto permanente con las condiciones de contaminación antropogénica (Zhelev y col., 2013; Carvalho y col., 2017). El aumento en los valores de VCM, como lo observado en los individuos de las descargas cloacales, podría indicar hinchazón de los glóbulos rojos, lo cual puede ocurrir por una falla de la producción de ADN en tiempo normal por la célula, lo que impide su división y lleva a un crecimiento de la misma (Harrison y cl., 2016), o por una falla en la producción de glóbulos rojos por parte de los órganos hematopoyéticos, lo que produce que haya una mayor cantidad de glóbulos rojos maduros (de gran tamaño) sin presencia de nuevas células (Javed y col., 2016). Algo similar ocurre con los valores bajos de CHCM, también ocurrido en individuos de las descargas cloacales. Esto, sumado a un aumento de los valores de VCM, indican un tipo de anemia macrocítica hipocrómica, la cual se produce debido a la detención de la maduración nuclear de los eritrocitos en relación con la madurez citoplasmática y estas anomalías se deben a una síntesis de ADN alterada (Wang y col., 2009). Nosotros consideramos que el aumento generalizado de los parámetros sanguíneos (Hto, RGR, Hb, VCM) en individuos provenientes de sitios afectados por alguna de las actividades antrópicas evaluadas, constituye un indicador de una acomodación fisiológica a los factores de estrés que allí actúan, y también fueron reportados por otros autores (Zhelev y col., 2013; Javed y col., 2016; Carvalho y col., 2017). En peces, se han reportado valores elevados de estos parámetros cuando se encuentran en ambientes con bajos niveles de oxígeno disuelto, por lo que también se asocia a un mecanismo de aumento de la capacidad para transportar oxígeno a los tejidos (Cazenave y col., 2005).

Considerando que los leucocitos constituyen la primera línea de defensa del sistema inmunológico innato de vertebrados, se espera que las infecciones o enfermedades provoquen alteraciones en su concentración (Davis y col., 2008). El aumento en los valores de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y trombocitos y

la disminución de linfocitos, determinan neutrofilia, eosinofilia, basofilia, monocitosis, trombocitosis y linfopenia, respectivamente, lo cual indica una movilización de las fuerzas protectoras del organismo en respuesta al estrés producido por diferentes afecciones (Romanova y Romanova, 2003; Davis y Golladay, 2019; Zhelev y col., 2020). Los neutrófilos participan en la respuesta inmune inespecífica frente a infecciones e intoxicaciones, a partir de la fagocitosis de las bacterias y productos de necrosis de los tejidos. Se considera que la estimulación de la granulocitopoyesis general de neutrófilos en los anfibios puede verse como un mecanismo adaptativo que aumenta la función de defensa al habitar un ambiente contaminado (Fournier y Philpott, 2005), tal como sucede en individuos provenientes del cinturón florihortícola e industria petroquímica. Para los basófilos, eosinófilos y monocitos los individuos del cinturón florihortícola, la industria petroquímica y las descargas cloacales presentaron valores elevados. En cuanto a los basófilos, si bien no hay información concluyente sobre su función, Chernysheva y Starostin (1994) proponen que al ser células que emiten sustancias biológicamente activas, participan en los procesos desintoxicantes. Los eosinófilos participan en la respuesta contra la parasitosis, y además en la defensa antitóxica y antimicrobiana (Shutler y Marcogliese, 2011). Los monocitos, participan activamente en la fagocitosis de agentes extraños y productos de disolución del tejido. De acuerdo con Zhelev (2007), una exposición a largo plazo de contaminantes produce necrosis que genera una mayor cantidad de desechos tisulares y, como consecuencia de esto, aumenta la cantidad de monocitos (y también de neutrófilos) en el torrente sanguíneo. Los valores elevados del índice N:L están relacionados con valores elevados de hormonas de estrés (glucocorticoides), las cuales actúan aumentando el número de neutrófilos, y disminuyendo en número de linfocitos. Davis y col. (2008) realizaron una revisión de la relación positiva que presenta este índice tanto con la magnitud del factor estresante como con los glucocorticoides circulantes y la presencia de enfermedades e infecciones (o las hormonas producidas en respuesta a infecciones) y destacan la importancia en la interpretación de los cambios observados en el recuento diferencial de glóbulos blancos para no caer en el error de atribuirlos a una situación de estrés o a una infección, si bien los dos están relacionados (Al-Murrani y col., 2002, Lindström y col., 2005). En el caso de la linfopenia (disminución de linfocitos) informada en la presente tesis, consideramos que este conteo bajo puede deberse por un lado al aumento de glucocorticoides en plasma, lo que conduce a un índice N:L elevado; y por otro lado, al aumento de los otros tipos celulares. Por último, un aumento en el RTT, como lo que sucedió en individuos

provenientes de las descargas cloacales, podría deberse a la participación en la fagocitosis de material extraño, o a un mecanismo adaptativo de aumento de capacidad de transporte de oxígeno (Galvez Martinez, 2009).

Los aumentos en el número de estos tipos celulares han sido reportados en individuos de la rana *Pelophylax ridibundus* que habitan sitio contaminado con nitratos y fosfatos (Zhelev y col., 2013); individuos de *Rana snk esculenta*, *Scinax squalirostris* y *Leptodactylus mystacinus* que habitan sitios cultivados (Barni y col., 2007; Attademo y col., 2014); individuos de *Rana lessonae*, *Rana ridibunda* y *Rhinella arenarum* que habitan sitios urbanizados (Romanova y Romanova, 2003; Romanova y Egorikhina, 2006; Salinas y col., 2015), individuos de *Lithobates pipiens* expuestos a pesticidas y Hematozoa (Shutler y Marcogliese, 2011), y en individuos de *Rhinella arenarum* expuestos a Cadmio (Medina y col., 2016).

A nivel bioquímico, los parámetros aquí evaluados han sido ampliamente utilizados para evaluar efectos de diferentes compuestos en los anfibios, registrándose tanto inhibiciones como inducciones (Brodeur y col., 2011; Lascano y col., 2011; Ferrari y col., 2011; Attademo y col., 2013; Mardirosian y col., 2015). Como ya se mencionó, GST es una enzima importante en la fase II de biotransformación, al conjugar GSH con xenobióticos para hacerlos polares y facilitar su eliminación (Hayes y Pulford 1995). Por lo tanto, la inducción de esta enzima como se observa en individuos provenientes de la cloaca es lo que se espera luego de la exposición a diferentes contaminantes. Por otro lado, la inhibición de esta enzima como se observa en individuos provenientes de la industria petroquímica puede darse por una disminución en la síntesis de las proteínas a nivel molecular, o por acumulación de los reactivos de reacción, lo que trae como consecuencia la inhibición del proceso de eliminación de xenobióticos. (Hayes y Pulford, 1995).

La catalasa, es una enzima que participa en los mecanismos de desintoxicación, ya que contrarresta los efectos nocivos que producen las especies reactivas de oxígeno derivadas tanto del metabolismo esencial, como del metabolismo de los xenobióticos (Abdollahi y col., .2004), por lo tanto, su inhibición, tal como ocurre en individuos del cinturón florihortícola y la industria petroquímica, es una evidencia de que el mecanismo está fallando, lo que podría conducir a un desequilibrio del estado redox celular, y consecuentemente generar estrés oxidativo.

Por último, la acetilcolinesterasa está presente en la hendidura sináptica y participa en la sinapsis nerviosa, eliminando la acetilcolina mediante su hidrólisis (Reigart y col.,

1999). Si bien es habitual encontrar esta enzima inhibida en individuos expuestos a insecticidas organofosforados y carbamatos (Lascano y col., 2011; Ferrari y col., 2011; Attademo y col., 2014; Barreto y col., 2020), también se ha descrito su inhibición en plasma, como lo reportado en individuos provenientes de las descargas cloacales, en individuos con problemas hepáticos, desnutrición, y expuestos a compuestos como anticonceptivos orales, cocaína, disulfuro de carbono, sales de benzalconio, compuestos orgánicos de mercurio, y solaninas (Reigart y col., 1999).

En cuanto los parámetros a nivel genético, la exposición de los individuos a factores de estrés puede generar roturas en las cadenas de ADN, o modificar porciones de la molécula de ADN mediante diferentes procesos (Newman 2014). El aumento de MNs como se observó en individuos de las descargas cloacales, y de ANuc como lo observado en individuos provenientes del cinturón florihortícola, industria petroquímica y descargas cloacales disminuye el bienestar de los individuos, ya que, a partir del daño en el ADN, se puede producir muerte celular o reparación ineficiente de las células lo que tendrá efectos adversos sobre los organismos (Barni y col., 2007).

La condición del sitio fue determinada contando la cantidad de individuos que presentaron valores afectados para cada parámetro (por fuera del intervalo de referencia). Como se explicó en el capítulo 2, los intervalos de referencia describen las fluctuaciones observadas en poblaciones o individuos sanos para los parámetros clínicos, y están diseñados para usarse como pautas de interpretación y para determinar si un resultado es "normal" o "anormal" para cierto parámetro por lo que constituyen una herramienta importante en la interpretación de los resultados (Gräsbeck, 2004), y consideramos de gran importancia al momento de evaluar efectos en individuos provenientes de sitios potencialmente afectados y sitios potencialmente no afectados por la actividad antrópica. Todos los sitios presentaron al menos el 10% de los individuos con parámetros clínicos con valores afectados, siendo los individuos provenientes de la industria petroquímica y las descargas cloacales los que presentaron mayor porcentaje de individuos afectados para la mayoría de los parámetros.

De la interpretación conjunta de los resultados obtenidos de la realización de los ANOVAs y del cálculo de la condición del sitio, podemos decir que ambos análisis aportan evidencias en el mismo sentido para establecer que los individuos provenientes del cinturón florihortícola, la industria petroquímica y las descargas cloacales se encuentran afectados negativamente (IP>DC>CFH>SR). El sitio de referencia (SR1)

presentó el menor porcentaje de individuos con valores afectados para la mayoría de los parámetros evaluados.

En relación con el objetivo 3, en cuanto a la especificidad de la respuesta de los parámetros clínicos, tal como se indicó en resultados, podemos decir que en los casos correspondientes al presente estudio la inhibición de CAT en riñón es una respuesta específica que caracteriza a los individuos afectados provenientes de la petroquímica; el aumento de IHS, GST en hígado y RTT es una respuesta específica que caracteriza a los individuos afectados provenientes de las descargas cloacales; mientras que los valores bajos de Eos, Bas y N:L y elevados de Lin es una respuesta que caracteriza a los individuos normales provenientes sitio de referencia (figura 3.22).

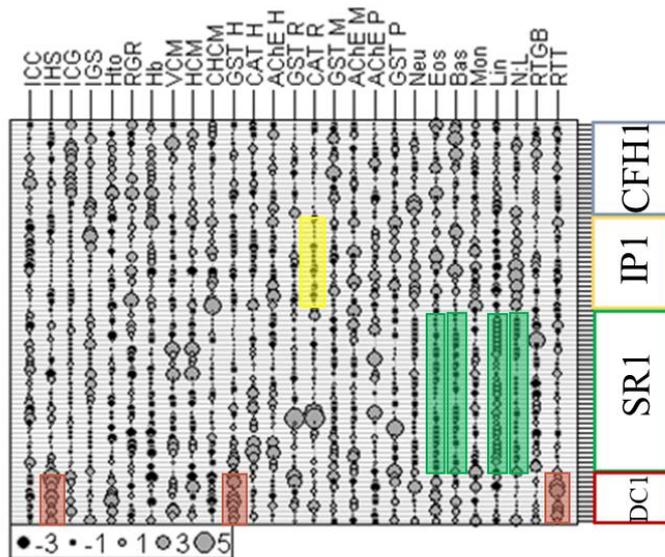


Figura 3.22: Grafico de burbujas donde se puede visualizar la especificidad de respuesta de los parámetros clínicos con un sitio.

En cuanto al objetivo, 5, los resultados obtenidos del análisis de asociación entre los parámetros y los diferentes niveles, nos permitió distinguir una asociación de gran magnitud entre los parámetros a nivel sanguíneo, y entre los parámetros a nivel inmunológico. Esto se debe a que, a nivel sanguíneo, para el cálculo de los tres índices sanguíneos (VCM, HCM y CHCM) se utilizan los parámetros Hto, RGR y Hb; y a nivel inmunológico, el cálculo de los diferentes glóbulos blancos (Neu, Eos, Bas, Mon y Lin) se realiza sobre un total de 100 glóbulos blancos contados. Esto conduce a información redundante y su uso simultaneo no sería conveniente. Sin embargo, aquí proponemos su utilización ya que cada parámetro brinda información relevante sobre los procesos que pueden estar ocurriendo en los organismos.

Efectividad de los parámetros clínicos

En relación con el objetivo 7 y 8, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los análisis univariados y multivariados, se llevó a cabo una comparación de la efectividad de ambos enfoques (tabla 3.6). Esto será utilizado para aportar elementos en la toma de decisión acerca de cuáles son los parámetros clínicos que permiten detectar diferencias entre los sitios evaluados, y por lo tanto serían recomendados para su utilización en un índice de salud.

Tabla 3.6: Efectividad de parámetros al utilizar enfoque univariado y multivariado.

Parámetros	Univariado	Multivariado
ICC	X	X
IHS	X	X
ICG	X	X
IGS		
Hto	X	X
RGR	X	X
Hb	X	X
VCM	X	
HCM		X
CHCM	X	
GST en hígado	X	X
CAT en hígado	X	X
AChE en hígado		X
GST en riñón		
CAT en riñón	X	
GST en músculo		X
AChE en músculo		
AChE en plasma	X	
GST en plasma		
Neutrófilos	X	X
Eosinófilos	X	X
Basófilos	X	X
Monocitos	X	X
Linfocitos	X	X
N:L	X	X
RTGB		
RTT	X	X

La X significa efectividad al evaluar el parámetro.

Como se puede observar en la tabla 3.6, existe coincidencia en los resultados para 19 de los parámetros evaluados. Para cinco de ellos hubo coincidencia en la ausencia de diferencias significativas entre los sitios (IGS, GST en riñón, AChE en músculo, GST en plasma y RTGB); mientras que para 14 de ellos hubo coincidencia en la presencia de diferencias significativas entre sitios (a nivel individuo: ICC, IHS, e ICG; a nivel sanguíneo: Hto, RGR y Hb; a nivel bioquímico: GST en hígado y CAT en hígado; y a

nivel inmunológico: Neu, Eos, Bas, Mon, Lin, N:L y RTT). A partir de esta información proponemos que los 15 parámetros clínicos que coinciden en la presencia de diferencias significativas entre los sitios para ambos enfoques resultan útiles para separar entre sitios.

Caracterización del estado de salud de los individuos provenientes de cada sitio:

Si retomamos el concepto de estado de salud tratado en el capítulo 2 podemos decir que, para abarcar el estudio del estado de salud de los individuos es importante adoptar una visión holística, ya que la salud es un atributo que se aplica principalmente a los individuos como sistemas integrados y complejos. Si bien el estudio de los biomarcadores a nivel subindividuo resulta útil como biomarcador de efecto o de exposición a cierto factor estresante, es probable que la evaluación de estos biomarcadores de forma independiente no proporcione información representativa que permita inferir de manera precisa sobre el estado general de los individuos (Forbes y col., 2006). El estudio integral permite realizar la evaluación de un conjunto de parámetros clínicos de manera simultánea, por lo que su aplicación resulta una herramienta adecuada al momento de evaluar el estado de salud de los individuos ya que involucra diferentes niveles relacionados entre sí y además permite contextualizar e interpretar los resultados en un marco teórico más amplio, facilitando la comprensión sobre los efectos producidos en los individuos provenientes de los diferentes sitios de estudio (Triquet y col., 2013; Newman y col., 2014). El análisis realizado en el presente capítulo permitió evidenciar la separación de los individuos provenientes de los sitios afectados por el cinturón florihortícola, la industria petroquímica y las descargas cloacales de aquellos provenientes del sitio de referencia, y además separar entre individuos afectados y normales, demostrando que la exposición de los individuos de *L. lactator* a la actividad florihortícola, la industria petroquímica y las descargas cloacales, afecta negativamente su estado de salud. Es por esto que, una vez finalizado el análisis a partir de los diferentes enfoques estadísticos y la interpretación de la influencia de los diferentes sitios de estudio sobre los parámetros clínicos evaluados a diferentes niveles, y en relación con el objetivo 6, en esta sección se realizará un diagnóstico del estado de salud de los individuos provenientes de cada sitio.

Los individuos provenientes de CFH1 son los que presentaron el estado de salud menos afectado. Estos se caracterizaron principalmente por valores elevados de ICG, Hto, Hb, Bas; y valores menores de Lin. La suma de evidencias presentadas nos permite determinar que estos individuos se encuentran expuestos a factores de estrés (expresado

por un bajo conteo de linfocitos), probablemente a una infección, lo que causa una activación de sistema inmune con aumento de basófilos en sangre. El factor de estrés al que se encuentran expuestos genera un aumento de los parámetros sanguíneos como una respuesta fisiológica para satisfacer la demanda metabólica de oxígeno por parte de los tejidos.

En cuanto a los individuos provenientes de las descargas cloacales, estos se caracterizaron por presentar, a nivel individuo bajo peso e ICC, y el hígado agrandado (IHS elevado); en cuanto al nivel sanguíneo, presentaron Hto y VCM elevados y CHCM disminuida, a nivel inmunológico presentaron aumento de eosinófilos y RTT, mientras que a nivel bioquímico presentaron aumento de la actividad GST e inhibición de la actividad AChE en plasma. La suma de evidencias de efectos a diferentes niveles incluso de manera integrada para los individuos de las descargas cloacales nos permite determinar que éstos presentan el estado de salud afectado, siendo el hígado el órgano más comprometido. Esto se deduce del hecho de que el hígado presenta un tamaño relativamente alto (IHS elevado) posiblemente como respuesta adaptativa para aumentar la capacidad detoxificante ante la presencia de xenobióticos (aumento actividad GST), además presentan inhibición de AChE en plasma lo que es común en individuos con problemas hepáticos, desnutrición, y expuestos a compuestos como anticonceptivos orales, cocaína, disulfuro de carbono, sales de benzalconio, compuestos orgánicos de mercurio, y solaninas (Reigart y col., 1999). También presentaron elevado número de eosinófilos en sangre (relacionados con procesos infecciosos), valores elevados de VCM los cuales pueden estar relacionados con enfermedades hepáticas, y valores disminuidos de CHCM. Los valores elevados de Hto y RTT, constituyen un indicio de que necesitan aumentar la capacidad de transporte de oxígeno para satisfacer la demanda metabólica de oxígeno por parte del hígado. También es importante destacar que un 36,3% de los individuos provenientes de las descargas cloacales presentó algún tipo de malformación en el hígado, y el 54,5% de los mismos presentó inflamada la columna vertebral.

Los individuos provenientes de la industria petroquímica (IP1) presentaron alteraciones de parámetros a nivel individuo (ICC bajo), nivel sanguíneo (RGR, Hb y CHCM elevadas, y VCM disminuido), nivel bioquímico (CAT en hígado y CAT en riñón inhibidas) y nivel inmunológico (número de Neu, Eos, Bas, Mon y N:L elevados y Lin bajo). La suma de evidencias de efectos a diferentes niveles incluso de manera integrada para los individuos provenientes de la industria petroquímica nos permite determinar que presentan el estado de salud afectado, con el hígado y los riñones como órganos más

comprometidos. Esto se deduce del hecho que presentaron la mayoría de los parámetros inmunológicos afectados, lo que está relacionado con una movilización del sistema inmune en respuesta al estrés producido por diversos factores: presencia de infecciones bacterianas agudas (demanda de neutrófilos en tejidos), daño tisular crónico relacionado a alergias por parasitismo (aumento de eosinófilos), presencia de procesos alérgicos o infecciones (aumento de basófilos), infecciones o inflamaciones con daño tisular y necrosis (aumento de monocitos). Además valores elevados del índice N:L indican elevada concentración de glucocorticoides (hormona de estrés) en plasma. Si bien el aumento en la concentración de los parámetros sanguíneos Hb, RGR y CHCM puede estar asociado a la deshidratación en relación a problemas cardíacos, renales o endócrinos, nosotros proponemos que es una respuesta por parte de los individuos para aumentar la capacidad de transportar oxígeno a los tejidos, y así satisfacer la creciente demanda metabólica que surge del estrés causado. La inhibición de la enzima CAT en riñón, CAT en hígado, GST en hígado indica que estos órganos no son capaces de realizar su actividad detoxificante (GST inhibida) y además existe una falla en la defensa antioxidante (inhibición de CAT). Por lo tanto, al interpretar la información de modo integral, podríamos decir que estos individuos estarían expuestos a un factor de estrés que afecta al hígado y/o los riñones, lo que desencadenaría una movilización del sistema inmune como respuesta al estrés producido, y un aumento de los parámetros sanguíneos para aumentar el transporte de oxígeno a estos u otros tejidos. La presencia de xenobióticos y la activación del sistema inmune como respuesta a una inflamación o infección, produce estrés oxidativo, y la inhibición de la enzima CAT genera que se disminuya la capacidad de neutralizar las especies reactivas de oxígeno, lo que podría generar efectos nocivos en las células y en el organismo.

Por último, el sitio de referencia (SR1) presentó el menor porcentaje de individuos con valores afectados para todos los parámetros clínicos evaluados.

Si tomamos en cuenta el diagnóstico del estado de salud de los individuos que habitan los diferentes sitios de estudio, y que la evaluación del estado de salud de los individuos provenientes del campo, nos permite realizar inferencias sobre la calidad de los ecosistemas que habitan, podemos decir que los individuos provenientes del cinturón florihortícola, la industria petroquímica y las descargas cloacales presentan el estado de salud afectado negativamente, lo que reduce la probabilidad de resistencia a diversos factores de estrés y consecuentemente su supervivencia, por lo que la calidad de estos sitios está afectada.

3.4 CONCLUSIONES

Los resultados del enfoque univariado permitieron evidenciar un efecto de los sitios (cinturón florihortícola, la industria petroquímica, las descargas cloacales y sitio de referencia) sobre la mayoría de los parámetros clínicos evaluados en los individuos de *L. luctator*. La mayoría de los parámetros resultaron **efectivos** para diferenciar entre sitios.

El análisis de componentes principales, el *v* test y el análisis discriminante permitieron detectar la influencia de los sitios sobre los **parámetros clínicos** en particular y también sobre la **condición de los individuos**. Se observó una correspondencia entre los individuos afectados y el cinturón florihortícola (CFH1), la industria petroquímica (IP1) y las descargas cloacales (DC1). Los parámetros resultaron **efectivos** para diferenciar entre sitios.

Al analizar la **especificidad** de respuesta en los casos correspondientes al presente estudio, ambos enfoques permitieron distinguir pocos parámetros que varíen de manera específica en un sitio: la inhibición de CAT en riñón como una respuesta específica que caracteriza a los individuos afectados provenientes de la petroquímica; el aumento de IHS, GST en hígado y RTT como una respuesta específica que caracteriza a los individuos afectados provenientes de las descargas cloacales; y los valores bajos de Eos, Bas y N:L y elevados de Lin como una respuesta que caracteriza a los individuos normales provenientes del sitio de referencia. Además, valores bajos de Neu caracterizaron a individuos provenientes de SR1.

Los resultados del enfoque multivariado permitieron distinguir asociaciones entre algunos parámetros dentro de cada nivel como por ejemplo dentro del nivel sanguíneo, y dentro del nivel inmunológico, lo que indica redundancia en la información. No se encontraron relaciones entre parámetros provenientes de diferentes niveles.

Los principales parámetros clínicos que permitieron detectar diferencias entre los sitios evaluados fueron: ICC, IHS, ICG, Hto, Hb, GST en hígado, CAT en hígado, Neu, Eos, Bas, Mon, Lin, N:L, y RTT.

Considerando todas las líneas de evidencia de manera integrada (los resultados de los análisis, modulados por nuestra percepción a partir de lo aprendido junto con la relevancia biológica y ecotoxicología de la respuesta de cada parámetro) estamos en condición de responder las preguntas ¿Cuál es el sitio que presenta los individuos con el

estado de salud más afectado? y ¿cuáles son los parámetros recomendados para su utilización en un índice de salud? Podemos decir que los individuos provenientes de la industria petroquímica y las descargas cloacales son los individuos que presentan el estado de salud más afectado; y los parámetros clínicos recomendados para la confección de un índice de salud en orden decreciente de relevancia serían: Lin, Neu, Eos, Bas, IHS, Mon, N:L, RTT, ICC, ICG, Hb, CAT en hígado, GST en hígado, GST en músculo, Hto CAT en riñón, y AChE en plasma (ver la confección de este índice más adelante en el capítulo 5).

A partir de los resultados obtenidos en el presente capítulo llegamos a la conclusión que ambos enfoques empleados (**la herramienta propuesta**) han permitido demostrar una relación entre las hipótesis y los objetivos planteados con los resultados obtenidos, todo sustentado por una gran cantidad de información (de calidad, variada) analizada de manera detallada, minuciosa y rigurosa, la que finalmente pudo ser interpretada correctamente contemplando el concepto de consiliencia y el paradigma actual de la ecotoxicología.

Proponemos el protocolo de procesamiento y obtención de muestras y análisis estadístico utilizado como tres piezas de una herramienta para ser empleada en la evaluación del estado de salud de anuros provenientes de sitios alterados por la actividad antrópica.

CAPITULO 4: APLICACIÓN DE LA HERRAMIENTA PROPUESTA. ESTUDIO DE CASOS

4.1 INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior se explicó en detalle el protocolo de procesamiento y obtención de muestras de individuos, el análisis estadístico realizado, y la interpretación de cada parámetro clínico evaluado, como parte de una herramienta para la evaluación del estado de salud de anuros provenientes de sitios alterados por la actividad antrópica. En el mismo, se concluyó que la herramienta presentada puede ser utilizada para tal fin, y basándonos en esa conclusión, el objetivo del presente capítulo es aplicar la herramienta propuesta en diferentes escenarios. Considerando como escenario 1 aquel conformado por individuos de *L. lucinator* colectados en el año 2016 en los sitios SR1, CFH1, IP1 y DC1 (capítulo 3), en el presente capítulo, la herramienta será aplicada en otros 5 escenarios los cuales están conformados por nuevos sitios, e incluso otra especie (*R. arenarum*) y nuevos parámetros clínicos, para determinar el estado de salud de los individuos provenientes de sitios afectados por la actividad florihortícola, la industria petroquímica y las descargas cloacales, además de sitios de referencia, y para conocer si a partir de la evaluación del estado de salud, es posible distinguir entre sitios.

Con la intención de no ser reiterativos y dado que gran parte de la metodología presentada, los procedimientos desarrollados, los análisis estadísticos y las interpretaciones realizadas en estos nuevos escenarios son los mismos que los presentados en el capítulo 3 (escenario 1), se procederá a presentar en cada uno de los nuevos escenarios, el detalle de los diseños de muestreo, y los resultados obtenidos, realizando interpretaciones y discusiones más generales teniendo en cuenta las conclusiones a las que se arribó en el capítulo anterior.

Biomarcadores a nivel plasmático

En el presente capítulo se incorpora la medición de nuevos parámetros clínicos, correspondientes a los parámetros a nivel plasmático.

Las enzimas juegan un papel muy importante en la regulación del metabolismo, ya que cumplen funciones específicas, y comprenden una valiosa herramienta de diagnóstico del estado de salud. Las enzimas tienen ubicación intracelular, algunas están

ampliamente distribuidas, mientras que otras se hallan en elevadas concentraciones en las células ciertos órganos. Existe una pequeña concentración de todas las enzimas en el plasma, como consecuencia de su liberación por las células, o por la reposición celular, pero cuando el nivel plasmático de una enzima es significativamente superior al normal, se debe a que hay un desorden en el órgano u órganos que la contienen. Entre los desórdenes se encuentran la necrosis celular que permite la liberación de las enzimas ya sea por rotura de membrana o por aumento de su permeabilidad, y la inducción de las células a sintetizar más enzimas. El cambio más habitual para evaluar un cambio en el metabolismo es el incremento de las enzimas en plasma, pero a veces una deficiencia de células en un órgano puede provocar una disminución del nivel enzimático en plasma (Da Poian y Castanho, 2015).

En general, se realiza la evaluación de enzimas presentes en el hígado y riñón debido al papel fundamental que tienen estos órganos en el metabolismo de los organismos. El hígado es esencial en el metabolismo de nutrientes, la detoxificación y excreción de metabolitos y xenobióticos, como así en la síntesis de proteínas plasmáticas y la digestión a partir de la síntesis de secreciones biliares, mientras que los riñones funcionan como órgano excretor para la eliminación de desechos metabólicos (Bruyette, 2020). Por otro lado, la medición de parámetros en plasma como iones, proteínas, y otros compuestos del metabolismo son útiles para explicar y diagnosticar los procesos fisiológicos que ocurren en los individuos, y de esta manera detectar desórdenes que pueden estar ocurriendo en diferentes órganos y/o tejidos (Kaneko y col., 1997).

Existen pocas investigaciones que aportan información sobre los efectos que la exposición a los contaminantes empleando parámetros plasmáticos en anuros (Chiesa y col., 2006; Medina y col., 2016), la mayoría se basa en el aporte de información sobre los intervalos de referencia (Cathers y col., 1997; Coppo y col., 2003; Wilson y col., 2011; Young y col., 2012; Forzán y col., 2016).

4.1.1 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Es posible aplicar la herramienta presentada en el capítulo anterior en diferentes escenarios.

Los individuos provenientes de sitios alterados por las actividades antrópicas presentan estado de salud afectado.

Objetivos

- 1- Poner a prueba el protocolo de obtención, procesamiento de muestras, y el posterior análisis estadístico como parte de la herramienta desarrollada en el capítulo anterior para evaluar el estado de salud en anuros.
- 2- Evaluar el estado de salud de los individuos de *L. lucinator* y *R. arenarum* provenientes de sitios alterados por el cinturón florihortícola, industria petroquímica, descargas cloacales, y de sitios de referencia.
- 3- Aportar sugerencias sobre cómo proceder en cada paso de la investigación para evaluar el estado de salud de los anuros.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se determinaron cinco escenarios, los que corresponden a diferentes años, especies, sitios y parámetros evaluados, los cuales se detallan en la tabla 4.1. El escenario 1 corresponde a los individuos de *L. lucinator* colectados en el año 2016 en los sitios SR1, CFH1, IP1 y DC1, descrito y analizado en el capítulo 3 y por lo tanto no está incluido en este capítulo.

Tabla 4.1: Resumen de la conformación de cada escenario.

Escenario	Año	Especie	Sitios	Parámetros	Total parámetros
2	2017	<i>L. lucinator</i>	SR2	Individuo (ICC, IHS, ICG, IGS)	27
			CFH1	Sanguíneo (Hto, RGR, Hb, VCM, HCM, CHCM)	
			IP2	Immunológico (Neu, Eos, Bas, Mon, Lin, N:L, RTGB, RTT)	
			DC2	Bioquímico (GST, CAT, AChE en hígado, riñón, músculo y/o plasma)	
3	2019	<i>L. lucinator</i>	SR3	Individuo (ICC, IHS, ICG, IGS)	35
			SR4	Sanguíneo (Hto, RGR, VCM)	
			DC1	Immunológico (Neu, Eos, Bas, Mon, Lin, N:L, RTGB, RTT) Plasmáticos (20 parámetros)	
4	2017	<i>R. arenarum</i>	SR0	Individuo (ICC, IHS, ICG, IGS)	18
			CFH1	Sanguíneo (Hto, RGR, Hb, VCM, HCM, CHCM)	
			DC3	Immunológico (Neu, Eos, Bas, Mon, Lin, N:L, RTGB, RTT)	
5	2018	<i>R. arenarum</i>	SR0	Individuo (ICC, IHS, ICG, IGS)	18
			IP3	Sanguíneo (Hto, RGR, Hb, VCM, HCM, CHCM)	
			DC3	Immunológico (Neu, Eos, Bas, Mon, Lin, N:L, RTGB, RTT)	
6	2019	<i>R. arenarum</i>	SR0	Individuo (ICC, IHS, ICG, IGS)	35
			IP4	Sanguíneo (Hto, RGR, VCM)	
			IP5	Immunológico (Neu, Eos, Bas, Mon, Lin, N:L, RTGB, RTT) Plasmáticos (20 parámetros)	

4.2.1 Sitios de muestreo y colecta de individuos:

Durante las primaveras de los años 2017 al 2019 (septiembre-noviembre), se llevaron a cabo campañas de muestreo a diferentes sitios de estudio, cada uno de ellos situado en alguna de las problemáticas ambientales estudiadas en la presente tesis (cinturón florihortícola, industria petroquímica, descargas cloacales, y sitios de referencia) y se colectaron adultos machos y hembras de *Leptodactylus luctator* y machos de *Rhinella arenarum*. En el mapa correspondiente a la figura 4.1 y en la tabla 4.1 se pueden observar todos los sitios muestreados en cada escenario.

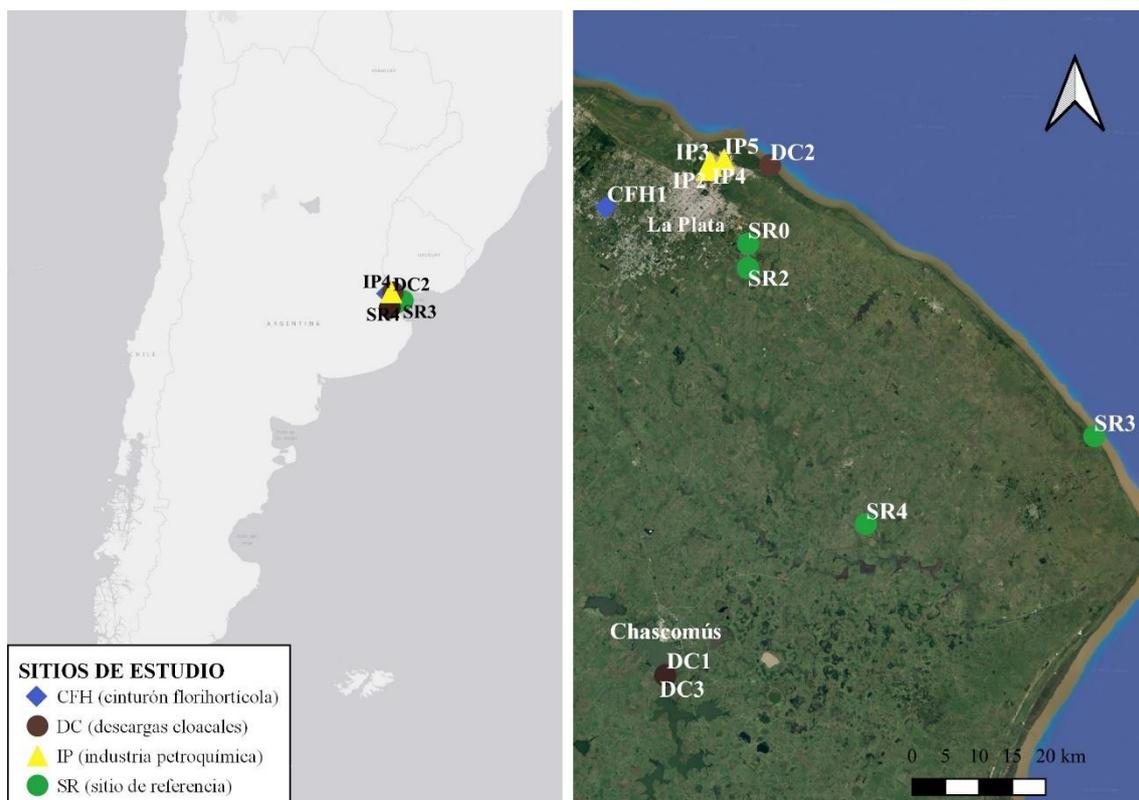


Figura 4.1: Mapa del área de estudio y sitios de muestreo correspondientes a cinturón florihortícola (CFH), descargas cloacales (DC), industria petroquímica (IP) y sitio de referencia (SR).

La colecta de individuos de *L. luctator* se llevó a cabo durante la noche, en el periodo previo a la reproducción de los individuos. Al llegar al sitio, se realizó un recorrido del sitio para detectar la presencia de la especie. Para el caso de *R. arenarum* la colecta se llevó a cabo durante el día, en el momento de la reproducción. La detección de los individuos se llevó a cabo mediante la audición de los coros reproductivos, con la posterior identificación de los individuos al llegar al lugar. Todos los individuos fueron colectados como se mencionó oportunamente en la sección 3.2.1 (página 108). Para la colección de individuos se contó con los permisos correspondientes a Dirección de Flora

y Fauna de la Provincia de Buenos Aires (código 22500-22339/13 disposición 55 y 108 y código 22500-41820/17 disposición 73; DI-2019-101-GDEBA-DFYFMAGP).

4.2.2 Obtención de muestras biológicas y medición de parámetros clínicos:

Para el procesamiento de los individuos, obtención de muestras y medición de parámetros clínicos se siguió el mismo procedimiento realizado en la **sección 3.2.2 del capítulo 3**. Además, para las muestras procesadas en el 2019 también se midieron parámetros a nivel plasmático, cuyo procedimiento fue realizado en colaboración con el Dr. Jorge Pessacq en las instalaciones de su laboratorio bioquímico. Todos los parámetros plasmáticos fueron medidos siguiendo técnicas de International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) (2002, 2010), la sociedad española de química clínica (1989) y Tietz, (2005). utilizando espectrofotómetro automatizado marca Mindray BS 380.

Para la determinación de lactato deshidrogenasa (LDH) se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 1 ml de reactivo de trabajo compuesto por reactivo A (*Tris 100 mmol/L + piruvato 2,75 mmol/L + cloruro de sodio 222 mmol/L a pH 7,2*) y reactivo B (*NADH 1,55 mmol/L + sodio azida 9,5 g/L*), y 20 µl de muestra de plasma. El cambio de absorbancia se registró, pasados 30 segundos, cada 1 minuto durante 3 minutos por espectrofotometría a 340 nm de longitud de onda. Se calculó el incremento de absorbancia por minuto promedio, y se expresó en U/L.

Para la determinación de cretina kinasa (CPK) se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 1 ml de reactivo de trabajo compuesto por reactivo A (*Imidazol 125 mmol/L + EDTA 2 mmol/L + acetato de magnesio 12,5 mmol/L + D-glucosa 25 mmol/L + N-acetilcisteína 25 mmol/L + hexoquinasa 6000 U/L + NADP 2,4 mmol/L a pH 6,7*) y reactivo B (*fosfato de creatina 250 mmol/L + ADP 15 mmol/L + AMP 25 mmol/L + P1,P5-di (adenosina-5'-pentafosfato 100 µmol/L + glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 8000 U/L*), y 50 µl de muestra de plasma. El cambio de absorbancia se registró, pasados 3 minutos, cada minuto durante 3 minutos por espectrofotometría a 340 nm de longitud de onda. Se calculó el incremento de absorbancia por minuto promedio, y se expresó en U/L.

Para para la determinación de alanina aminotransferasa (TGP) se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 1 ml de reactivo de trabajo compuesto por reactivo A (*Tris 150 mmol/L + L-alanina 750 mmol/L + lactatodeshidrogenasa >1350 U/L a pH 7,3*) y

reactivo B (*NADH* 1,9 mmol/L + 2-oxoglutarato 75 mmol/L + hidróxido sódico 148 mmol/L + sodio azida 9,5 g/L), y 50 µl de muestra de plasma. El cambio de absorbancia se registró, pasado 1 minuto, cada minuto durante 3 minutos por espectrofotometría a 340 nm de longitud de onda. Se calculó el incremento de absorbancia por minuto promedio, y se expresó en U/L.

Para la determinación de aspartato aminotransferasa (TGO) se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 1 ml de reactivo de trabajo compuesto por reactivo A (*Tris* 121 mmol/L + *L*-aspartato 362 mmol/L, malato deshidrogenasa > 460 U/L + lactato deshidrogenasa > 660 U/L + hidróxido sódico 255 mmol/L a pH 7,8) y reactivo B (*NADH* 1,9 mmol/L + 2-oxoglutarato 75 mmol/L + hidróxido sódico 148 mmol/L + sodio azida 9,5 g/L), y 50 µl de muestra de plasma. El cambio de absorbancia se registró, pasado 1 minuto, cada minuto durante 3 minutos por espectrofotometría a 340 nm de longitud de onda. Se calculó el incremento de absorbancia por minuto promedio, y se expresó en U/L.

Para la determinación de fosfatasa alcalina (FA) se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 1 ml de reactivo de trabajo compuesto por reactivo A (*Dietanolamina* 1,2 mol/L + *cloruro de magnesio* 0,6 mmol/L a pH 9,8) y reactivo B (*4-Nitrofenilfosfato* 60 mmol/L), y 20 µl de muestra de plasma. El cambio de absorbancia se registró cada minuto durante 3 minutos por espectrofotometría a 405 nm de longitud de onda. Se calculó el incremento de absorbancia por minuto promedio, y se expresó en U/L.

Para la determinación de colesterol total (COL) se utilizó: reactivo A (*Pipes* 35 mmol/L + *colato sódico* 0,5 mmol/L + *fenol* 28 mmol/L + *colesterol esterasa* > 0,2 U/ml + *colesterol oxidasa* > 0,1 U/ml + *peroxidasa* > 0,8 U/ml + *4-aminoantipirina* 0,5 mmol/L a pH 7), un patrón de colesterol (*colesterol* 200 mg/dL (5,18 mmol/L)). Se prepararon 3 tubos de ensayo: 1-Blanco compuesto por 1 ml de reactivo A; 2-Patrón compuesto por 10 µl del patrón + 1 ml del reactivo; 3- Muestra, compuesto por 10 µl de la muestra de plasma + 1 ml de reactivo, y se dejaron incubar durante 10 min a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia del patrón y de la muestra a 500 nm frente al blanco. La concentración de colesterol fue calculada a partir de la siguiente fórmula: $(A_{\text{Muestra}} / A_{\text{Patrón}}) \times C_{\text{Patrón}} = C_{\text{Muestra}}$ y fue expresada en mg/dL.

Para la determinación de lipoproteína de alta densidad (HDL) se utilizó: 3 µl de muestra de plasma, 300 µl de reactivo 1 (*polianión* 1% + *4-AF* 2 Mm), y 100 µl de reactivo 2 (*Tensioactivo no iónico* 0,5% + *colesterol estearasa* > 120 UI/L + *colesterol oxidasa* > 60 UI/L + *peroxidasa* > 500 UI/L + *N,N-bis (4-sulfobutil)-m-toludina* 0,4 mM a pH 5,7). Se mezcló la muestra con el reactivo 1 y se dejó incubar durante 5 minutos,

para luego leer la absorbancia a 600-700 nm. Posteriormente se agregó el reactivo 2 y se repitió la lectura de absorbancia luego de 5 minutos de reposo. La concentración de HDL fue calculada a partir de la siguiente fórmula: $(A_D / A_C) \times C_{\text{Calibrador}} = C_{\text{HDL}}$ y fue expresada en mg/dL.

Para la determinación de triglicéridos (TGC) se utilizó: reactivo A (*Pipes 45 mmol/L + 4-clorofenol 6 mmol/L + acetato magnésico 5 mmol/L + lipasa > 100 U/mL + glicerol quinasa > 1,5 U/mL + glicerol-3-fosfato oxidasa > 4 U/mL + peroxidasa > 0,8 U/mL + 4-aminoantipirina 0,75 mmol/L + ATP 0,9 mmol/L a pH 7*), y un patrón de triglicéridos (*glicerol equivalente a troleina 200 mg/dL (2,26 mmol/L)*). Se prepararon 3 tubos de ensayo: 1-Blanco compuesto por 1 ml de reactivo; 2-Patrón compuesto por 10 µl del patrón + 1 ml del reactivo A; 3- Muestra, compuesto por 10 µl de la muestra de plasma + 1 ml de reactivo A, y se dejaron incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia del patrón y de la muestra a 500 nm frente al blanco. La concentración de triglicéridos fue calculada a partir de la siguiente fórmula: $(A_{\text{Muestra}} / A_{\text{Patrón}}) \times C_{\text{Patrón}} = C_{\text{Muestra}}$ y fue expresada en mg/dL.

La determinación de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) se realizó aplicando la siguiente fórmula: $\text{TGC} / 5$.

Para la determinación de urea (Ur) se utilizó: reactivo A (*Tris 100 mmol/L + 2-oxoglutarato 5,6 mmol/L + ureasa >140 U/mL + glutamato deshidrogenasa >140 U/mL + etilenglicol 200 g/L + sodio azida 0,95 g/L a pH 8*), reactivo B (*NADH 1,5 mmol/L + sodio azida 9,5 g/L*), un patrón de glucosa/urea/creatinina (*glucosa 100 mg/dL + urea 50 mg/dL + creatinina 2 mg/dL*). Se pipeteó 1,5 ml de reactivo de trabajo (formado por reactivo A+ reactivo B) y 10 µl de patrón o muestra. El cambio de absorbancia se registró a los 30 segundos y a los 90 segundos por espectrofotometría a 340 nm de longitud de onda. La concentración de urea fue calculada a partir de la siguiente fórmula: $(A_1 - A_2)_{\text{Muestra}} / (A_1 - A_2)_{\text{Patrón}} \times C_{\text{Patrón}} = C_{\text{Muestra}}$ y fue expresada en mg/dL.

Para la determinación de amilasa (Ami) se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 2 ml de reactivo A (*CNP-G3 2,25 mmol/L + cloruro de calcio 5 mmol/L + cloruro de sodio 70 mmol/L + tiocianato de potasio 900 mmol/L + buffer MES 100 mmol/L a pH 6*), y 100 µl de muestra de plasma. El cambio de absorbancia se registró a los 60 y 120 segundos por espectrofotometría a 405 nm de longitud de onda. La concentración de amilasa fue calculada a partir de la siguiente fórmula: $\Delta A / \text{min} \times \text{factor} (1,628)$ y fue expresada en U/L.

Para la determinación de creatinina (Creat) se utilizó: reactivo A (ácido pícrico 12,7 mmol/l + laurilsulfato de sodio 8,4 mmol/l), reactivo B (borato 53 mmol/l + hidróxido de sodio 970 mmol/l), standard (solución de creatinina 20 mg/l). el reactivo A+B corresponden al reactivo del trabajo. Se prepararon dos cubetas: 1- Estándar (S): 1,2 ml de reactivo de trabajo + 0,2 ml de standard. 2- Desconocido (D): 1,2 ml de reactivo de trabajo + 0,2 ml de muestra de plasma. La absorbancia en ambas cubetas fue medida a los 30 segundos y a los 5 minutos por espectrofotometría a 500 nm de longitud de onda. La concentración de creatinina fue calculada a partir de la siguiente fórmula: $(D_2 - D_1) \times [20\text{mg/L}/(S_2/S_1)]$ y fue expresada en U/L.

Para la determinación de proteínas de baja densidad (LDL) se utilizó: reactivo A (sulfato de polivinilo disuelto en polietilenglicol (PM: 600) al 25%, pH 6,7), colestát enzimático. En un tubo Kahn se colocaron 200 μl , y 100 μl de reactivo A los cuales fueron homogenizados durante 20 segundos, y centrifugados 15 mn a 3000 r.p.m para separar el sobrenadante, el cual fue utilizado como Muestra para el ensayo colorimétrico. Se prepararon 3 tubos: 1-blanco (B): 2 ml de reactivo de trabajo; 2-standard (S): 20 μl de estándar + 2 ml de reactivo de trabajo; 3- Desconocido (D): 100 μl de sobrenadante + 2 ml de reactivo de trabajo. La absorbancia de los tres tubos fue medida a 505 nm, llevando al aparato a cero de absorbancia con el blanco. La concentración de LDL fue calculada a partir de la siguiente fórmula: $(A_D / A_C) \times C_{\text{Calibrador}} = C_{\text{LDL}}$ y fue expresada en mg/dL.

Para la determinación de proteínas totales (PT) se utilizó: reactivo A (complejo EDTA/Cu 13 mmol/L en hidróxido de sodio 875 mmol/L y alquil aril poliéter (AAP)), y Calibrador A plus / Proti 2 Suero Patrón de Wiener lab. Se prepararon 3 tubos: 1-blanco (B): 2 ml de reactivo A; 2-standard (S): 20 μl de calibrador + 2 ml reactivo A; 3- Desconocido (D): 20 μl muestra + 2 ml reactivo A. La absorbancia de los tres tubos fue medida por espectrofotometría a 540 nm, luego de 15 minutos de incubación. La concentración fue calculada a partir de la siguiente fórmula: $(A_D / A_C) \times C_{\text{Calibrador}} = C_{\text{PT}}$ y fue expresada en g/dL.

Para la determinación de albumina (Alb) se utilizó: reactivo A (solución de BCG 0,3 mmol/L + buffer acetato 0,1 mol/L + polioxietilén lauril éter 0,9 g/L); y calibrador A plus / Proti 2 Suero Patrón de Wiener lab. Se prepararon 3 tubos: 1-blanco (B): 2,5 ml reactivo A; 2- Standard (S): 10 μl de calibrador + 2,5 ml reactivo A; 3-Desconocido (D): 10 μl de muestra + 2,5 ml de reactivo A. La absorbancia de los tres tubos fue medida por espectrofotometría a 625 nm luego de 10 minutos de incubación. La concentración fue

calculada a partir de la siguiente fórmula: $(A_D / A_C) \times C_{\text{Calibrador}} = C_{\text{Alb}}$ y fue expresada en g/dL.

A partir de resta entre proteínas totales y albumina, se determinó la concentración de Globulinas (Glob) la cual fue expresada en g/dL.

Para la determinación de calcio (Ca) se utilizó reactivo A (solución de 0.08 mmol/l de o-cresolftaleín complexona + 4 mmol/l de 8-hidroxiquinolina); reactivo B (solución de 3,5 mmol aminometil propanol) y un estándar de calcio (solución de calcio 10 mg/dl). Se prepararon 3 tubos de ensayo: 1- blanco (B) compuesto por 1 ml de reactivo A + 1 ml de reactivo B + 50 µl agua destilada; 2- standard (S) compuesto por 1 ml reactivo A + 1 ml reactivo B + 50 µl standard; y 3- desconocido (D) compuesto por 1 ml reactivo A + 1 ml reactivo B + 50 µl de la muestra. Se dejaron incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 570 nm. La concentración de calcio fue calculada a partir de la siguiente fórmula: $A_D * (10 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1} / A_S)$ (A=absorbancia) y fue expresada en mg/dl.

Para la determinación de fósforo (P) se utilizó reactivo A (solución de molibdato de amonio 2 mmol/l en ácido sulfúrico 1%); y standard (solución estabilizada de fosfatos equivalente a 4 mg/dl de fósforo inorgánico). Se prepararon 3 tubos de ensayo: 1- blanco (B) compuesto por 1 ml de reactivo A; 2- standard (S) compuesto por 1 ml reactivo A + 10 µl standard; y 3- desconocido (D) compuesto por 1 ml reactivo A + 10 µl de la muestra. Se dejaron incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 340 nm, llevando el aparato a cero con el blanco. La concentración de fósforo fue calculada a partir de la siguiente fórmula: $A_D * 4 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1} / A_S$ (A=absorbancia) y fue expresada en mg/dl.

Para la determinación de magnesio (Mg) se utilizó reactivo A (solución de xylidyl blue 0,1 mM y EGTA 0,04 mM en buffer Tris 0,2 M, pH 11,3); y standard (solución de magnesio 3 mg/dl). Se prepararon 3 tubos de ensayo: 1- blanco (B) compuesto por 1 ml de reactivo A + 10 µl de agua destilada; 2- standard (S) compuesto por 1 ml de reactivo A + 10 µl de standard; y 3- desconocido (D) compuesto por 1 ml de reactivo A + 10 µl de la muestra. Se dejaron incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 510 nm llevando el aparato a cero con el blanco. La concentración de magnesio fue calculada a partir de la siguiente fórmula: $A_D * 3 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1} / A_S$ (A=absorbancia) y fue expresada en mg/dl.

4.2.3 Tratamiento de datos y análisis estadístico

Para el tratamiento de los datos y el análisis estadístico se siguió el mismo procedimiento que el realizado en la sección 3.2.3 y 3.2.4 del capítulo 3.

4.3 RESULTADOS

Escenario 2 (*L. luclator* – 2017)

Se logró coleccionar un total de 73 individuos machos y hembras de *L. luclator* provenientes de sitios afectados por la florihorticultura (CFH1; n=14), la industria petroquímica (IP2; n=24) y la descarga de efluentes cloacales (DC2; n=18), y además individuos provenientes de un sitio de referencia (SR2; n=17), en los cuales se evaluaron 29 parámetros clínicos.

A continuación, se presentan los resultados de cada análisis realizado de modo resumido:

Enfoque univariado

Los resultados de los 15 parámetros que mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) al realizar los análisis univariados se muestran en las figuras 4.2, 4.3, 4.4 y 4.5.

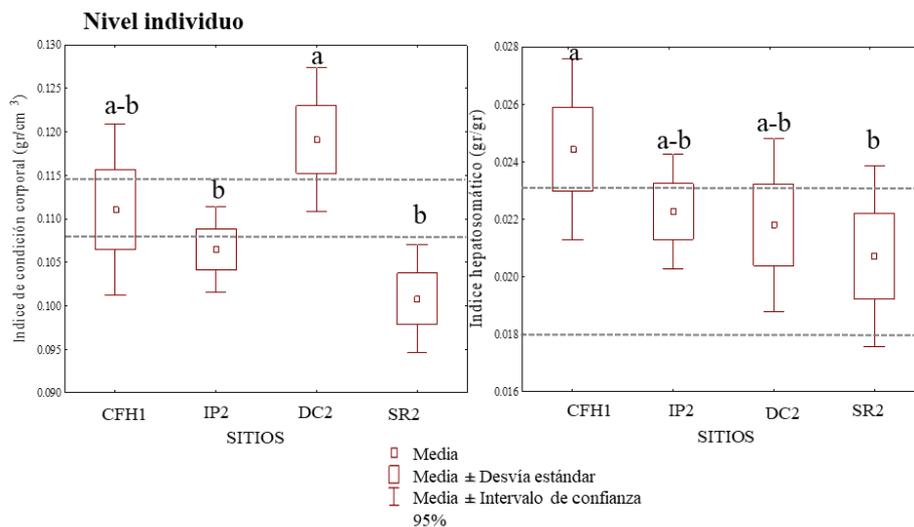


Figura 4.2: Comparación de parámetros a nivel individuo entre los sitios de estudio. CFH1: cinturón florihortícola; IP2: industria petroquímica; DC2: descargas cloacales; SR2: sitio de referencia. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b). Las líneas punteadas corresponden al intervalo de referencia obtenido en el capítulo 2.

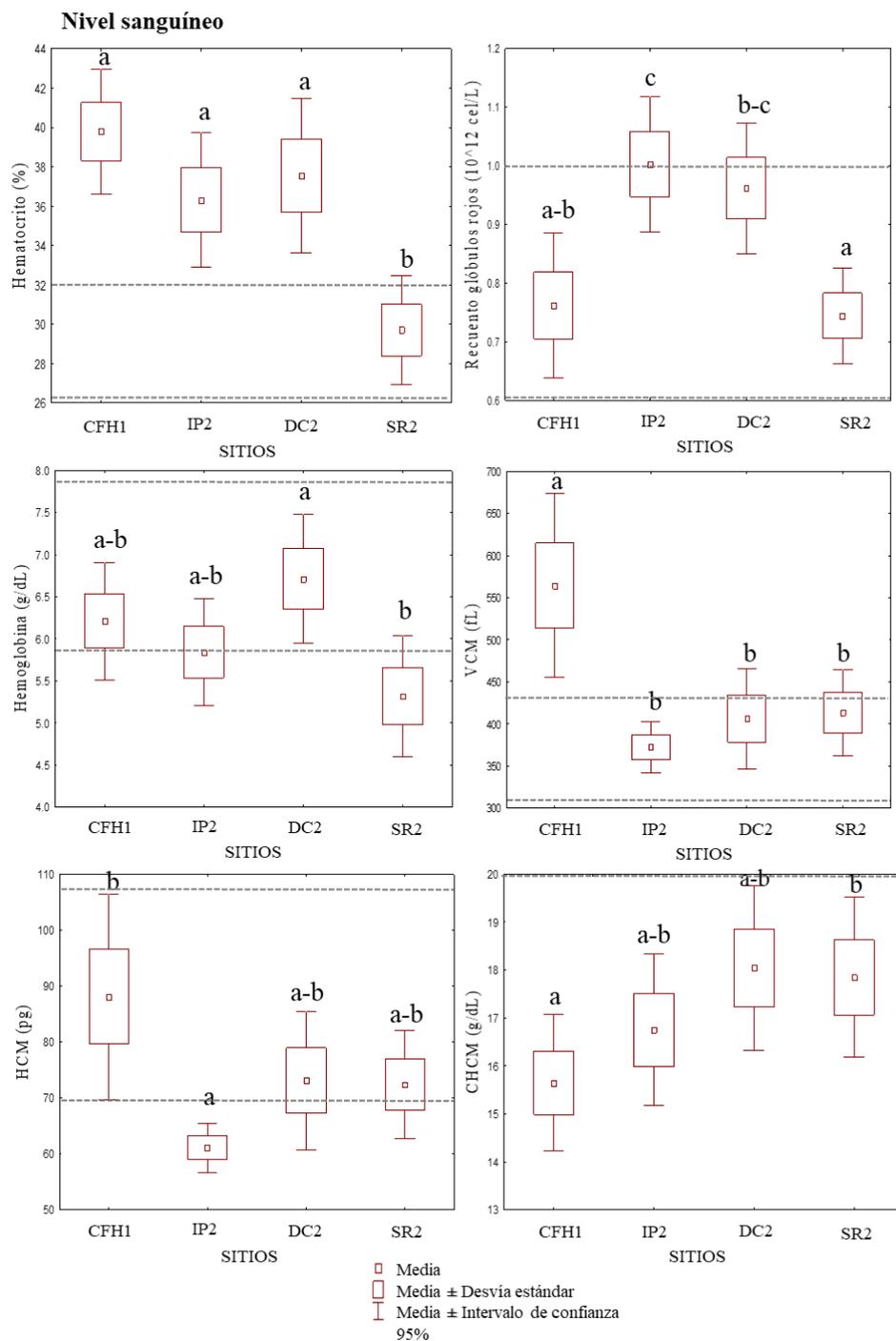


Figura 4.3: Comparación de parámetros a nivel sanguíneo entre los sitios de estudio. CFH1: cinturón florihortícola; IP2: industria petroquímica; DC2: descargas cloacales; SR2: sitio de referencia. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b). Las líneas punteadas corresponden al intervalo de referencia obtenido en el capítulo 2.

Nivel bioquímico

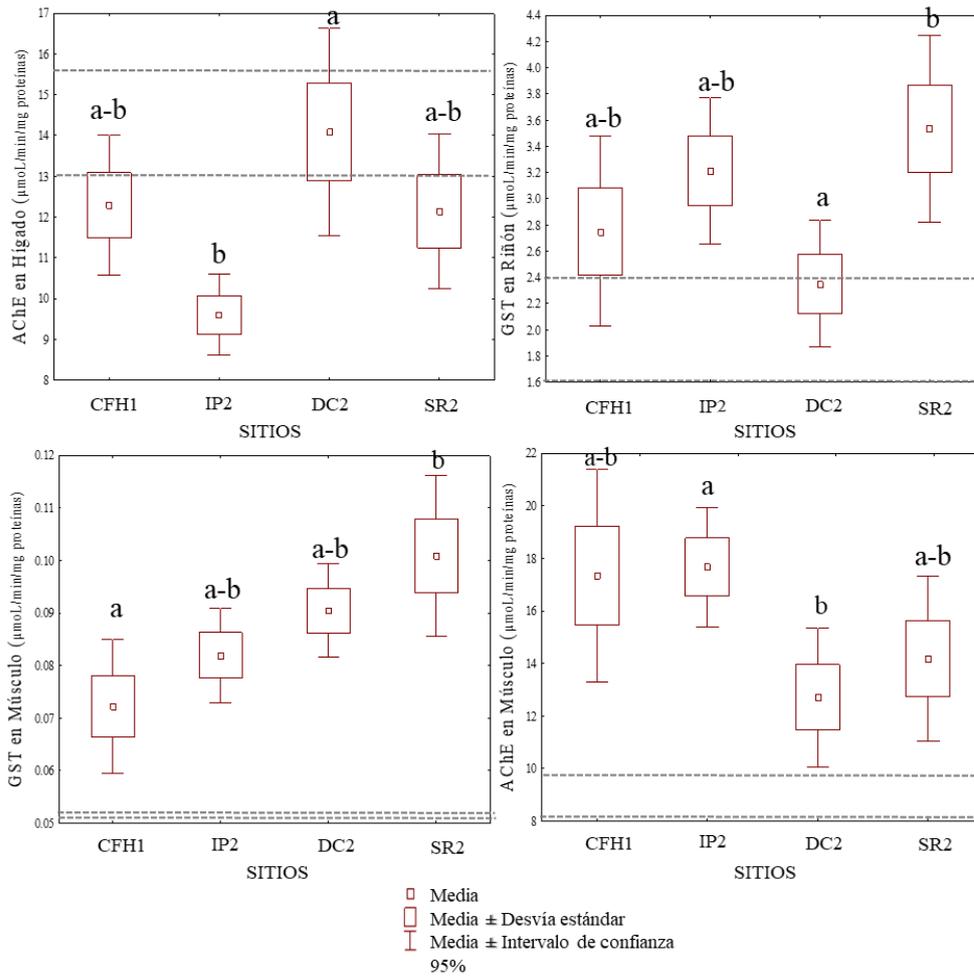


Figura 4.4: Comparación de parámetros a nivel bioquímico entre los sitios de estudio. CFH1: cinturón florihortícola; IP2: industria petroquímica; DC2: descargas cloacales; SR2: sitio de referencia. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b). Las líneas punteadas corresponden al intervalo de referencia obtenido en el capítulo 2.

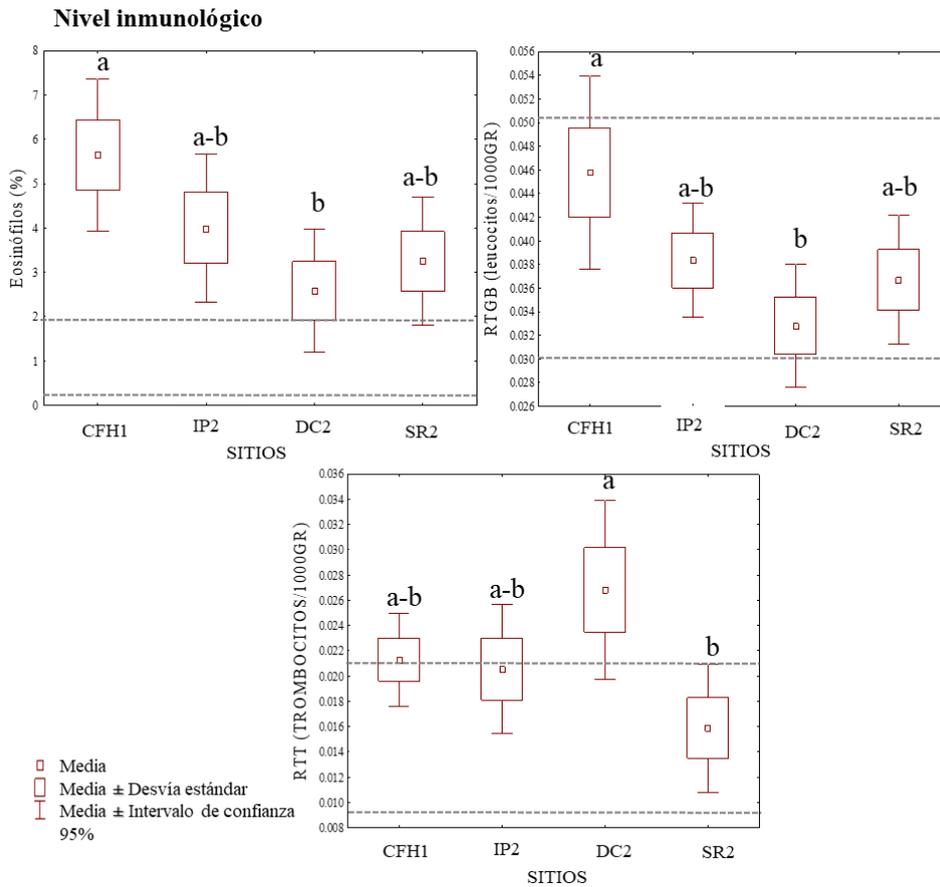


Figura 4.5: Comparación de parámetros a nivel inmunológico entre los sitios de estudio. CFH1: cinturón florihortícola; IP2: industria petroquímica; DC2: descargas cloacales; SR2: sitio de referencia. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b). Las líneas punteadas corresponden al intervalo de referencia obtenido en el capítulo 2.

A continuación, se presentan los resultados de la presencia de anomalías más destacadas: se pudo observar que 4/17 individuos provenientes de DC2 eran machos (presencia de testículos) con caracteres sexuales externos de hembras (miembros anteriores con masa muscular poco desarrollada (figura 4.6).



Figura 4.6: Individuos de *L. lucifator* provenientes del sitio DC2. a: hembra. b: macho con caracteres sexuales secundarios de hembra. c: macho.

Condición del sitio: La tabla 4.2 muestra la cantidad de individuos afectados y normales para cada parámetro.

Tabla 4.2: Cantidad y porcentaje de individuos adultos de *L. lactator* con valores afectados y normales para todos los parámetros.

		ICC	IHS	ICG	IGS	Hto	RGR	Hb	VCM	HCM	CHCM
CFH1	Afectados	11	78.57%	6	42.86%	11	78.57%	5	35.71%	12	85.71%
(n=14)	Normales	3	21.43%	8	57.14%	3	21.43%	9	64.29%	2	14.29%
IP2	Afectados	13	54.17%	9	37.50%	18	75.00%	11	45.83%	12	50.00%
(n=24)	Normales	11	45.83%	15	62.50%	6	25.00%	13	54.17%	12	50.00%
DC2	Afectados	13	76.47%	7	41.18%	11	64.71%	9	52.94%	11	64.71%
(n=17)	Normales	4	23.53%	10	58.82%	6	35.29%	8	47.06%	6	35.29%
SR2	Afectados	13	76.47%	5	29.41%	10	58.82%	2	11.76%	7	41.18%
(n=17)	Normales	4	23.53%	12	70.59%	7	41.18%	15	88.24%	10	58.82%

		GST (H)	CAT (H)	AChE (H)	GST (R)	CAT (R)	GST (M)	AChE (M)	AChE (P)	GST (P)	
CFH1	Afectados	2	14.29%	8	57.14%	10	71.43%	5	35.71%	12	85.71%
(n=14)	Normales	12	85.71%	6	42.86%	4	28.57%	9	64.29%	2	14.29%
IP2	Afectados	13	54.17%	14	58.33%	21	91.30%	10	45.45%	17	77.27%
(n=24)	Normales	11	45.83%	8	33.33%	2	8.70%	12	54.55%	5	22.73%
DC2	Afectados	9	52.94%	13	76.47%	12	70.59%	7	43.75%	12	75.00%
(n=17)	Normales	8	47.06%	4	23.53%	5	29.41%	9	56.25%	4	25.00%
SR2	Afectados	8	47.06%	9	52.94%	14	82.35%	11	68.75%	15	93.75%
(n=17)	Normales	9	52.94%	8	47.06%	3	17.65%	5	31.25%	1	6.25%

		Neu	Eos	Bas	Mon	Lin	N:L	RTGB	RTT
CFH1	Afectados	2	14.29%	9	64.29%	2	14.29%	8	57.14%
(n=14)	Normales	12	85.71%	5	35.71%	12	85.71%	6	42.86%
IP2	Afectados	4	17.39%	7	30.43%	7	30.43%	10	43.48%
(n=24)	Normales	19	82.61%	16	69.57%	16	69.57%	13	56.52%
DC2	Afectados	5	29.41%	3	17.65%	1	5.88%	6	35.29%
(n=17)	Normales	12	70.59%	14	82.35%	16	94.12%	11	64.71%
SR2	Afectados	6	35.29%	3	17.65%	3	17.65%	5	29.41%
(n=17)	Normales	11	64.71%	14	82.35%	14	82.35%	12	70.59%

La evaluación de la condición del sitio mostró que todos los sitios presentaron al menos el 10% de los individuos afectados para cada parámetro.

Parámetros afectados por individuo: En la tabla 4.3 se muestra la cantidad de individuos clasificados por el número de parámetros afectados agrupados por sitio y por nivel.

Tabla 4.3: Cantidad de individuos clasificados por el número de parámetros afectados agrupados por sitio y por nivel.

Nivel individuo (4 parámetros)					Nivel sanguíneo (6 parámetros)				
	<u>CFH1</u>	<u>IP2</u>	<u>DC2</u>	<u>SR2</u>		<u>CFH1</u>	<u>IP2</u>	<u>DC2</u>	<u>SR2</u>
0 parámetros	0	3	1	2	0 parámetros	0	0	0	0
1 parámetro	0	10	3	6	1 parámetro	0	1	1	2
2 parámetros	10	5	10	8	2 parámetros	1	7	3	5
3 parámetros	4	4	2	1	3 parámetros	8	6	7	4
4 parámetros	0	2	1	0	4 parámetros	2	7	6	4
n individuos	14	24	17	17	5 parámetros	2	3	0	2
					6 parámetros	1	0	0	0
					n individuos	14	24	17	17
Nivel bioquímico (9 parámetros)					Nivel inmunológico (8 parámetros)				
	<u>CFH1</u>	<u>IP2</u>	<u>DC2</u>	<u>SR2</u>		<u>CFH1</u>	<u>IP2</u>	<u>DC2</u>	<u>SR2</u>
0 parámetros	0	0	0	0	0 parámetros	1	1	1	3
1 parámetro	0	1	1	0	1 parámetro	3	3	4	2
2 parámetros	1	0	0	1	2 parámetros	3	8	4	5
3 parámetros	4	0	0	2	3 parámetros	3	5	5	2
4 parámetros	3	4	3	1	4 parámetros	2	4	1	4
5 parámetros	2	7	4	4	5 parámetros	1	2	2	0
6 parámetros	2	6	7	5	6 parámetros	1	0	0	1
7 parámetros	2	5	1	2	7 parámetros	0	0	0	0
8 parámetros	0	1	1	2	8 parámetros	0	0	0	0
9 parámetros	0	0	0	0	n individuos	14	24	17	17
n individuos	14	24	17	17					

La comparación de la cantidad de parámetros afectados por individuo mostró que todos los individuos de *L. luctator* provenientes de todos los sitios presentaron al menos un parámetro afectado.

Enfoque multivariado

En la figura 4.7 se pueden observar los diferentes análisis correspondientes al enfoque multivariado.

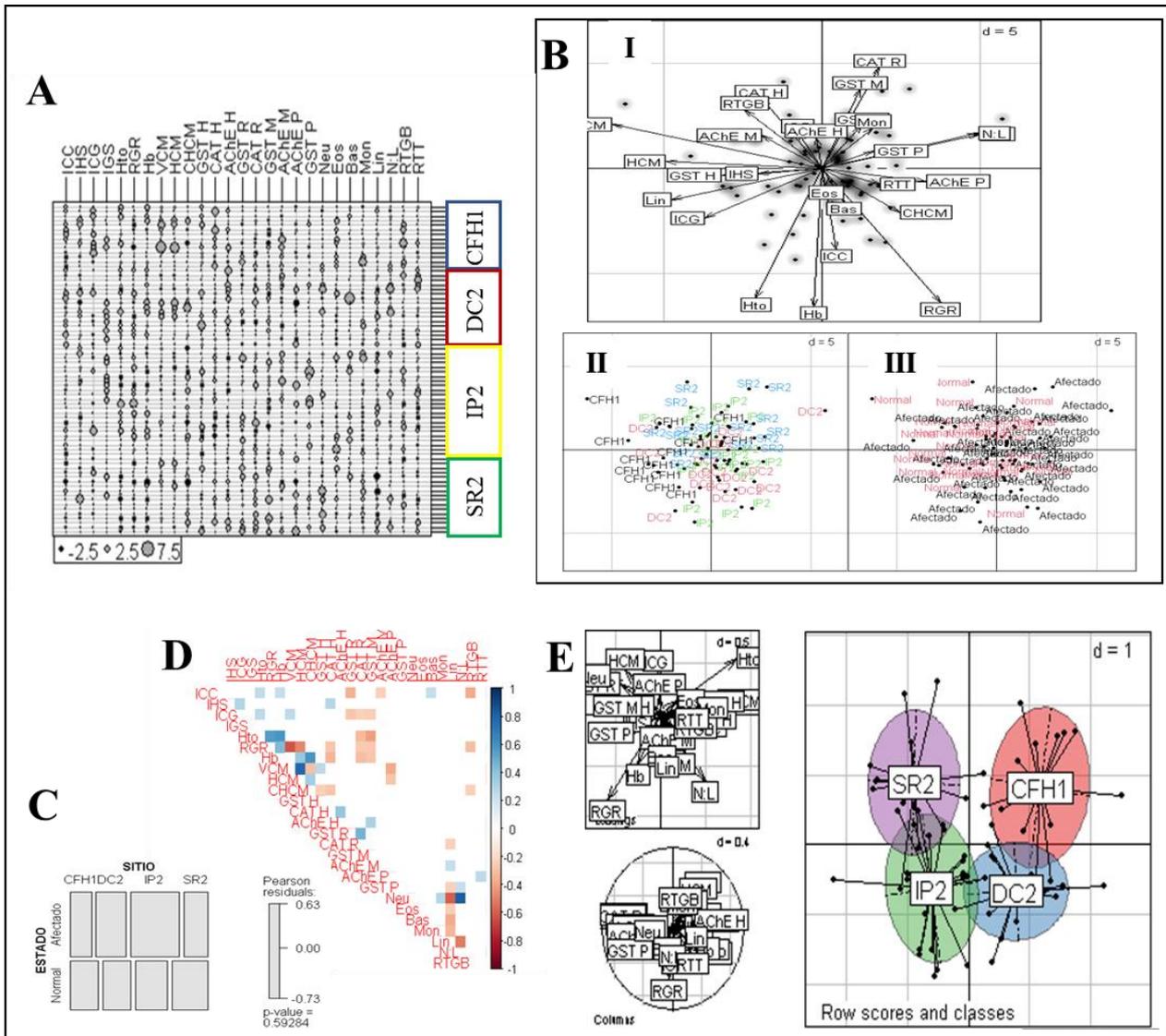


Figura 4.7: Análisis multivariados para escenario 2. A. gráfico de burbujas que representa la magnitud de la distancia de cada valor respecto al centroide. B. Análisis de componentes principales. Biplots. I: contribución de cada uno de los parámetros clínicos en la separación. II: representación gráfica con los rótulos de la variable categórica sitios. III: representación gráfica con los rótulos de la variable categórica condición de los individuos C. Gráfico de bloques. Se muestra la relación entre las variables categóricas “sitios” y “estado de salud”. Tamaño del bloque: frecuencia de ocurrencia. Colores: valores de las pruebas de contingencia (gris: no significativo, azul: significativo por encima del valor normal, y rosa: significativo por debajo del valor normal). D. Diagrama de asociación piramidal. Los colores representan el coeficiente de correlación: azul: +1; rojo: -1; blanco: no significativo ($p > 0,05$). E. Análisis discriminante. Biplots. CFH1: cinturón florihortícola; IP2: industria petroquímica; DC2: descargas cloacales; SR2: sitio de referencia.

En la figura 4.7A se puede observar el gráfico de burbujas el cual es una representación gráfica de los resultados obtenidos, representando cada burbuja un individuo y la magnitud de esa burbuja la magnitud de la distancia de cada valor respecto al centroide. Los resultados del análisis de componentes principales (ACP) se muestran

en la figura 4.7B. En el biplot resultante del ACP, se pudo distinguir una separación entre CFH1 y DC2 del resto de los sitios, aunque muy poco clara. La separación entre los individuos afectados y normales no fue clara. El análisis de contingencia (Figura 4.7C) no mostró resultados significativos. En la Figura 4.7D correspondiente al gráfico de asociación, se puede distinguir que existen en el diagrama dos zonas con un patrón de asociación significativa de gran magnitud: una expresada a nivel sanguíneo, y la otra a nivel inmunológico. El análisis discriminante (Fig 4.7E) mostró una separación significativa ($p < 0,05$) entre los sitios. Sin embargo, al momento de realizar las comparaciones post hoc no existieron diferencias significativas entre grupos, por lo que no hay parámetros que aporten claramente a la separación entre sitios.

Al interpretar los resultados con la intención de detectar especificidad en la respuesta de los parámetros en los casos correspondientes al presente estudio, pudimos observar que la disminución de Hto fue específica para individuos provenientes de la industria petroquímica, mientras que el aumento de VCM fue específico para individuos provenientes del cinturón florihortícola.

A modo de resumen, en la tabla 4.4 se muestran los análisis realizados, y se hace referencia a si cada paso de la herramienta funcionó o no al aplicarla al escenario 2.

Tabla 4.4: Esquema de la herramienta propuesta aplicada al escenario 2.

UNIVARIADO	MULTIVARIADO
Comparación de la respuesta de los parámetros clínicos entre sitios (ANOVA) 	Comparación de respuesta de parámetros entre sitios (ACP y v-test) 
Especificidad (respuesta asociada a un solo sitio Tuckey) 	Especificidad (gráfico de burbujas) 
	Relación entre parámetros y entre niveles (asociación) 
Comparación de la condición del sitio (conteo de individuos afectados por parámetro) 	Comparación de la proporción de individuos afectados (AC) 
Comparación de la condición de los individuos entre sitios (conteo de la cantidad de parámetros afectados por individuos) 	Comparación de condición de los individuos (ACP) 
Efectividad de parámetros (diferencias en ANOVA) 	Efectividad de parámetros (separación de sitios-AD) 

Los círculos naranjas corresponden a un parámetro clínico, y su presencia en uno de los recuadros indica que dicha metodología funcionó. La cruz significa que la metodología no funcionó.

A partir de la información presentada, podemos decir que los resultados presentados para el escenario 2 no son consistentes. Si bien el ANOVA muestra diferencias significativas entre sitios para 14 parámetros clínicos, al realizar los análisis multivariados no se observa una clara separación entre los diferentes sitios ni entre los individuos normales y afectados. En las tablas de individuos afectados para cada parámetro se puede observar que al menos el 10% de los individuos de todos los sitios presentan valores afectados para los parámetros evaluados, por lo que la falta de consistencia en los resultados y la ausencia de resultados significativos para el análisis multivariado podría deberse a que todos los sitios presentan un número considerable de individuos afectados, evidenciado en los porcentajes observados en la tabla 4.2.

Escenario 3 (*L. luctator* – 2019)

Se logró coleccionar un total de 39 machos y hembras de *L. luctator* provenientes de sitios afectados por las descargas cloacales (DC1; n=17), y además individuos provenientes de dos sitios de referencia (SR3; n=12 y SR4; n=10), en los cuales se evaluaron 35 parámetros clínicos.

A continuación, se presentan los resultados de modo resumido:

Enfoque univariado

Los resultados de los 11 de los parámetros que mostraron diferencias significativas entre los sitios ($p < 0,05$) al realizar análisis univariados se muestran en las figuras 4.8, 4.9, 4.10.

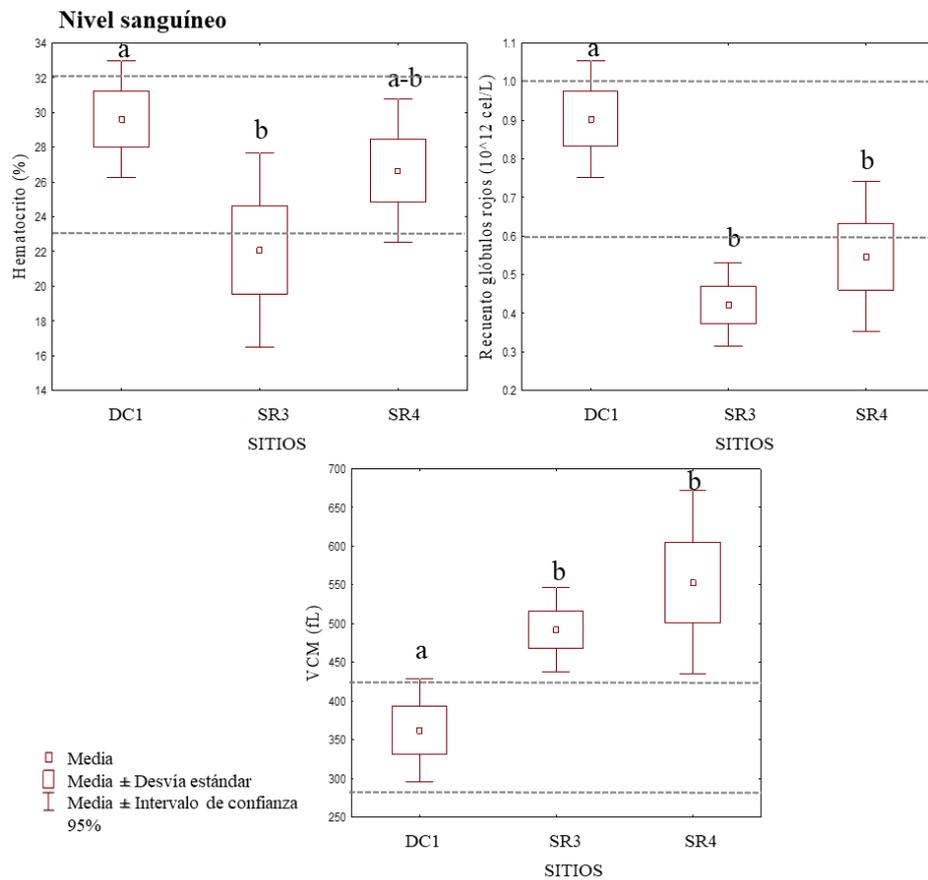


Figura 4.8: Comparación de parámetros a nivel sanguíneo entre los sitios de estudio. DC1: descargas cloacales; SR3: sitio de referencia; SR4: sitio de referencia. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b). Las líneas punteadas indican el intervalo de referencia obtenido en el capítulo 2.

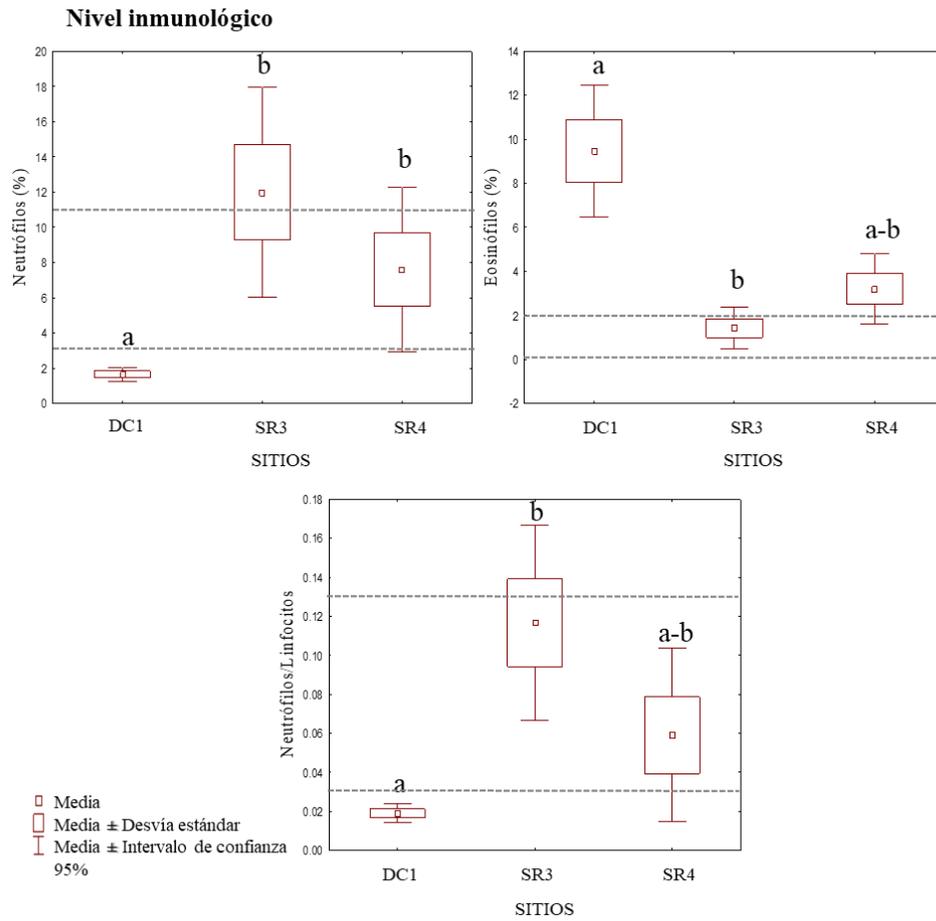


Figura 4.9: Comparación de parámetros a nivel inmunológico entre los sitios de estudio. DC1: descargas cloacales; SR3: sitio de referencia; SR4: sitio de referencia. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b). Las líneas punteadas indican el intervalo de referencia obtenido en el capítulo 2.

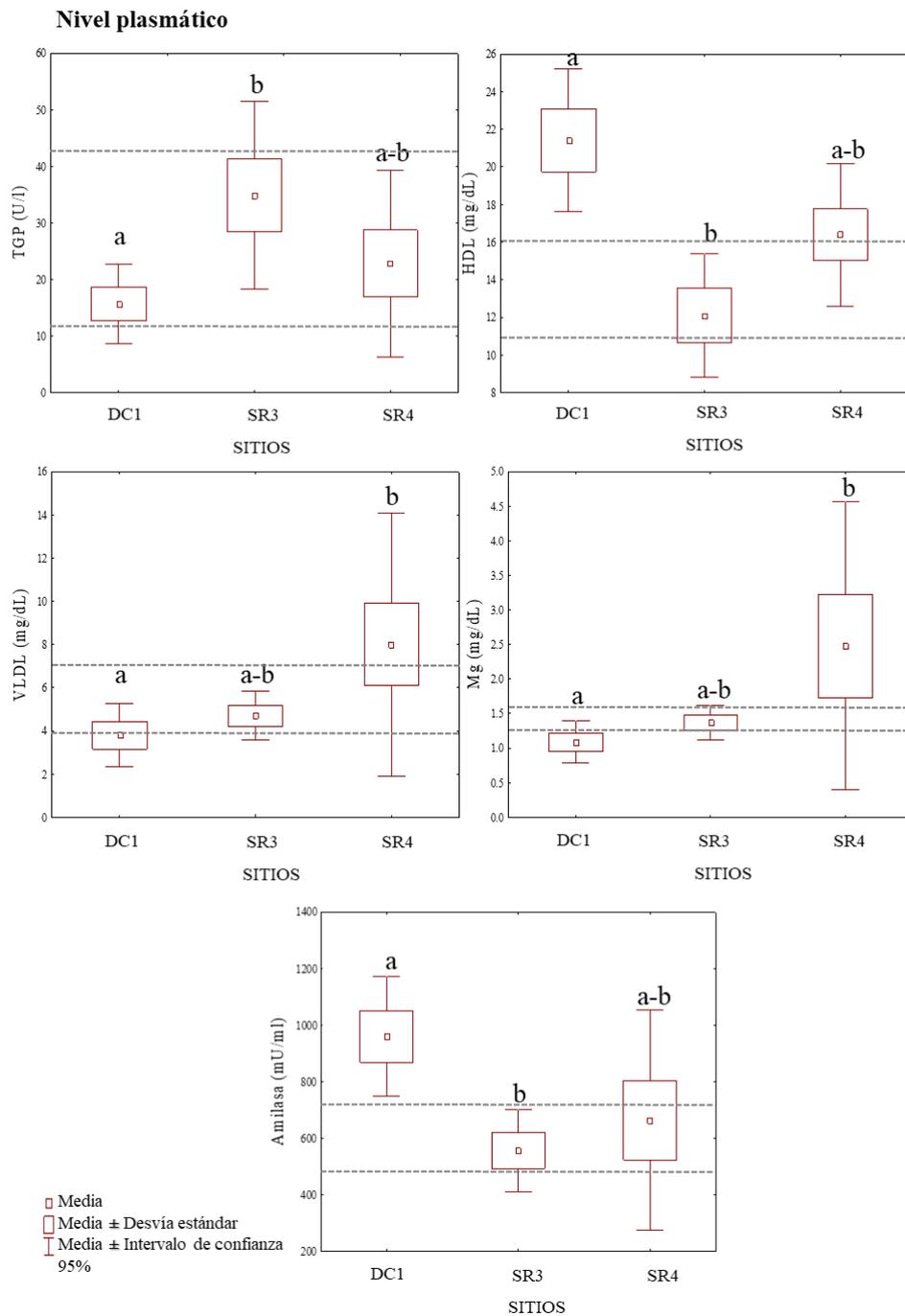


Figura 4.10: Comparación de parámetros a nivel plasmático entre los sitios de estudio. DC1: descargas cloacales; SR3: sitio de referencia; SR4: sitio de referencia. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b). Las líneas punteadas indican el intervalo de referencia obtenido en el capítulo 2.

Al considerar las anomalías morfológicas, se pudo observar que 2/17 individuos provenientes de DC1 presentaron la columna vertebral inflamada (figura 4.11)

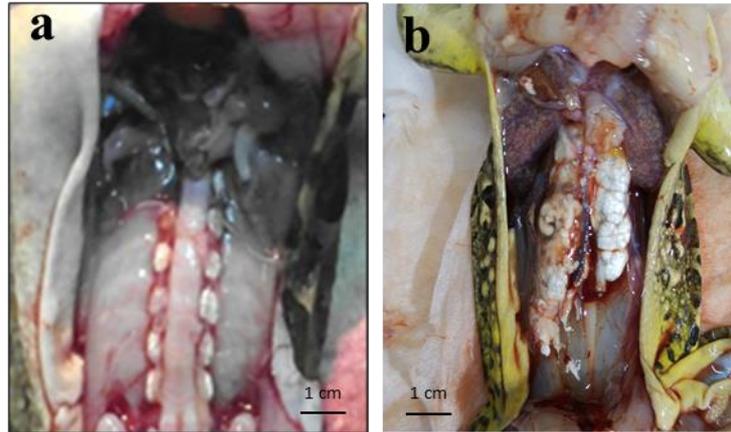


Figura 4.11: Columna vertebral de adultos *L. luctator*. a: normal, de individuo proveniente de sitio de referencia (SR4). b: afectada, de individuos provenientes de DC1.

Condición del sitio: La tabla 4.5 muestra la cantidad de individuos afectados y normales para cada parámetro.

Tabla 4.5: Cantidad y porcentaje de individuos adultos de *L. luctator* con valores afectados y normales para todos los parámetros

		ICC		IHS		IGS		Hto		RGR		VCM											
SR3	Afectados	5	41.67%	5	41.67%	5	41.67%	7	58.33%	9	75.00%	9	75.00%										
(n=12)	Normales	7	58.33%	7	58.33%	7	58.33%	5	41.67%	3	25.00%	2	16.67%										
SR4	Afectados	4	40.00%	1	10.00%	3	30.00%	3	30.00%	6	60.00%	7	70.00%										
(n=10)	Normales	6	60.00%	9	90.00%	7	70.00%	7	70.00%	4	40.00%	3	30.00%										
DC1	Afectados	14	82.35%	6	35.29%	2	11.76%	5	29.41%	4	23.53%	5	29.41%										
(n=17)	Normales	3	17.65%	11	64.71%	15	88.24%	12	70.59%	13	76.47%	12	70.59%										
		Neu		Eos		Bas		Mon		Lin		N:L		RTGB		RTT							
SR3	Afectados	3	25.00%	1	8.33%	1	8.33%	0	0.00%	3	25.00%	7	58.33%	3	25.00%	6	50.00%						
(n=12)	Normales	9	75.00%	11	91.67%	11	91.67%	12	100.00%	9	75.00%	5	41.67%	9	75.00%	6	50.00%						
SR4	Afectados	2	20.00%	3	30.00%	0	0.00%	0	0.00%	4	40.00%	7	70.00%	2	20.00%	4	40.00%						
(n=10)	Normales	8	80.00%	7	70.00%	10	100.00%	10	100.00%	6	60.00%	3	30.00%	8	80.00%	6	60.00%						
DC1	Afectados	0	0.00%	13	76.47%	1	5.88%	1	5.88%	3	17.65%	15	88.24%	6	35.29%	9	52.94%						
(n=17)	Normales	17	100.00%	4	23.53%	16	94.12%	16	94.12%	14	82.35%	2	11.76%	11	64.71%	8	47.06%						
		LDH		CPK		TGP		TGO		FA		PT		Alb		Glob		A/G					
SR3	Afectados	5	62.50%	6	60.00%	2	33.33%	5	55.56%	3	33.33%	4	40.00%	3	30.00%	3	30.00%	6	60.00%				
(n=10)	Normales	3	37.50%	4	40.00%	4	66.67%	4	44.44%	6	66.67%	6	60.00%	7	70.00%	7	70.00%	4	40.00%				
SR4	Afectados	2	66.67%	3	60.00%	1	20.00%	1	20.00%	3	60.00%	3	60.00%	0	0.00%	0	0.00%	1	20.00%				
(n=5)	Normales	1	33.33%	2	40.00%	4	80.00%	4	80.00%	2	40.00%	2	40.00%	5	100.00%	5	100.00%	4	80.00%				
DC1	Afectados	6	66.67%	4	44.44%	3	33.33%	4	40.00%	1	10.00%	3	30.00%	0	0.00%	2	22.22%	2	22.22%				
(n=10)	Normales	3	33.33%	5	55.56%	6	66.67%	6	60.00%	9	90.00%	7	70.00%	9	100.00%	7	77.78%	7	77.78%				
		COL		TGC		HDL		LDL		VLDL		Ca		P		Mg		Creat		Ur		Ami	
SR3	Afectados	4	40.00%	4	40.00%	4	40.00%	4	40.00%	0	0.00%	2	20.00%	4	40.00%	1	10.00%	1	10.00%	3	33.33%	4	40.00%
(n=10)	Normales	6	60.00%	6	60.00%	6	60.00%	6	60.00%	9	100.00%	8	80.00%	6	60.00%	9	90.00%	9	90.00%	6	66.67%	6	60.00%
SR4	Afectados	2	40.00%	1	33.33%	2	40.00%	1	25.00%	2	50.00%	1	25.00%	2	50.00%	1	25.00%	1	25.00%	0	0.00%	3	60.00%
(n=5)	Normales	3	60.00%	2	66.67%	3	60.00%	3	75.00%	2	50.00%	3	75.00%	2	50.00%	3	75.00%	3	75.00%	5	100.00%	2	40.00%
DC1	Afectados	2	20.00%	7	70.00%	7	70.00%	3	30.00%	3	30.00%	4	44.44%	4	44.44%	6	60.00%	6	60.00%	2	18.18%	6	66.67%
(n=10)	Normales	8	80.00%	3	30.00%	3	30.00%	7	70.00%	7	70.00%	5	55.56%	5	55.56%	4	40.00%	4	40.00%	9	81.82%	3	33.33%

La evaluación de la condición del sitio mostró que todos los sitios presentaron al menos el 10% de los individuos afectados para cada parámetro. A partir de los resultados de ANOVA mostrados en las páginas 167-170 donde se observan los parámetros que mostraron diferencias significativas entre sitios, al contar el número de individuos afectados por sitio para dichos parámetros, pudimos observar que los sitios SR3 y DC1 fueron los que presentan mayor cantidad de individuos afectados.

Parámetros afectados por individuo: En la tabla 4.6 se muestra la cantidad de individuos clasificados por el número de parámetros afectados agrupados por sitio y por nivel.

Tabla 4.6: Cantidad de individuos clasificados por el número de parámetros afectados agrupados por sitio y por nivel.

Nivel individuo (3 parámetros)				Nivel sanguíneo (3 parámetros)			
	SR3	SR4	DC1		SR3	SR4	DC1
0 parámetros	0	3	3	0 parámetros	0	1	9
1 parámetro	5	6	7	1 parámetro	3	3	2
2 parámetros	7	1	6	2 parámetros	5	5	6
3 parámetros	0	0	1	3 parámetros	4	1	0
n individuos	12	10	17	n individuos	12	10	17
Nivel inmunológico (8 parámetros)				Nivel plasmático (20 parámetros)			
	SR3	SR4	DC1		SR3	SR4	DC1
0 parámetros	1	1	0	2 parámetros	0	0	1
1 parámetro	3	1	0	3 parámetros	1	0	2
2 parámetros	3	3	7	4 parámetros	1	1	0
3 parámetros	5	5	7	5 parámetros	2	2	2
4 parámetros	0	0	3	6 parámetros	1	0	0
5 parámetros	0	0	0	7 parámetros	0	1	3
6 parámetros	0	0	0	8 parámetros	2	0	1
7 parámetros	0	0	0	9 parámetros	2	0	0
8 parámetros	0	0	0	10 parámetros	0	1	0
n individuos	12	10	17	12 parámetros	0	0	1
				13 parámetros	1	0	0
				16 parámetros	0	0	1
				n individuos	10	5	11

Enfoque multivariado

En la figura 4.12 se pueden observar los diferentes análisis correspondientes al enfoque multivariado.

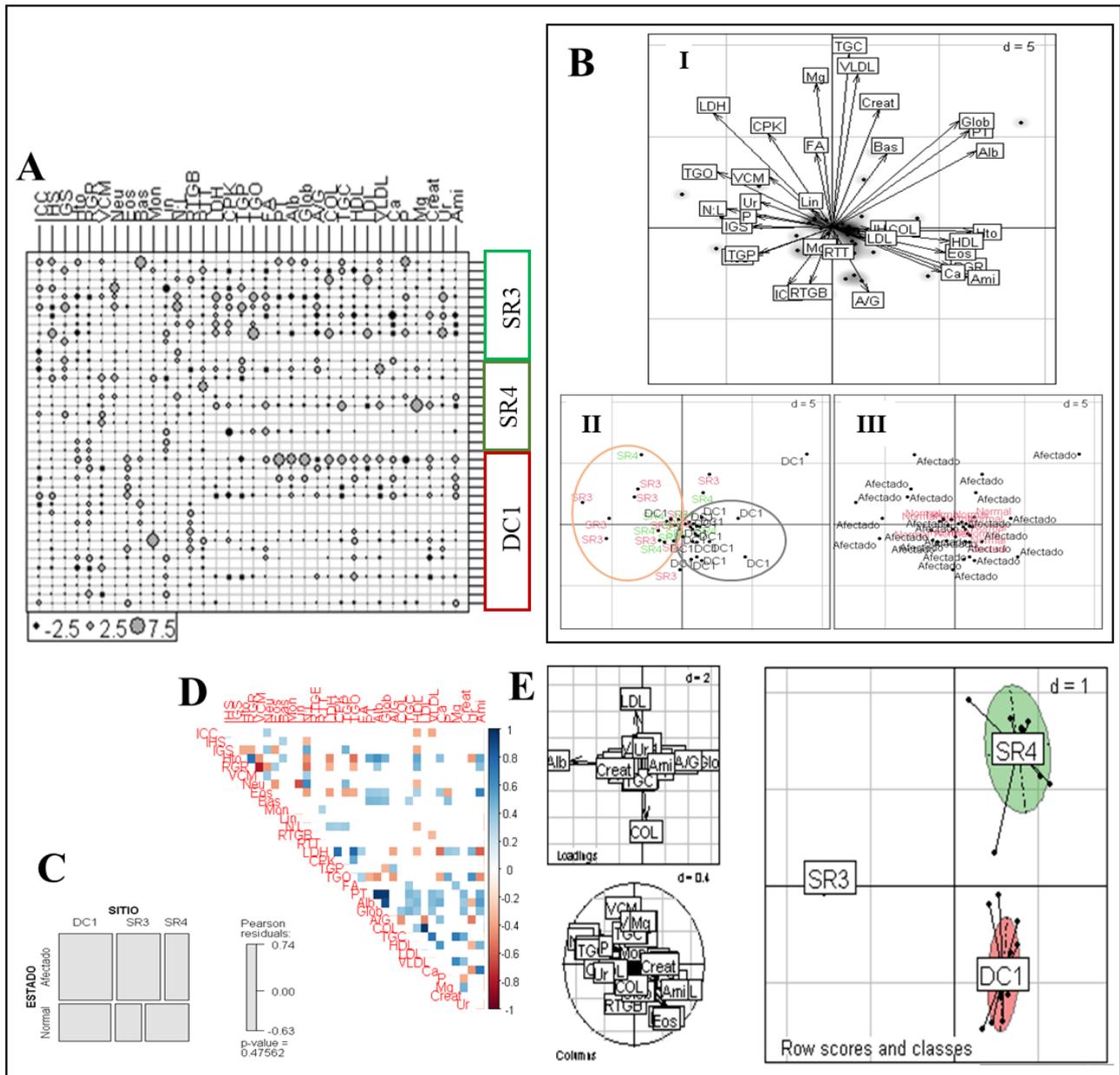


Figura 4.12: Análisis multivariados para escenario 3. A. gráfico de burbujas que representa la magnitud de la distancia de cada valor respecto al centroide. B. Análisis de componentes principales. Biplots. I: contribución de cada uno de los parámetros clínicos en la separación. II: representación gráfica con los rótulos de la variable categórica sitios. III: representación gráfica con los rótulos de la variable categórica condición de los individuos C. Gráfico de bloques. Se muestra la relación entre las variables categóricas “sitios” y “estado de salud”. Tamaño del bloque: frecuencia de ocurrencia. Colores: valores de las pruebas de contingencia (gris: no significativo, azul: significativo por encima del valor normal, y rosa: significativo por debajo del valor normal). D. Diagrama de asociación piramidal. Los colores representan el coeficiente de correlación: azul: +1; rojo: -1; blanco: no significativo ($p > 0,05$). E. Análisis discriminante. Biplots. SR3: sitio de referencia. SR4: sitio de referencia. DC1: descargas cloacales.

En la figura 4.12A se puede observar el gráfico de burbujas. Los resultados del análisis de componentes principales (ACP) se muestran en la figura 4.12B. En el biplot resultante, se distinguió una separación de los individuos provenientes de las descargas cloacales (DC1) y los dos sitios de referencia (SR3 y SR4). Además, al graficar los rótulos de la variable **condición del individuo** y analizar el biplot, se pudo observar que existe

una separación entre individuos afectados y normales, con una correspondencia de la mayoría de los individuos afectados con los individuos de las descargas cloacales (DC1) y uno de los sitios de referencia (SR3). El análisis de contingencia (Figura 4.12C) no mostró resultados significativos. En la Figura 4.12D correspondiente al gráfico de asociación, se pudo distinguir tres zonas con un patrón de asociación significativa de gran magnitud: una expresada dentro del nivel sanguíneo, otra dentro del nivel inmunológico, y otra expresada en el nivel plasmático. El análisis discriminante (Fig 4.12E) no mostró una separación significativa ($p>0,05$) entre los sitios, si bien en el gráfico se puede distinguir una separación entre los 3 grupos.

Al interpretar los resultados de los análisis con la intención de detectar especificidad en la respuesta de los parámetros en los casos correspondientes al presente estudio, se observó que el aumento de RGR, junto con la disminución de VCM y de Neu fueron específicos para individuos provenientes de DC1.

A modo de resumen, en la tabla 4.7 se muestran los análisis realizados, y se hace referencia a si cada paso de la herramienta presentada funcionó o no al aplicarlo al escenario 3.

Tabla 4.7: Esquema de la herramienta propuesta aplicada al escenario 3.

UNIVARIADO	MULTIVARIADO
Comparación de la respuesta de los parámetros clínicos entre sitios (ANOVA) 	Comparación de respuesta de parámetros entre sitios (ACP y v-test) 
Especificidad (respuesta asociada a un solo sitio Tukey) 	Especificidad (gráfico de burbujas) 
	Relación entre parámetros y entre niveles (asociación)
Comparación de la condición del sitio (conteo de individuos afectados por parámetro) 	Comparación de la proporción de individuos afectados (AC) 
Comparación de la condición de los individuos entre sitios (conteo de la cantidad de parámetros afectados por individuos) 	Comparación de condición de los individuos (ACP) 
Efectividad de parámetros (diferencias en ANOVA) 	Efectividad de parámetros (separación de sitios-AD) 

Los círculos naranjas corresponden a un parámetro clínico, y su presencia en uno de los recuadros indica que dicha metodología funcionó. La cruz significa que la metodología no funcionó. El tick significa que la metodología funcionó.

A partir de la información presentada podemos decir que, si bien no es tan clara, existe una separación de los sitios evaluados al observar los biplot, y también entre los individuos afectados y normales. Además, existe una correspondencia entre los individuos afectados y los individuos provenientes del SR3 y DC1. Al considerar los parámetros que mostraron diferencias significativas entre los sitios al realizar los ANOVAs, pudimos observar que el sitio de referencia (SR3) y las descargas cloacales (DC1) presentaron el mayor porcentaje de individuos con valores afectados.

Escenario 4 (*Rhinella arenarum* – 2017)

Se logró coleccionar un total de 32 machos de *R. arenarum* provenientes de sitios afectados por la florihorticultura (CFH1; n=11), las descargas de efluentes cloacales (DC3; n=11), y además individuos provenientes de un sitio de referencia (SR0; n=10), en los cuales se evaluaron 20 parámetros clínicos.

A continuación, se presentan los resultados de modo resumido:

Enfoque univariado

Los resultados de los 12 parámetros que mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) al realizar los análisis univariados se muestran en las figuras 4.13, 4.14 y 4.15.

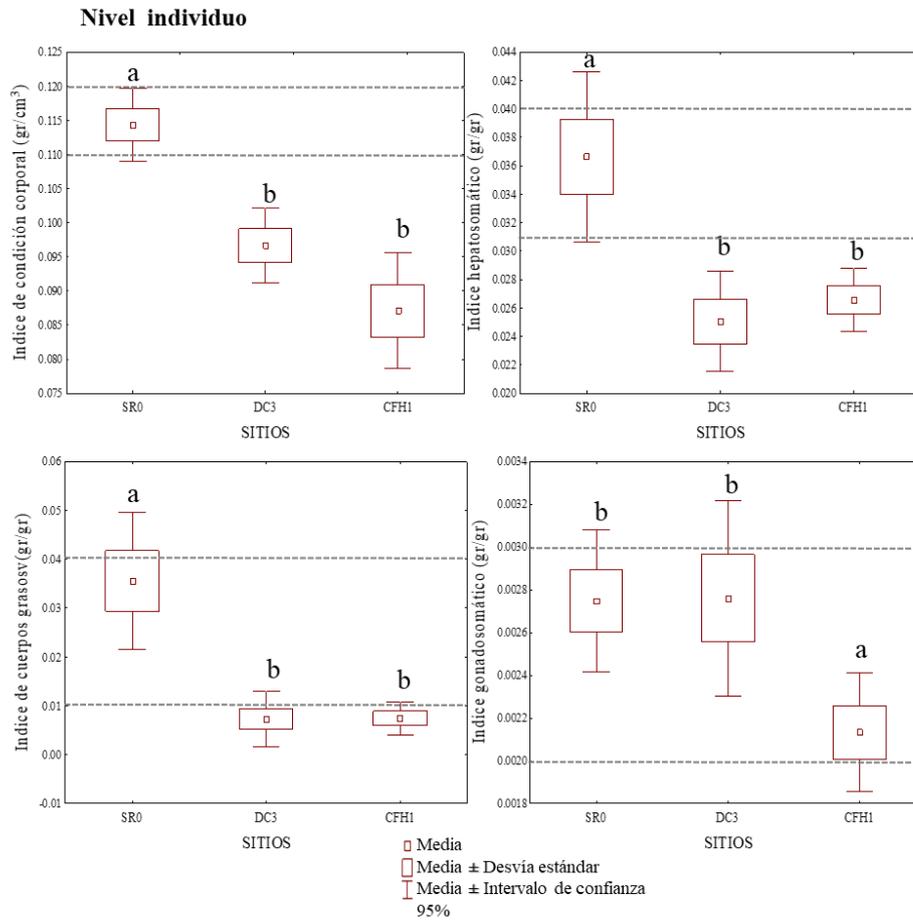


Figura 4.13: Comparación de parámetros a nivel individuo entre los sitios de estudio. CFH1: cinturón florihortícola; SR0: sitio de referencia; DC3: descargas cloacales. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b). Las líneas punteadas corresponden al intervalo de referencia obtenido en el capítulo 2.

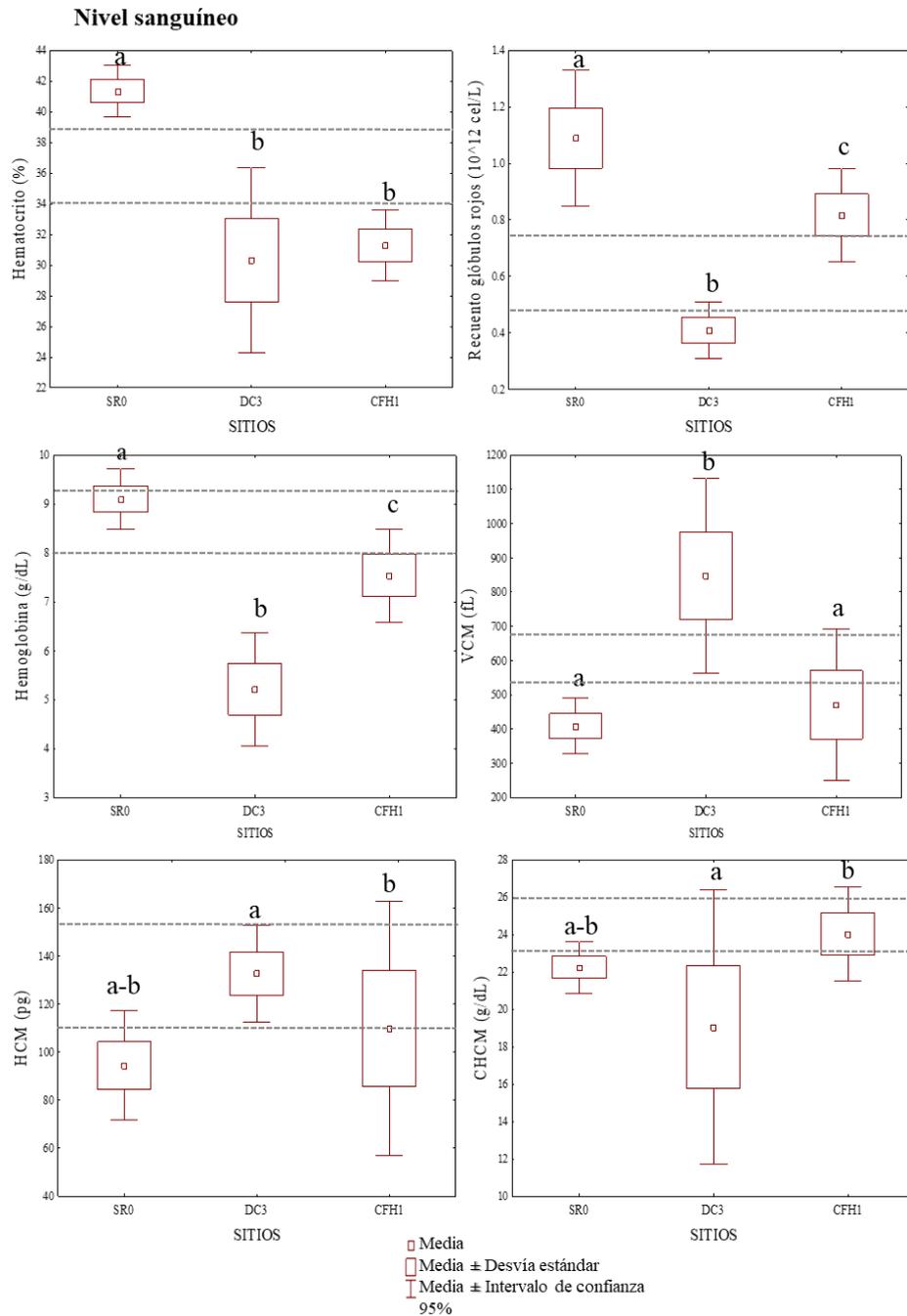


Figura 4.14: Comparación de parámetros a nivel sanguíneo entre los sitios de estudio. CFH1: cinturón florihortícola; SR0: sitio de referencia; DC3: descargas cloacales. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b). Las líneas punteadas corresponden al intervalo de referencia obtenido en el capítulo 2.

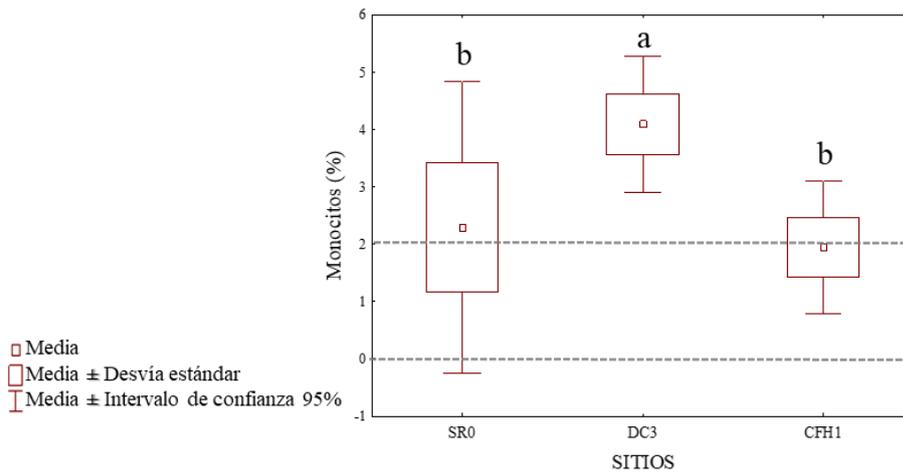


Figura 4.15: Comparación de parámetros a nivel inmunológico entre los sitios de estudio. CFH1: cinturón florihortícola; SR0: sitio de referencia; DC3: descargas cloacales. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b). Las líneas punteadas corresponden al intervalo de referencia obtenido en el capítulo 2.

A continuación, se presentan los resultados de la presencia de anomalías más destacadas. Se pudo observar que 3/12 (25%) individuos provenientes de CFH1 y 1/11 (0,9%) individuos provenientes de DC3 presentaron el hígado anormal (figura 4.16).

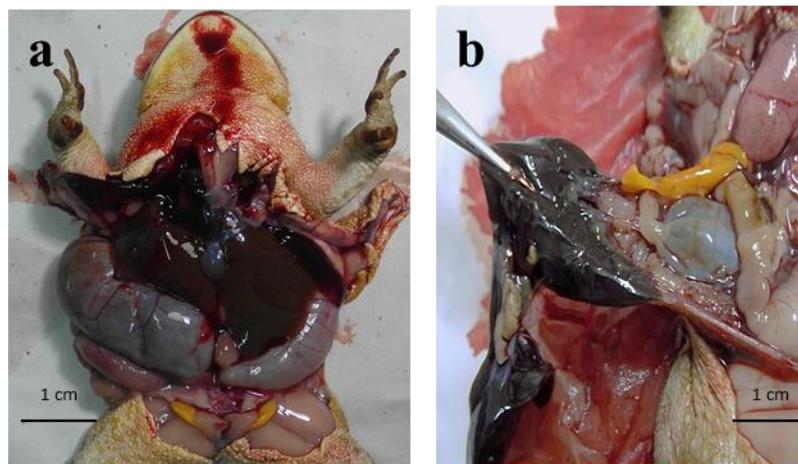


Figura 4.16: Individuo de *R. arenarum*. a. normal, proveniente de SR0. b: afectado (hígado pegado a digestivo y cuerpos grasos), proveniente de DC3.

Condición del sitio: La tabla 4.8 muestra la cantidad de individuos afectados y normales para cada parámetro.

Tabla 4.8: Cantidad y porcentaje de individuos adultos de *R. arenarum* con valores afectados y normales para todos los parámetros.

		ICC	IHS	ICG	IGS	Hto	RGR	Hb	VCM	HCM	CHCM										
SR0	Afectados	1	10.00%	3	30.00%	3	30.00%	0	0.00%	7	70.00%	8	80.00%	3	30.00%	7	70.00%	6	60.00%	1	10.00%
(n=10)	Normales	9	90.00%	7	70.00%	7	70.00%	10	100.00%	3	30.00%	2	20.00%	6	60.00%	3	30.00%	3	30.00%	8	80.00%
CFH1	Afectados	11	91.67%	4	33.33%	8	66.67%	1	8.33%	8	66.67%	10	83.33%	6	50.00%	11	91.67%	10	83.33%	2	16.67%
(n=12)	Normales	1	8.33%	8	66.67%	4	33.33%	11	91.67%	4	33.33%	2	16.67%	6	50.00%	1	8.33%	2	16.67%	10	83.33%
DC3	Afectados	9	81.82%	6	54.55%	9	81.82%	0	0.00%	10	90.91%	7	63.64%	10	90.91%	10	90.91%	4	36.36%	10	90.91%
(n=11)	Normales	2	18.18%	5	45.45%	2	18.18%	11	100.00%	1	9.09%	4	36.36%	1	9.09%	1	9.09%	7	63.64%	1	9.09%
		Neu	Eos	Bas	Mon	Lin	N:L	RTGB	RTT												
SR0	Afectados	2	20.00%	0	0.00%	2	20.00%	2	20.00%	3	30.00%	1	10.00%	1	10.00%						
(n=10)	Normales	8	80.00%	10	100.00%	8	80.00%	8	80.00%	8	80.00%	7	70.00%	9	90.00%	9	90.00%				
CFH1	Afectados	3	25.00%	1	8.33%	0	0.00%	3	25.00%	5	41.67%	6	50.00%	1	8.33%	2	16.67%				
(n=12)	Normales	8	66.67%	11	91.67%	12	100.00%	9	75.00%	7	58.33%	6	50.00%	11	91.67%	10	83.33%				
DC3	Afectados	2	18.18%	3	27.27%	3	27.27%	9	81.82%	3	27.27%	5	45.45%	1	9.09%	1	9.09%				
(n=11)	Normales	9	81.82%	8	72.73%	8	72.73%	2	18.18%	8	72.73%	6	54.55%	10	90.91%	10	90.91%				

La evaluación de la condición del sitio mostró que todos los sitios presentaron al menos el 10% de los individuos afectados para cada parámetro. Sin embargo, para todos los parámetros, SR0 fue el sitio que menor porcentaje de individuos con valores afectados presentó, y DC3, el sitio que mayor porcentaje de individuos con valores afectados presentó para la mayoría de los parámetros.

Parámetros afectados por individuo: En la tabla 4.9 se muestra la cantidad de individuos clasificados por el número de parámetros afectados agrupados por sitio y por nivel.

Tabla 4.9: Cantidad de individuos clasificados por el número de parámetros afectados agrupados por sitio y por nivel.

Nivel individuo (4 parámetros)				Nivel sanguíneo (6 parámetros)			
	SR0	CFH1	DC3		SR0	CFH1	DC3
0 parámetros	5	0	1	0 parámetros	0	1	0
1 parámetro	3	4	1	1 parámetro	0	0	0
2 parámetros	2	4	4	2 parámetros	2	0	0
3 parámetros	0	4	5	3 parámetros	5	3	3
4 parámetros	0	0	0	4 parámetros	2	2	2
n individuos	10	12	11	5 parámetros	1	5	5
				6 parámetros	0	1	1
				n individuos	10	12	11
Nivel inmunológico (8 parámetros)							
	SR0	CFH1	DC3				
0 parámetros	4	2	1				
1 parámetro	1	3	2				
2 parámetros	4	4	2				
3 parámetros	0	2	3				
4 parámetros	1	1	3				
5 parámetros	0	0	0				
6 parámetros	0	0	0				
7 parámetros	0	0	0				
8 parámetros	0	0	0				
n individuos	10	12	11				

La comparación de la cantidad de parámetros afectados por individuo mostró que todos los individuos de *R. arenarum* provenientes de todos los sitios presentaron al menos un parámetro afectado.

Enfoque multivariado

En la figura 4.17 se pueden observar los diferentes análisis correspondientes al enfoque multivariado.

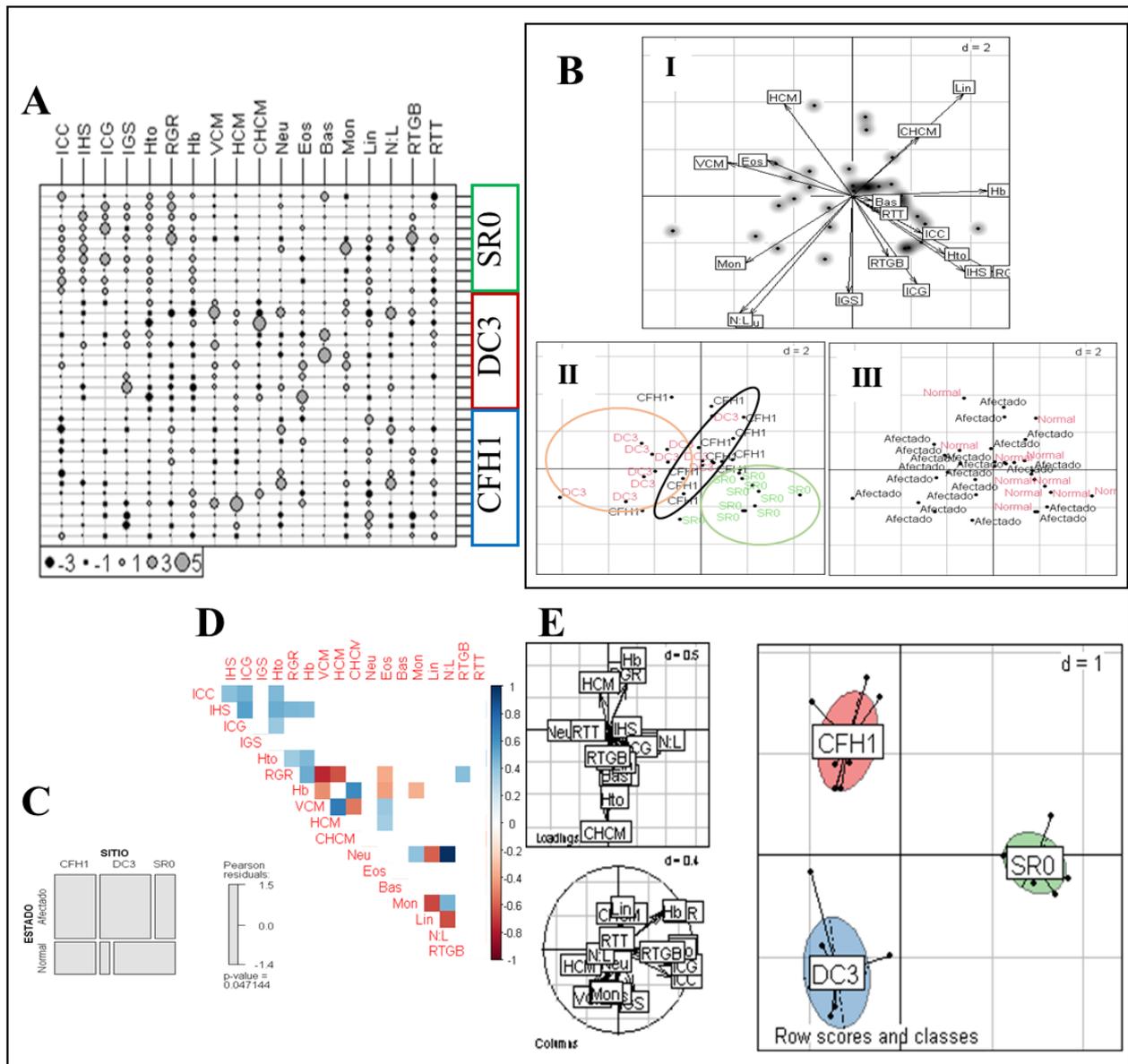


Figura 4.17: Análisis multivariados para escenario 4. A. gráfico de burbujas que representa la magnitud de la distancia de cada valor respecto al centroide. B. Análisis de componentes principales. Biplots. I: contribución de cada uno de los parámetros clínicos en la separación. II: representación gráfica con los rótulos de la variable categórica sitios. III: representación gráfica con los rótulos de la variable categórica condición de los individuos C. Gráfico de bloques. Se muestra la relación entre las variables categóricas “sitios” y “estado de salud”. Tamaño del bloque: frecuencia de ocurrencia. Colores: valores de las pruebas de contingencia (gris: no significativo, azul: significativo por encima del valor normal, y rosa: significativo por debajo del valor normal). D. Diagrama de asociación piramidal. Los colores representan el coeficiente de correlación: azul: +1; rojo: -1; blanco: no significativo ($p > 0,05$). E. Análisis discriminante. Biplots. CFH1: cinturón florihortícola; DC3: descargas cloacales; SR0: sitio de referencia

En la figura 4.17A se puede observar el gráfico de burbujas. Los resultados del análisis de componentes principales (ACP) se muestran en la figura 4.17B. En el biplot resultante del ACP, se distinguió una separación de los individuos provenientes del cinturón florihortícola (CFH1), las descargas cloacales (DC3) y el sitio de referencia (SR0). Además, al graficar los rótulos de la variable **condición del individuo** y analizar el biplot, se pudo observar que existe una separación entre individuos afectados y

normales, con una correspondencia de los individuos afectados con el cinturón florihortícola (CFH1) y las descargas cloacales (DC3). El análisis de contingencia (Figura 4.17C) no mostró resultados significativos. En la Figura 4.17D correspondiente al gráfico de asociación, se pueden distinguir dos zonas con un patrón de asociación significativa de gran magnitud: una expresada dentro del nivel sanguíneo, y la otra dentro del nivel inmunológico. El análisis discriminante (Fig 4.17E) mostró una separación significativa ($p < 0,05$) entre los sitios, separando las descargas cloacales (DC3) del sitio de referencia (SR0) y el cinturón florihortícola (CFH1), siendo los parámetros que aportaron a dicha separación: Hb, RGR, Hto, ICC, VCM, CHCM, N:L.

Al interpretar los resultados de los análisis con la intención de detectar especificidad en la respuesta de los parámetros en los casos correspondientes al presente estudio, pudimos observar que el aumento de ICC, IHS, ICG y Hto fueron específicos para los individuos normales provenientes de SR0; la disminución de IGS fue específica para individuos afectados provenientes de CFH1; y el aumento de VCM y de Mon fueron específicos para individuos afectados provenientes de DC3.

A modo de resumen, en la tabla 4.10 se muestran los análisis realizados, y se hace referencia a si cada paso de la herramienta presentada funcionó o no al aplicarlo al escenario 4.

Tabla 4.10: Esquema de la herramienta propuesta aplicada al escenario 4.

UNIVARIADO	MULTIVARIADO
Comparación de la respuesta de los parámetros clínicos entre sitios (ANOVA) 	Comparación de respuesta de parámetros entre sitios (ACP y v-test) 
Especificidad (respuesta asociada a un solo sitio Tuckey) 	Especificidad (gráfico de burbujas) 
	Relación entre parámetros y entre niveles (asociación)
Comparación de la condición del sitio (conteo de individuos afectados por parámetro) 	Comparación de la proporción de individuos afectados (AC) 
Comparación de la condición de los individuos entre sitios (conteo de la cantidad de parámetros afectados por individuos) 	Comparación de condición de los individuos (ACP) 
Efectividad de parámetros (diferencias en ANOVA) 	Efectividad de parámetros (separación de sitios-AD) 

Los círculos naranjas corresponden a un parámetro clínico, y su presencia en uno de los recuadros indica que dicha metodología funcionó. La cruz significa que la metodología no funcionó. El tick significa que la metodología funcionó.

A partir de la información presentada, podemos decir que los resultados presentados para el escenario 4 son consistentes. El ANOVA mostró diferencias significativas para 12 parámetros, los cuales suman en el mismo sentido con los resultados obtenidos de la condición del sitio y los resultados del análisis multivariado. Podemos decir que existe una separación entre los sitios, siendo los individuos provenientes de las descargas cloacales (DC3) los que presentan el estado de salud más afectado, seguido por los individuos provenientes del cinturón florihortícola (CFH1) y, por último, los individuos provenientes del sitio de referencia (SR0), los cuales para todos los parámetros presentaron el menor porcentaje de individuos afectados.

Al considerar los parámetros que mostraron diferencias significativas entre los sitios al realizar los ANOVAs (ICC, IHS, ICG, IGS, Hto, RGR, Hb, VCM, HCM, CHCM, Mon), pudimos observar que el cinturón florihortícola (CFH1) y las descargas cloacales (DC3) presentaron el mayor porcentaje de individuos con valores afectados.

Escenario 5 (*Rhinella arenarum* – 2018)

Se logró coleccionar un total de 37 machos de *R. arenarum* provenientes de sitios afectados por la industria petroquímica (IP3; n=15), las descargas de efluentes cloacales (DC3; n=7), y además individuos provenientes de un sitio de referencia (SR0; n=15), en los cuales se evaluaron 20 parámetros clínicos.

A continuación, se presentan los resultados de modo resumido:

Enfoque univariado

Los resultados de los 5 parámetros que mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) al realizar los análisis univariados, se muestran en la figura 4.18.

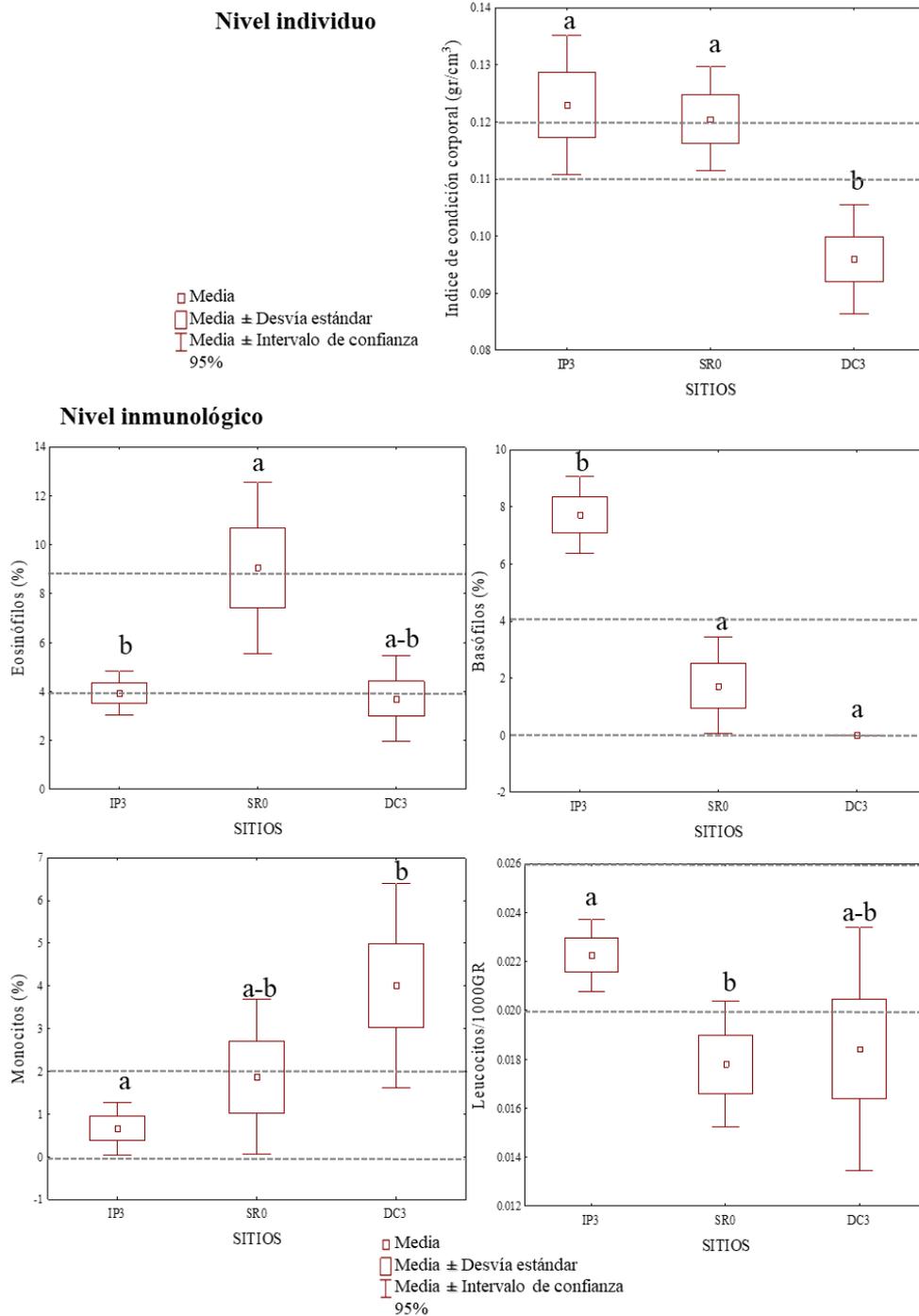


Figura 4.18: Comparación de parámetros a nivel individuo e inmunológico entre los sitios de estudio. IP3: industria petroquímica; SR0: sitio de referencia; DC3: descargas cloacales. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b). Las líneas punteadas corresponden a los intervalos de referencia obtenidos en el capítulo 2.

A continuación, se presentan los resultados de la presencia de anomalías más destacadas. Se pudo observar que 6/7 individuos provenientes de DC3 presentaron los testículos diferentes al resto de los individuos (ampollas en parte anterior,

o estructura lenticular), lo que podría corresponderse con el órgano de Bidder (figura 4.19c, 4.19d y 4.19e). Además, 9/15 individuos provenientes de SR0 presentaron parásitos nematodes en la cavidad corporal (figura 4.19a y 4.19b).

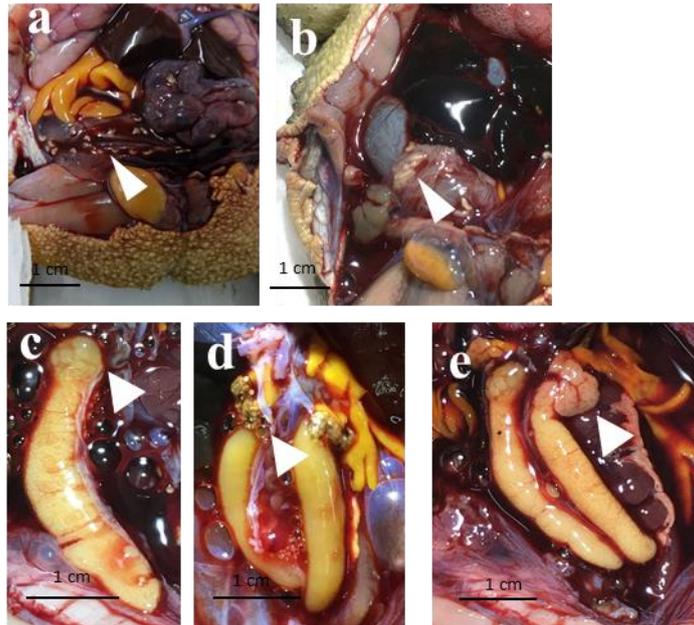


Figura 4.19: Anormalidades en individuos de *R. arenarum*. a y b: parásitos en cavidad corporal (punta de flecha) correspondientes a individuos de SR0. c, d y e: estructuras en testículos correspondientes a individuos de DC3.

Condición del sitio: La tabla 4.11 muestra la cantidad de individuos afectados y normales para cada parámetro.

Tabla 4.11: Cantidad y porcentaje de individuos adultos de *R. arenarum* con valores afectados y normales para todos los parámetros.

		ICC	IHS	ICG	IGS	Hto	RGR	Hb	VCM	HCM	CHCM								
SR0	Afectados	2	13.33%	3	20.00%	6	40.00%	0	0.00%	9	60.00%	3	20.00%	6	40.00%	8	53.33%	8	53.33%
(n=15)	Normales	13	86.67%	12	80.00%	9	60.00%	15	100.00%	6	40.00%	12	80.00%	9	60.00%	9	60.00%	7	46.67%
IP3	Afectados	4	26.67%	2	13.33%	13	86.67%	3	20.00%	7	46.67%	5	33.33%	11	73.33%	4	26.67%	8	53.33%
(n=15)	Normales	11	73.33%	13	86.67%	2	13.33%	12	80.00%	7	46.67%	10	66.67%	4	26.67%	10	66.67%	7	46.67%
DC3	Afectados	6	85.71%	3	42.86%	6	85.71%	0	0.00%	5	71.43%	3	42.86%	5	71.43%	3	42.86%	5	71.43%
(n=7)	Normales	1	14.29%	4	57.14%	1	14.29%	7	100.00%	2	28.57%	4	57.14%	2	28.57%	4	57.14%	2	28.57%
		Neu	Eos	Bas	Mon	Lin	N:L	RTGB	RTT										
SR0	Afectados	5	33.33%	7	46.67%	1	6.67%	3	20.00%	5	33.33%	4	26.67%	5	33.33%	1	6.67%		
(n=15)	Normales	10	66.67%	8	53.33%	14	93.33%	12	80.00%	10	66.67%	11	73.33%	10	66.67%	14	93.33%		
IP3	Afectados	0	0.00%	0	0.00%	14	93.33%	1	6.67%	1	6.67%	9	60.00%	0	0.00%	3	20.00%		
(n=15)	Normales	15	100.00%	15	100.00%	1	6.67%	14	93.33%	14	93.33%	6	40.00%	15	100.00%	12	80.00%		
DC3	Afectados	3	42.86%	0	0.00%	0	0.00%	4	57.14%	3	42.86%	3	42.86%	2	28.57%	1	14.29%		
(n=7)	Normales	4	57.14%	7	100.00%	7	100.00%	3	42.86%	4	57.14%	4	57.14%	5	71.43%	6	85.71%		

La evaluación de la condición del sitio mostró que todos los sitios presentaron al menos el 10% de los individuos afectados para cada parámetro. El SR0 fue el sitio que presentó menor porcentaje de individuos con valores afectados para la mayoría de los parámetros, mientras que DC3 fue el sitio que presentó mayor porcentaje de individuos con valores afectados para la mayoría de los parámetros evaluados.

Parámetros afectados por individuo: En la tabla 4.12 se muestra la cantidad de individuos clasificados por el número de parámetros afectados agrupados por sitio y por nivel.

Tabla 4.12: Cantidad de individuos clasificados por el número de parámetros afectados agrupados por sitio y por nivel.

Nivel individuo (4 parámetros)				Nivel sanguíneo (6 parámetros)			
	SR0	IP3	DC3		SR0	IP3	DC3
0 parámetros	5	1	0	0 parámetros	2	0	0
1 parámetro	3	3	1	1 parámetro	0	3	1
2 parámetros	6	8	4	2 parámetros	5	2	1
3 parámetros	1	3	2	3 parámetros	4	6	0
4 parámetros	0	0	0	4 parámetros	3	1	3
n individuos	15	15	7	5 parámetros	1	2	2
				6 parámetros	0	1	0
				n individuos	15	15	7
Nivel inmunológico (8 parámetros)							
	SR0	IP3	DC3				
0 parámetros	0	0	0				
1 parámetro	6	4	4				
2 parámetros	3	9	0				
3 parámetros	3	2	1				
4 parámetros	2	0	1				
5 parámetros	0	0	1				
6 parámetros	1	0	0				
7 parámetros	0	0	0				
8 parámetros	0	0	0				
n individuos	15	15	7				

La comparación de la cantidad de parámetros afectados por individuo mostró que todos los individuos de *R. arenarum* provenientes de todos los sitios presentaron al menos un parámetro afectado.

provenientes de la industria petroquímica (IP3) respecto de los individuos provenientes de las descargas cloacales (DC3) y el sitio de referencia (SR0). Además, al graficar los rótulos de la variable **condición del individuo** y analizar el biplot, no se pudo observar una separación clara entre las dos categorías. El análisis de contingencia (Figura 4.20C) no mostró resultados significativos. En la Figura 4.20D correspondiente al gráfico de asociación, se pueden distinguir dos zonas con un patrón de asociación significativa de gran magnitud: una expresada a nivel sanguíneo, y la otra a inmunológico. El análisis discriminante (Figura 4.20E) no mostró una separación significativa ($p < 0,05$) entre los sitios.

Al interpretar los resultados de los análisis con la intención de detectar especificidad en la respuesta de los parámetros en los casos correspondientes al presente estudio, pudimos observar que la disminución de ICC fue específica para individuos provenientes de DC3; y el aumento de Bas fue específico para individuos provenientes de IP3.

A modo de resumen, en la tabla 4.13 se muestran los análisis realizados, y se hace referencia a si cada paso de la herramienta funcionó o no al aplicarlo al escenario 5.

Tabla 4.13: Esquema de la herramienta propuesta aplicada al escenario 5.

UNIVARIADO	MULTIVARIADO
Comparación de la respuesta de los parámetros clínicos entre sitios (ANOVA) 	Comparación de respuesta de parámetros entre sitios (ACP y v-test) 
Especificidad (respuesta asociada a un solo sitio Tuckey) 	Especificidad (gráfico de burbujas) 
	Relación entre parámetros y entre niveles (asociación)
Comparación de la condición del sitio (conteo de individuos afectados por parámetro) 	Comparación de la proporción de individuos afectados (AC) 
Comparación de la condición de los individuos entre sitios (conteo de la cantidad de parámetros afectados por individuos) 	Comparación de condición de los individuos (ACP) 
Efectividad de parámetros (diferencias en ANOVA) 	Efectividad de parámetros (separación de sitios-AD) 

Los círculos naranjas corresponden a un parámetro clínico, y su presencia en uno de los recuadros indica que dicha metodología funcionó.

A partir de la información presentada, podemos decir que los resultados presentados para el escenario 5 no son consistentes. Existen muy pocos parámetros que mostraron diferencias significativas en los ANOVAs, y los análisis multivariados no mostraron una clara separación entre los sitios evaluados, ni entre individuos afectados y normales. Si bien en la tabla que muestra los individuos afectados se puede observar que las descargas cloacales presentan mayor cantidad de parámetros con individuos con valores afectados, este no fue el sitio que muestra una leve separación en el análisis multivariado. Al considerar los parámetros que mostraron diferencias en el ANOVA, para ICC, Eos y Bas pudimos observar que la industria petroquímica (IP3) y las descargas cloacales (DC3) presentaron el mayor porcentaje de individuos con valores afectados.

Escenario 6 (*Rhinella arenarum* – 2019)

Se logró coleccionar un total de 31 machos de *R. arenarum* provenientes de dos sitios afectados por la industria petroquímica (IP4; n=14 y IP5; n=9), y además individuos provenientes de un sitio de referencia (SR0; n=8), en los cuales se evaluaron 37 parámetros clínicos.

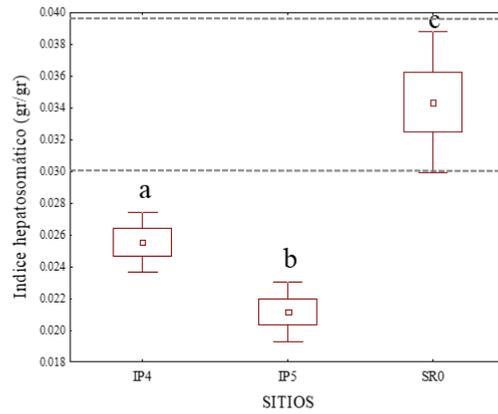
A continuación, se presentan los resultados de modo resumido:

Enfoque univariado

Los resultados de los 11 parámetros que mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) al realizar los análisis univariados se muestran en las figuras 4.21, 4.22 y 4.23.

Nivel individuo

Media
 Media \pm Desvía estándar
 Media \pm Intervalo de confianza 95%



Nivel sanguíneo

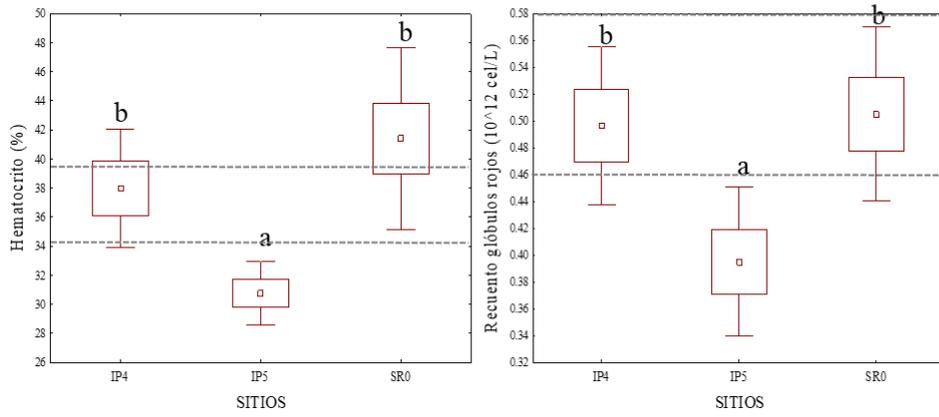


Figura 4.21: Comparación de parámetros a nivel individuo y sanguíneo entre los sitios de estudio. IP4 e IP5: industria petroquímica; SR0: sitio de referencia. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b). Las líneas punteadas corresponden a los intervalos de referencia obtenidos en el capítulo 2.

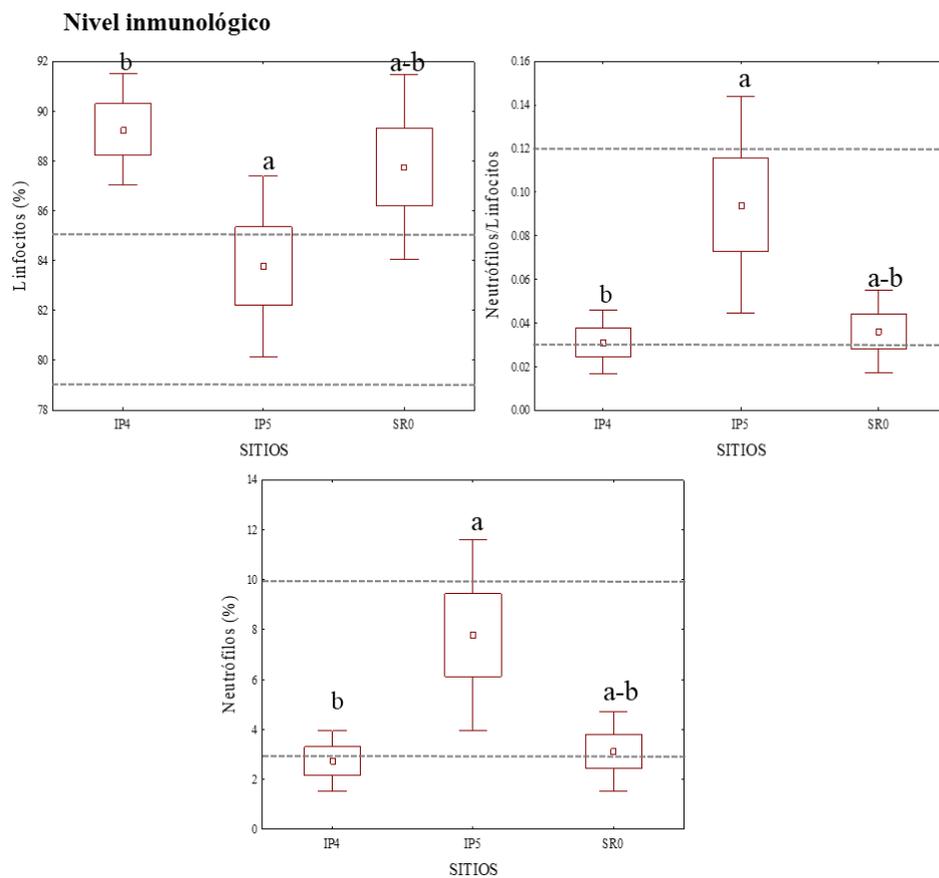


Figura 4.22: Comparación de parámetros a nivel inmunológico entre los sitios de estudio. IP4 e IP5: industria petroquímica; SR0: sitio de referencia. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b). Las líneas punteadas corresponden a los intervalos de referencia obtenidos en el capítulo 2.

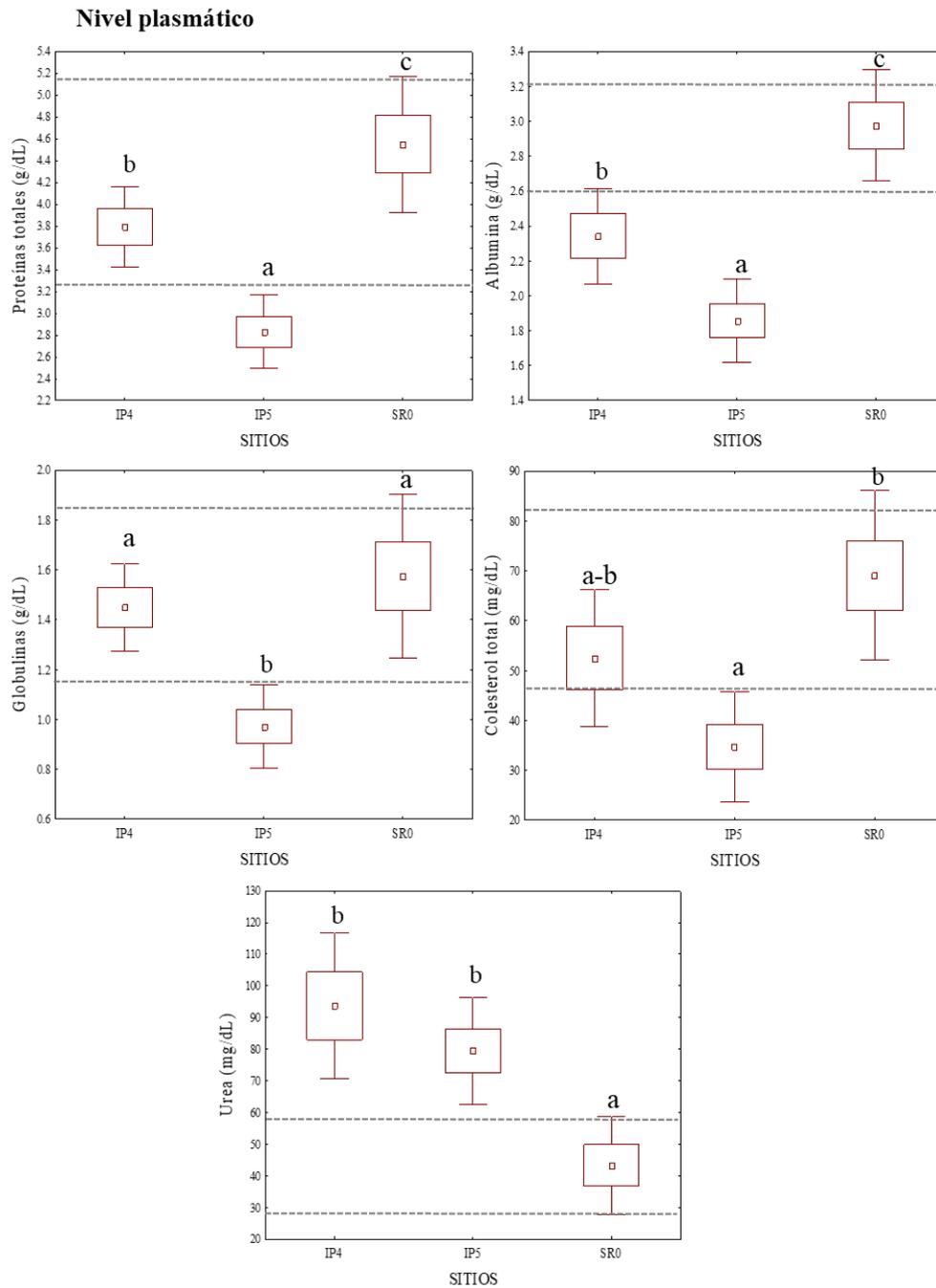


Figura 4.23: Comparación de parámetros a nivel plasmático entre los sitios de estudio. IP4 e IP5: industria petroquímica; SR0: sitio de referencia. Las diferencias significativas del test univariado con test a posteriori ($p < 0,05$) se indican con letras donde cada letra es un grupo (a, b). Las líneas punteadas corresponden a los intervalos de referencia obtenidos en el capítulo 2.

Condición del sitio: La tabla 4.14 muestra la cantidad de individuos afectados y normales para cada parámetro.

Tabla 4.14: Cantidad y porcentaje de individuos adultos de *R. arenarum* con valores afectados y normales para todos los parámetros.

		ICC		IHS		ICG		IGS		Hto		RGR		VCM									
SR0	Afectados	2	25.00%	0	0.00%	8	100.00%	3	37.50%	3	37.50%	1	12.50%	6	75.00%								
(n=8)	Normales	6	75.00%	8	100.00%	0	0.00%	5	62.50%	3	37.50%	7	87.50%	0	0.00%								
IP4	Afectados	6	42.86%	5	35.71%	11	78.57%	5	35.71%	4	28.57%	4	28.57%	10	71.43%								
(n=14)	Normales	8	57.14%	9	64.29%	3	21.43%	9	64.29%	10	71.43%	10	71.43%	4	28.57%								
IP5	Afectados	7	77.78%	9	100.00%	9	100.00%	2	22.22%	7	77.78%	7	77.78%	8	88.89%								
(n=9)	Normales	2	22.22%	0	0.00%	0	0.00%	7	77.78%	2	22.22%	2	22.22%	1	11.11%								
		Neu		Eos		Bas		Mon		Lin		N:L		RTGB		RTT							
SR0	Afectados	0	0.00%	1	12.50%	1	12.50%	0	0.00%	3	37.50%	2	25.00%	1	12.50%	0	0.00%						
(n=8)	Normales	8	100.00%	7	87.50%	7	87.50%	8	100.00%	5	62.50%	6	75.00%	7	87.50%	8	100.00%						
IP4	Afectados	0	0.00%	2	14.29%	1	7.14%	0	0.00%	9	64.29%	7	50.00%	3	21.43%	2	14.29%						
(n=14)	Normales	14	100.00%	12	85.71%	13	92.86%	14	100.00%	5	35.71%	7	50.00%	11	78.57%	12	85.71%						
IP5	Afectados	3	33.33%	1	11.11%	0	0.00%	3	33.33%	1	11.11%	3	33.33%	1	11.11%	4	44.44%						
(n=9)	Normales	6	66.67%	8	88.89%	9	100.00%	6	66.67%	8	88.89%	6	66.67%	18	200.00%	5	55.56%						
		LDH		CPK		TGP		TGO		FA		PT		Alb		Glob		A/G					
SR0	Afectados	2	25.00%	3	37.50%	2	28.57%	2	28.57%	2	25.00%	2	25.00%	3	37.50%	2	25.00%	2	25.00%				
(n=8)	Normales	6	75.00%	5	62.50%	5	71.43%	5	71.43%	6	75.00%	6	75.00%	5	62.50%	6	75.00%	6	75.00%				
IP4	Afectados	5	35.71%	7	50.00%	10	71.43%	8	57.14%	8	57.14%	6	42.86%	9	64.29%	2	14.29%	3	21.43%				
(n=14)	Normales	9	64.29%	7	50.00%	4	28.57%	6	42.86%	6	42.86%	8	57.14%	5	35.71%	12	85.71%	11	78.57%				
IP5	Afectados	5	55.56%	4	44.44%	1	14.29%	4	57.14%	4	57.14%	5	71.43%	7	100.00%	3	42.86%	2	28.57%				
(n=9)	Normales	2	22.22%	3	33.33%	6	85.71%	3	42.86%	3	42.86%	2	28.57%	0	0.00%	4	57.14%	5	71.43%				
		COL		TGC		HDL		LDL		VLDL		Ca		P		Mg		Creat		Ur		Ami	
SR0	Afectados	1	12.50%	2	25.00%	3	37.50%	2	25.00%	2	25.00%	2	25.00%	2	25.00%	3	37.50%	1	12.50%	2	25.00%	6	75.00%
(n=8)	Normales	7	87.50%	6	75.00%	5	62.50%	6	75.00%	6	75.00%	6	75.00%	6	75.00%	5	62.50%	7	87.50%	6	75.00%	2	25.00%
IP4	Afectados	6	42.86%	7	50.00%	4	28.57%	10	71.43%	7	50.00%	7	50.00%	5	41.67%	1	7.14%	4	28.57%	12	85.71%	4	28.57%
(n=14)	Normales	8	57.14%	7	50.00%	10	71.43%	4	28.57%	7	50.00%	7	50.00%	7	58.33%	13	92.86%	10	71.43%	2	14.29%	10	71.43%
IP5	Afectados	5	71.43%	2	33.33%	2	33.33%	6	85.71%	2	50.00%	1	14.29%	1	14.29%	2	28.57%	4	66.67%	6	85.71%	4	57.14%
(n=9)	Normales	2	28.57%	4	66.67%	4	66.67%	1	14.29%	2	50.00%	6	85.71%	6	85.71%	5	71.43%	2	33.33%	1	14.29%	3	42.86%

La evaluación de la condición del sitio mostró que todos los sitios presentaron al menos el 10% de los individuos afectados para cada parámetro. El sitio SR0 fue el que presentó menor porcentaje de individuos con valores afectados, mientras que IP5 fue el sitio que presentó mayor porcentaje de individuos con valores afectados.

Parámetros afectados por individuo: En la tabla 4.15 se muestra la cantidad de individuos clasificados por el número de parámetros afectados agrupados por sitio y por nivel.

Tabla 4.15: Cantidad de individuos clasificados por el número de parámetros afectados agrupados por sitio y por nivel.

Nivel individuo (4 parámetros)				Nivel sanguíneo (3 parámetros)			
	SR0	IP4	IP5		SR0	IP4	IP5
0 parámetros	0	1	0	0 parámetros	2	2	0
1 parámetro	3	5	0	1 parámetro	3	4	2
2 parámetros	5	4	2	2 parámetros	2	6	1
3 parámetros	0	2	5	3 parámetros	1	2	6
4 parámetros	0	2	2	n individuos	8	14	9
n individuos	8	14	9				
Nivel inmunológico (8 parámetros)				Nivel plasmático (20 parámetros)			
	SR0	IP4	IP5		SR0	IP4	IP5
0 parámetros	2	2	2	2 parámetros	0	1	0
1 parámetro	4	3	3	3 parámetros	1	0	0
2 parámetros	2	7	1	5 parámetros	2	0	0
3 parámetros	0	1	2	6 parámetros	3	4	2
4 parámetros	0	1	0	7 parámetros	1	1	0
5 parámetros	0	0	1	8 parámetros	0	1	0
6 parámetros	0	0	0	9 parámetros	1	2	2
7 parámetros	0	0	0	10 parámetros	0	2	0
8 parámetros	0	0	0	11 parámetros	0	2	0
n individuos	8	14	9	12 parámetros	0	1	1
				14 parámetros	0	0	1
				16 parámetros	0	0	1
				n individuos	8	14	7

La comparación de la cantidad de parámetros afectados por individuo mostró que todos los individuos de *R. arenarum* provenientes de todos los sitios presentaron al menos un parámetro afectado.

Enfoque multivariado

En la figura 4.24 se pueden observar los diferentes análisis correspondientes al enfoque multivariado.

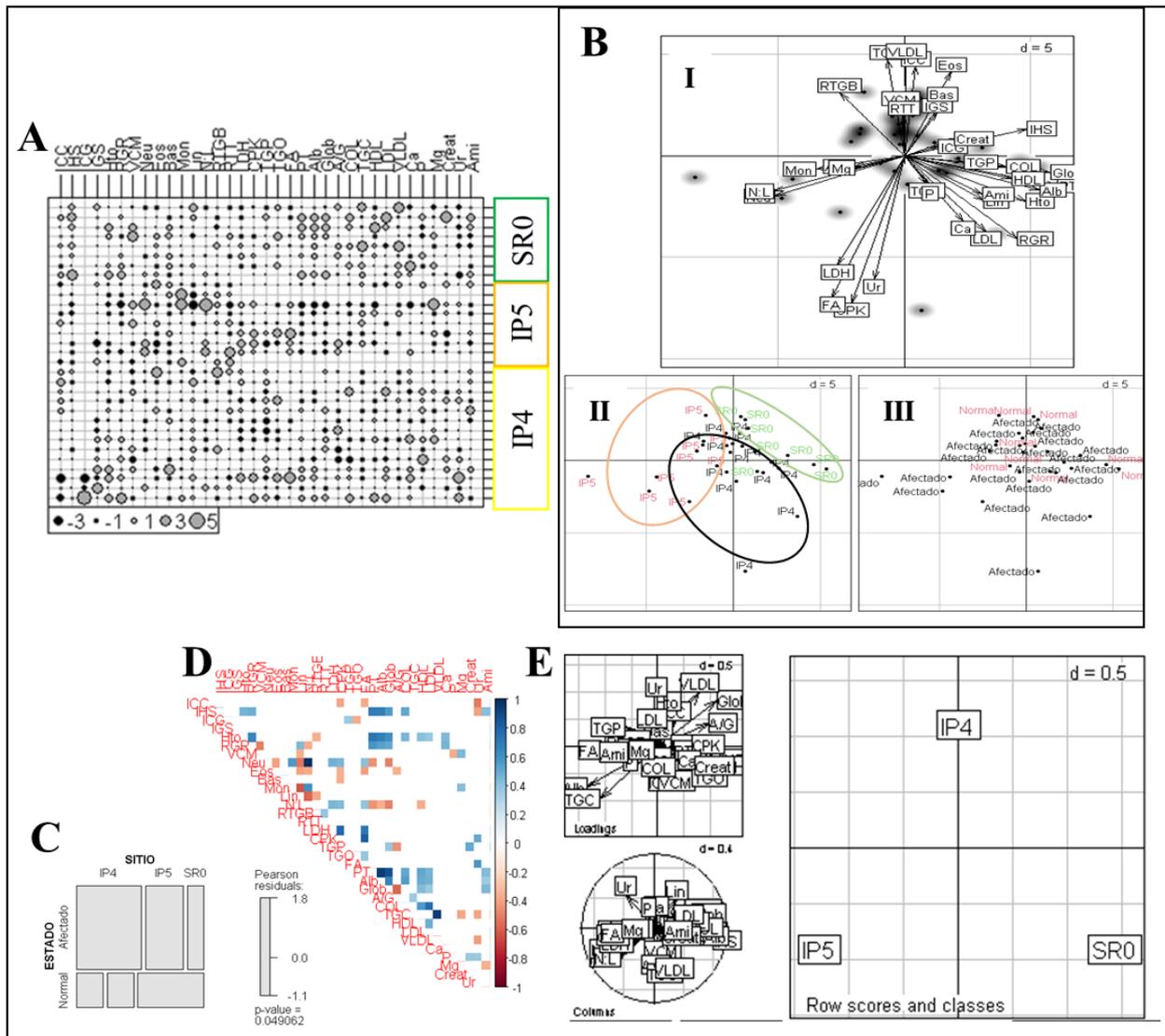


Figura 4.24: Análisis multivariados para escenario 6. A. gráfico de burbujas que representa la magnitud de la distancia de cada valor respecto al centroide. B. Análisis de componentes principales. Biplots. I: contribución de cada uno de los parámetros clínicos en la separación. II: representación gráfica con los rótulos de la variable categórica sitios. III: representación gráfica con los rótulos de la variable categórica condición de los individuos C. Gráfico de bloques. Se muestra la relación entre las variables categóricas “sitios” y “estado de salud”. Tamaño del bloque: frecuencia de ocurrencia. Colores: valores de las pruebas de contingencia (gris: no significativo, azul: significativo por encima del valor normal, y rosa: significativo por debajo del valor normal). D. Diagrama de asociación piramidal. Los colores representan el coeficiente de correlación: azul: +1; rojo: -1; blanco: no significativo ($p > 0,05$). E. Análisis discriminante. Biplots. IP4: industria petroquímica; IP5: industria petroquímica; SR0: sitio de referencia.

En la figura 4.24A se puede observar el gráfico de burbujas. Los resultados del análisis de componentes principales (ACP) se muestran en la figura 4.24B. En el biplot resultante del ACP se distinguió una separación de los individuos provenientes de la industria petroquímica y el sitio de referencia. Al graficar los rótulos de la variable **condición del individuo** y analizar el biplot, se pudo observar que no existe una separación clara entre individuos afectados y normales. El análisis de contingencia (Figura 4.24C) no mostró resultados significativos. En la Figura 4.24D correspondiente

al gráfico de asociación, se pueden distinguir dos zonas con un patrón de asociación significativa de gran magnitud: una a nivel inmunológico, y otra a nivel plasmático. El análisis discriminante (Fig 4.24E) no mostró una separación significativa ($p>0,05$) entre los sitios.

Al interpretar los resultados de los análisis con la intención de detectar especificidad en la respuesta de los parámetros en los casos correspondientes al presente estudio, pudimos observar que valores menores de Hto, RGR y Glob fueron específicos para individuos provenientes de IP5, mientras que valores menores de Ur fueron específicos de individuos provenientes de SR0.

A modo de resumen, en la tabla 4.16 se muestran los análisis realizados, y se hace referencia a si cada paso de la herramienta funcionó o no al aplicarlo al escenario 6.

Tabla 4.16: Esquema de la herramienta propuesta aplicada al escenario 6.

UNIVARIADO	MULTIVARIADO
Comparación de la respuesta de los parámetros clínicos entre sitios (ANOVA) 	Comparación de respuesta de parámetros entre sitios (ACP y v-test) 
Especificidad (respuesta asociada a un solo sitio Tuckey) 	Especificidad (gráfico de burbujas) 
	Relación entre parámetros y entre niveles (asociación)
Comparación de la condición del sitio (conteo de individuos afectados por parámetro) 	Comparación de la proporción de individuos afectados (AC) 
Comparación de la condición de los individuos entre sitios (conteo de la cantidad de parámetros afectados por individuos) 	Comparación de condición de los individuos (ACP) 
Efectividad de parámetros (diferencias en ANOVA) 	Efectividad de parámetros (separación de sitios-AD) 

Los círculos naranjas corresponden a un parámetro clínico, y su presencia en uno de los recuadros indica que dicha metodología funcionó.

A partir de la información presentada, podemos decir que los resultados presentados para el escenario 6 no son del todo consistentes. Si bien el análisis

discriminante y el análisis de contingencia no muestran resultados significativos, al considerar los parámetros que mostraron diferencias significativas entre los sitios al realizar los ANOVAs (IHS, Hto, RGR, Neu, Lin, N:L, PT, Alb, Glob, COL, Urea), pudimos observar que la industria petroquímica presentó el mayor porcentaje de individuos afectados.

4.4 DISCUSIÓN

En el presente capítulo se puso a prueba la herramienta presentada en el capítulo anterior. Para esto, se colectaron individuos de *L. luctator* provenientes de diferentes sitios afectados por la actividad del cinturón florihortícola, la industria petroquímica y las descargas cloacales, y de un sitio de referencia. Además, se colectaron individuos de otra especie, *R. arenarum*, también colectados de sitios afectados por las diferentes actividades antrópicas. Para todos los casos se llevó a cabo la misma metodología propuesta en el capítulo anterior, y se presentaron los resultados obtenidos.

4.4.1 Comentarios sobre el procesamiento y obtención de muestras

A partir de los resultados obtenidos, podemos decir por un lado que, en cuanto a la metodología de **obtención de muestras** para la medición de parámetros clínicos, el protocolo de procesamiento y obtención de muestras llevado a cabo funcionó correctamente.

4.4.1.1 Cuestiones vinculadas con las especies

Las dos especies seleccionadas para el estudio presentan un tamaño lo suficientemente grande para poder tomar la cantidad de muestra necesaria para la evaluación de diferentes parámetros. Los individuos colectados en la presente tesis tuvieron una longitud entre 5,3 y 10,6 cm para *L. luctator*; y entre 8,75 y 15,05 para *R. arenarum*, mientras que su peso varió entre 15 y 114 gramos para *L. luctator*, y entre 69,4 y 221,08 gramos para *R. arenarum*. Todos los individuos presentaron hígado, riñones y músculo con un peso de al menos 0,2 gramos necesario para la medición de los parámetros bioquímicos.

4.4.1.2 Cuestiones técnicas cruentas y no cruentas vinculadas con el volumen sanguíneo

El volumen total de sangre (VTS) de los anfibios varía entre el 7 y 10% del peso de anfibios terrestres y entre 13 y 25% en anfibios acuáticos (VTS = peso en

gramos*porcentaje en decimales). La extracción de sangre mínima segura para el individuo (SMS) es igual al 5 o 10% de VTS ($SMS=VTS*0.05$), y en un animal sano puede ser el doble (Heatley, 2009). Para llevar a cabo la medición de los parámetros propuestos se necesitaron 560 μ l de sangre (160 μ l para hematocrito, 20 μ l para hemoglobina, 20 μ l para recuento de glóbulos rojos, 10 μ l para los frotis, 50 μ l para los parámetros bioquímicos y 300 μ l para los parámetros plasmáticos). Considerando esta información, y que para tomar las muestras en la presente tesis se produjo el sacrificio del animal, podemos determinar que el peso mínimo de un anuro para poder sacarle la cantidad de sangre necesaria para medición de todos los parámetros clínicos propuestos es de 8-10 gramos. Sin embargo, teniendo en cuenta la metodología utilizada (disección del individuo) durante la cual el individuo pierde presión sanguínea y esto dificulta la extracción de sangre, se recomienda que el individuo tenga un peso de al menos 15 gramos (en el presente trabajo se pudieron medir todos los parámetros en individuos con un peso mínimo de 15-20 gramos). Si se espera no sacrificar al animal el peso mínimo para poder medir todos los parámetros clínicos propuestos deberá ser entre 56 y 160 gramos dependiendo si el individuo está sano o enfermo. En la presente tesis, el 97,3 % de los individuos de *R. arenarum* y el 69% de los individuos de *L. luctator* presentaron un peso de 56 gramos o más. Mientras que el 10% de los individuos de *R. arenarum* y ninguno de *L. luctator* presentaron un peso mayor a 160 gramos.

Estos resultados coinciden con la metodología llevada a cabo por Young y col. (2012), donde extraen una muestra entre 250 y 500 μ l de sangre de dos especies de rana arborícolas australianas (*Litoria caerulea* y *Litoria infrafrenata*) para determinar intervalos de referencia para la mayoría de los parámetros clínicos evaluados en la presente tesis, sin sacrificar a los individuos. Es importante aclarar que en ese trabajo ellos utilizan 100 μ l de sangre heparinizada para evaluar los parámetros plasmáticos a través de un sistema automatizado (analizador VetScan VS2 y Vet-Rotor Scan Avian / Reptilian Profile Plus (Abaxis Inc., Union City, CA, EE. UU.), por lo que, en caso de utilizar dicho equipo, podríamos reducir el volumen de sangre necesaria a 360 μ l.

4.4.1.3 Cuestiones vinculadas con la facilidad de la toma de muestras de sangre

Otro tema para tener en cuenta para la medición de los parámetros clínicos propuestos a partir de muestras de sangre es la facilidad para la extracción de sangre. Para esto se tuvieron en cuenta las recomendaciones realizadas por Wright y col., (2001); Allender y col., (2008) y Campbell y col., (2015), mencionadas a continuación. Para la

mayoría de las especies de anfibios se recomienda la utilización de capilares heparinizados y de agujas con un calibre de 25 g heparinizadas. El acceso venoso se obtiene a través de la vena abdominal ventral, el plexo lingual, la vena femoral y el corazón. Los anfibios tienen un extenso conjunto de vasos linfáticos que generalmente acompañan a los vasos sanguíneos, por lo que hay que ser cuidadoso para evitar la contaminación de las muestras de sangre con linfa, lo que puede conducir a falsas interpretaciones. La recolección de muestra de sangre a través del plexo lingual es sencilla, pero hay que tener cuidado de que la saliva no contamine la muestra. Para esto se recomienda limpiar la zona con algodón antes de la recolección de sangre. En la zona ventral del individuo, entre el esternón y la pelvis a lo largo de la línea media por vía subcutánea, se encuentra la vena ventral abdominal. En este caso hay que tener cuidado de no dirigir la aguja dorsalmente hacia el celoma ya que pueden dañarse los órganos vitales. En la cara medial de la pata trasera por vía subcutánea, se encuentra la vena femoral, de fácil acceso. Por último, la recolección de sangre desde el corazón se realiza preferentemente en individuos anestesiados previamente, y se recomienda llenar la jeringa con cada latido del corazón para evitar colapsar el corazón con la presión negativa de la jeringa.

En el presente trabajo de tesis, las muestras de sangre se obtuvieron directamente del corazón latiendo, con los individuos previamente anestesiados con MS-222. Los individuos de las dos especies utilizadas presentan características anatómicas relacionadas con corazón que valen la pena mencionar, ya que condicionaron la elección del método utilizado para la extracción de sangre. Por un lado, *L. luctator* presenta musculatura pectoral desarrollada (principalmente los machos), y el corazón está “escondido” por debajo del esternón y esta musculatura, por lo que acceder al mismo atravesando la piel resultó muy difícil, sumado a que presentan la piel resbalosa. Sin embargo, al tener la piel de la zona ventral fina y de coloración clara, resultó fácil identificar la vena abdominal, desde la cual se pudo extraer sangre en algunas pruebas realizadas previamente al desarrollo del protocolo. De todos modos, se decidió tomar sangre directamente del corazón una vez abierto el animal ya que tomando sangre de la vena abdominal se corre el riesgo de contaminarla con linfa. Por otro lado, los individuos de *R. arenarum* presentan musculatura pectoral poco desarrollada, y si bien presentan la piel más gruesa que los individuos de *L. luctator*, el corazón es palpable desde la superficie ventral, por lo que fue posible extraer sangre directamente del corazón latiendo con el animal anestesiado, sin abrir. Cabe destacar que, durante el desarrollo de la tesis,

se realizaron pruebas con individuos de *R. arenarum* con diferentes pesos para probar la resistencia a la anestesia y a la toma de muestra de sangre (datos no publicados). A aquellos individuos pequeños, con un peso entre 2 y 4 gramos, se les pudo sacar entre 5 y 15 μ l y se recuperaron rápidamente (5 minutos luego de la extracción); mientras que, a aquellos individuos grandes, con un peso entre 115 y 140 gramos, se les pudo sacar aproximadamente 1 ml de sangre, y se recuperaron exitosamente a los 10-15 minutos.

4.4.2 Comentarios sobre el análisis de datos

En cuanto al análisis de datos, retomando la tabla presentada en el capítulo 3, en la tabla 4.17, podemos observar el éxito en la realización de los pasos de la metodología propuesta en el esquema para cada uno de los escenarios evaluados.

Tabla 4.17: Esquema de metodología propuesta.

UNIVARIADO	MULTIVARIADO
Comparación de la respuesta de los parámetros clínicos entre sitios (ANOVA) E2 E3 E4 E5 E6	Comparación de respuesta de parámetros entre sitios (ACP y v-test) E3 E4 E6
Especificidad (respuesta asociada a un solo sitio Tuckey) E2 E3 E4 E5 E6	Especificidad (gráfico de burbujas) E2 E3 E4 E5 E6
	Relación entre parámetros y entre niveles (asociación) E2 E3 E4 E5 E6
Comparación de la condición del sitio (conteo de individuos afectados por parámetro) E2 E3 E4 E5 E6	Comparación de la proporción de individuos afectados (AC)
Comparación de la condición de los individuos entre sitios (conteo de la cantidad de parámetros afectados por individuos) E2 E3 E4 E5 E6	Comparación de condición de los individuos (ACP) E3 E4
Efectividad de parámetros (diferencias en ANOVA) E2 E3 E4 E5 E6	Efectividad de parámetros (separación de sitios-AD) E4

E2: escenario 2; E3: escenario 3; E4: escenario 4; E5: escenario 5; E6: escenario 6. La presencia del recuadro gris indica que la metodología funcionó en dicho escenario.

En todos los escenarios se pudo observar una separación entre los sitios dada por alguna de las metodologías utilizadas, siendo el enfoque univariado el más efectivo de los dos. Al momento de comprar la respuesta de los parámetros clínicos entre sitios, los dos enfoques resultaron efectivos para todos los escenarios, con excepción del escenario 5 utilizando el enfoque multivariado, para el cual no fue posible distinguir una separación clara entre los diferentes sitios evaluados. El conteo de las variables condición del sitio y

condición de los individuos utilizadas para el enfoque univariado permitieron detectar la presencia de individuos afectados para todos los parámetros en diferentes porcentajes para cada sitio. Mientras que al analizar estas variables desde el enfoque multivariado, el análisis de contingencia multivariado no detectó diferencias significativas para la frecuencia de ocurrencia de individuos afectados o normales en los sitios, y al comparar la condición de los individuos a partir del ACP, para los escenarios 3 y 4 se pudo distinguir una separación entre individuos afectados y normales, existiendo una correspondencia entre los individuos afectados y los sitios afectados por las descargas cloacales y/o el cinturón florihortícola.

Por último, los escenarios 2 y 4 son los únicos que mostraron resultados significativos en el análisis discriminante del enfoque multivariado. Los parámetros CHCM, RGR, Hb, VCM y N:L aportaron a la separación de los sitios para ambos escenarios.

Si bien para la mayoría de los escenarios los resultados del análisis univariado fueron más informativos que los resultados del análisis multivariado, hay que tener en cuenta que para la mayoría de los escenarios el n utilizado fue menor a 50 individuos en total, lo que dificulta la realización de análisis multivariados (este tema se discutirá en el próximo capítulo). De todas maneras, al aplicar ambos enfoques, podemos observar que existe una separación entre los sitios, siendo los individuos de *L. lactator* provenientes de las descargas cloacales los que presentan el estado de salud más afectado para los escenarios 2 y 3, incluso considerando que, en los 2 escenarios, se colectaron individuos de diferentes sitios (DC1 y DC2). En el caso de *R. arenarum* se puede distinguir que los individuos provenientes de las descargas cloacales y la industria petroquímica son los que presentaron el estado de salud más afectado.

En este punto, en el que se considera los sitios de estudio ubicados en la zona de influencia de las problemáticas estudiadas, es importante resaltar que la modificación de los ambientes por parte del hombre ha generado que tengamos que cambiar de sitios de estudio año a año en dos oportunidades. El sitio IP1 correspondiente al escenario 1 muestreado durante el año 2016, correspondía a una zanja. Este sufrió modificaciones durante el año 2017, por obras de entubamiento y nos llevó a tener que elegir un nuevo sitio (IP2). El sitio IP3 correspondía a un sitio donde a partir de las lluvias se formaba una charca transitoria y se reproducían los individuos de *R. arenarum*, y fue muestreado durante el año 2018 (escenario 5). Durante el año 2019 se realizaron obras de rellenado

para la construcción, por lo que tuvimos que seleccionar otro sitio ubicado a 300 metros de este (IP4).

COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE SEPARAN ENTRE SITIOS:

En el capítulo 3 se vio cómo funciona la herramienta, y se recomendó una lista de parámetros clínicos para ser utilizados para separar entre sitios. En el presente capítulo, se puso a prueba dicha herramienta, y además se sumó la evaluación de parámetros clínicos a otro nivel (nivel plasmático). A continuación, se realizará una interpretación general de cómo se comportaron los parámetros, sin detallar lo que pasó con cada uno en los diferentes escenarios.

Los parámetros a nivel individuo y sanguíneo respondieron en ambas especies en todos los escenarios menos en el escenario 5, mientras que los parámetros a nivel inmunológico respondieron poco en los escenarios 2 al 6, considerándose útiles para diagnosticar el estado de salud de los individuos provenientes de los diferentes sitios afectados por la actividad antrópica y realizar inferencias sobre la calidad del ambiente. Los parámetros a nivel bioquímico no pudieron ser evaluados en los escenarios 3 al 6 debido a la pandemia, pero al interpretar los resultados obtenidos en el escenario 2, observamos que aquellos que mostraron diferencias en el escenario 2 no coinciden con los parámetros propuestos en el capítulo 3. La evaluación de los parámetros a nivel plasmático permitió observar que solamente un 25% respondió en ambas especies, sin existir una coincidencia en ambos casos. Sin embargo, esto último puede deberse a que se evaluaron en individuos provenientes de dos problemáticas diferentes (la industria petroquímica para *R. arenarum* y las descargas cloacales para *L. luctator*).

Teniendo en cuenta la respuesta de los parámetros clínicos, y la cantidad de escenarios en los que respondieron, podemos establecer el siguiente orden decreciente de efectividad de parámetros: Hto-RGR-IHS > Hb-HCM-CHCM > VCM-Eos > ICC-Neu-Mon-N:L-RTGB > IGS-Bas-Lin-RTT. Los parámetros plasmáticos y bioquímicos al ser estudiados solamente un año no fueron considerados para incorporarlos al ranking.

En cuanto a los parámetros a nivel plasmático se recomienda realizar un nuevo muestreo para su medición en individuos provenientes de sitios de referencia, para poder obtener un intervalo de referencia más informativo para ambas especies, y evaluar su efecto en individuos afectados, ya que la escasez de información sobre la respuesta de estos parámetros en anfibios muchas veces dificulta la interpretación de los resultados obtenidos. De los resultados obtenidos en la presente tesis, podemos decir que, los

parámetros PT, Alb, Glob, COL, y Urea fueron útiles para evidenciar efectos en individuos de *R. arenarum* provenientes de la industria petroquímica; mientras que HDL, VLDL, Mg y Ami fueron útiles para evidenciar efectos en individuos de *L. tigrina* provenientes de las descargas cloacales, lo que podría indicar que estos parámetros son específicos para cada problemática evaluada.

CARACTERIZACION DEL ESTADO DE SALUD EN LOS DIFERENTES ESCENARIOS.

Una vez demostrado que la herramienta propuesta puede ser aplicada a los diferentes escenarios, y teniendo en cuenta los temas discutidos, a continuación, se realizará un diagnóstico del estado de salud de los individuos provenientes de cada sitio en cada escenario.

Escenario 2: Al considerar toda la información obtenida, si bien existen individuos con parámetros afectados en todos los sitios, las diferencias observadas en los porcentajes de individuos afectados por sitio, sumado con los resultados de los análisis estadísticos, nos permiten decir que los individuos provenientes de CFH1, IP2 y DC2 presentaron el estado de salud más afectado que los individuos provenientes de SR2. Al intentar realizar un diagnóstico del estado de salud podemos decir que los valores elevados de IHS, Hto y VCM, y valores menores de CHCM, caracterizaron a los individuos afectados del cinturón florihortícola (CFH1), valores elevados de Hto y RGR caracterizaron a los individuos afectados de la industria petroquímica (IP2), y valores elevados de Hto, RGR, Hb, y RTT caracterizaron a los individuos afectados de las descargas cloacales (DC2). Estos resultados coinciden con lo discutido en el capítulo anterior, por lo que podemos asociar esta respuesta a un mecanismo fisiológico para compensar la hipoxia generada en los tejidos por la exposición a factores de estrés. Los individuos de CFH1 presentaron además el IHS elevado, lo que indica que el hígado está agrandado, y CHCM disminuida, que podría estar relacionada a una falla en la producción de eritrocitos por una síntesis de ADN alterada. Si bien con la suma de evidencias presentadas no es posible diagnosticar una patología clara, a partir del análisis conjunto de los enfoques realizados, podemos determinar que todos los individuos provenientes de los sitios evaluados en este escenario presentan el estado de salud afectado, siendo los individuos de CFH1, IP2 y DC2 los que presentan una peor condición. Esto indica que, si los anfibios son considerados bioindicadores, estos sitios se encuentran alterados. Cabe destacar que los machos provenientes de las descargas cloacales presentaron caracteres

sexuales secundarios de hembras, lo cual podría deberse a la feminización por la exposición a metabolitos hormonales, tal como se observó en peces (Gross-Sorokin y col., 2006)

Escenario 3: Al considerar toda la información obtenida, si bien existen individuos con parámetros afectados en todos los sitios, los análisis estadísticos realizados mostraron una separación entre los individuos provenientes de SR4 y los provenientes de DC1 y SR3, con mayor presencia de individuos afectados en las descargas cloacales (DC1) y uno de los sitios de referencia (SR3). Si bien con la suma de evidencias presentadas no es posible diagnosticar una patología clara, la mayoría de los individuos de DC1 presentaron el estado de salud más afectado. Los valores elevados de Eos, HDL y Ami, y valores bajos de Neu, N:L y Mg caracterizaron a los individuos afectados de las descargas cloacales (DC1). La suma de evidencia presentada de la respuesta a diferentes niveles nos permite asociar la respuesta a una exposición a estresores como fármacos o tóxicos, lo que se evidencia en los niveles elevados de HDL (Walker y Tomlinson, 2018). Los valores elevados de la enzima Ami indica que presentan problemas a nivel digestivo (Janowitz y col., 1959), y el número elevado de eosinófilos indica parasitosis (Klion and Nutman, 2004). Si bien los resultados del análisis estadístico muestran que presentan Hto y RGR elevados, al considerar la tabla de valores afectados, se puede observar que estos valores son normales, por lo que no podemos asociar esta respuesta a un estado de salud afectado. A partir de la información presentada podemos decir que los individuos de DC1 presentan el estado de salud más afectado que los individuos de SR4, lo que indica que este sitio se encuentra más alterado.

Escenario 4: Al considerar toda la información obtenida, si bien en todos los sitios existen individuos con valores de los parámetros afectados, los individuos del sitio de referencia (SR0) presentaron la menor cantidad de parámetros con valores afectados. Los valores disminuidos de ICC, IHS, ICG, IGS, Hto y Hb caracterizaron a los individuos afectados del cinturón florihortícola (CFH1); y los valores disminuidos de ICC, IHS, ICG, Hto, RGR, y Hb, y valores elevados de VCM y Mon, caracterizaron a individuos afectados de las descargas cloacales (DC3). La disminución de los parámetros sanguíneos determina que los individuos presentan anemia. Esto puede deberse a que se encuentran expuestos a factores de estrés que impiden la producción de los glóbulos rojos, por fallas en los órganos hematopoyéticos (principalmente médula ósea e hígado en anfibios) o que dañan la estructura de los glóbulos rojos circulantes, causando imposibilidad de unión

entre el oxígeno y la hemoglobina para transportarlo a los diferentes tejidos, generando hipoxia (Javed y col., 2016). Además, estos individuos presentaron un estado general deteriorado, con un bajo fitness (ICC bajo), con IHS, ICG y IGS disminuidos. Si bien con la suma de evidencias presentadas no es posible diagnosticar una patología clara, considerando que los individuos fueron colectados durante la época reproductiva, los valores bajos de estos índices indican que no presentan una buena reserva energética, lo que afectaría el éxito reproductivo, y el hígado presentaría una posible falla en la producción de diversas sustancias importantes para el metabolismo y en la movilización de energía utilizada para la reproducción (Pereira y col., 1993). Además, el IGS bajo presentado en individuos de CFH1 sugiere que la energía que debe ser utilizada para el funcionamiento de las gónadas durante esta etapa, está siendo utilizada para hacer frente a un factor estresante. El número elevado de monocitos, tal como se observó en individuos de las descargas cloacales, podría estar implicado en la eliminación de agentes microbianos o degradación de material de desecho mediante fagocitosis (Kogut y col., 1994).

Los valores observados en los individuos provenientes del sitio de referencia (SR0) nos permiten decir que estos presentan buen estado de salud, con reservas energéticas necesarias para la etapa reproductiva en la que se encuentran.

Si consideramos a los anfibios como bioindicadores, podemos decir que los sitios pertenecientes al cinturón florihortícola y a las descargas cloacales se encuentran afectados.

Escenario 5: En este escenario, la suma de evidencias no fue suficiente para realizar un diagnóstico ya que la cantidad de parámetros que resultaron efectivos para la comparación entre sitios fue muy baja y, además, para todos los sitios hubo individuos con valores afectados para todos los parámetros. Si bien con la suma de evidencias presentadas no es posible diagnosticar una patología clara, valores bajos de ICC y elevados de Mon caracterizaron a individuos afectados de las descargas cloacales (DC3); y valores elevados de Bas caracterizaron a individuos afectados de la industria petroquímica (IP3), por lo que, al considerar a los anfibios con bioindicadores, podemos decir que los sitios correspondientes a la industria petroquímica y las descargas cloacales están afectados.

Escenario 6: Al considerar toda la información obtenida, si bien en todos los sitios existen individuos con valores de los parámetros afectados, los individuos del sitio de

referencia (SR0) presentaron la menor cantidad de parámetros afectados. Los valores disminuidos de IHS, Hto, RGR, PT, Alb, Glob y COL y elevados de Urea caracterizaron a los individuos provenientes de la industria petroquímica (principalmente de IP5). Esto nos indica que pueden estar atravesando una enfermedad hepática y/o renal. El hígado y los riñones son los principales órganos involucrados en el metabolismo, la desintoxicación y la biotransformación de los xenobióticos, y por lo tanto son altamente susceptibles al daño mediado por metales pesados. El hígado es el encargado de sintetizar sustancias muy importantes para el metabolismo de los organismos, entre ellas, las proteínas (McCuskey, 2006). Un IHS bajo nos indica que el hígado podría presentar debilitada la maquinaria celular para llevar a cabo la síntesis, lo que lleva a la baja producción de proteínas, e incluso a una baja concentración de colesterol. Por otro lado, también se ha documentado que el hígado participa en la producción de glóbulos rojos en anfibios, por lo que una afección a nivel de este órgano también llevaría a la baja concentración de glóbulos rojos (McCuskey, 2006). Medina y col., (2016) reportaron disminución en la concentración de albumina en plasma en individuos expuestos a Cadmio con evidencias de alteraciones en el hígado.

Por otro lado, podrían estar atravesando una falla a nivel renal, debido a que el riñón es forzado a eliminar los tóxicos y se daña. Cuando el riñón no funciona bien, la urea (producto del metabolismo) no se elimina con facilidad, y queda en el cuerpo (urea en plasma elevada) (Jayawardena y col., 2017). Por otro lado, las proteínas no se reabsorben y se pierden por la orina (proteínas disminuidas) (Adham y col., 2002; Medina y col., 2016). Como se pierden por la orina, y no van a los músculos, el animal adelgaza. Los valores bajos de Hto y RGR puede deberse a que el riñón secreta la hormona eritropoyetina que estimula a la producción de glóbulos rojos, y como existe daño renal, existe una falla en la producción de esta hormona (Bounous y Harpur, 2018). Al considerar a los anfibios como bioindicadores, podemos decir entonces que los sitios correspondientes a la industria petroquímica se encuentran afectados.

4.5 CONCLUSIONES

Como parte de la herramienta desarrollada, podemos decir que, el protocolo para la obtención y el procesamiento de muestras funcionó correctamente, y puede ser implementado en otros estudios teniendo en cuenta las recomendaciones sobre

la extracción de sangre. Además, podemos decir que resulta más ventajoso extraer sangre de individuos de *R. arenarum*, ya que se puede sacar mayor cantidad de sangre por su peso y por la facilidad de acceso al corazón en caso de no querer sacrificar al animal.

Los análisis univariados y multivariados realizados brindaron información sobre los parámetros que permiten separar entre sitios, y entre individuos afectados y normales, así como brindar información sobre la relación entre ellos. Al realizar una interpretación integral de todos los resultados queda claro que la herramienta funciona en manera conjunta, y que, de haber realizado interpretaciones parciales, teniendo en cuenta un solo enfoque, no hubiésemos llegado a las mismas conclusiones que teniendo en cuenta la herramienta en su totalidad.

Podemos concluir que la herramienta propuesta pudo ser aplicada en los diferentes escenarios, brindando evidencias útiles para diagnosticar el estado de salud de los individuos y para hacer inferencias sobre la calidad del ambiente al utilizar a los anfibios como bioindicadores.

A partir de los resultados obtenidos, y su interpretación podemos concluir que los cambios en la respuesta de los diferentes parámetros clínicos evaluados en las dos especies se pueden interpretar como una consecuencia de vivir en sitios degradados, producto de las actividades antrópicas evaluadas (cinturón florihortícola, industria petroquímica, descargas cloacales), por lo que la evaluación del estado de salud de los individuos brinda información que permite inferir la calidad del ambiente.

CAPITULO 5: CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES

Como se mencionó en la introducción de la tesis, la ecotoxicología se encuentra entre las disciplinas que abordan el estudio del medio ambiente y las problemáticas ambientales con un enfoque integrador. Según Newman y Clements, (2008), la ecotoxicología tiene como objeto de estudio los efectos adversos provocados por contaminantes físicos, químicos o biológicos sobre los diferentes componentes de un ecosistema. Para abordar el objeto de estudio, reúne ideas y métodos de otras disciplinas en un marco ordenado y unificado de entendimiento (principio de consiliencia), siendo las diferentes escalas de estudios las que condicionarán junto con la técnica aplicada para su estudio, su pertenencia a una u otra disciplina. En este contexto, y para evitar confusiones en las escalas y especialidades asociadas, la ecotoxicología propone el esquema “concatenación causa-efecto-significancia” (figura 1-introducción) y lo utiliza como estrategia de investigación para abordar las problemáticas ambientales actuales relacionando todos los niveles de manera integral. En este esquema, se realiza una observación de procesos o efectos en un nivel, se buscan explicaciones en el nivel inferior y se predicen efectos en el nivel ecológico inmediatamente superior (Caswell, 1996).

Al momento de abordar estudios sobre la naturaleza la Ecología presenta definiciones de ambiente, hábitat y nicho. El hábitat de un organismo es el sitio donde vive o los sitios donde se espera encontrarlo. Sin embargo, el nicho ecológico no sólo incluye el espacio físico que ocupa el organismo, sino también su papel funcional en la comunidad (su posición trófica, por ejemplo) y su posición dentro de los gradientes ambientales de temperatura, humedad, pH, suelo, y otras condiciones de existencia (factores ambientales). Estos tres aspectos del nicho ecológico se designan convencionalmente como el nicho espacial o hábitat, el nicho trófico y el nicho multidimensional o hipervolumétrico. En consecuencia, el nicho ecológico de un organismo no sólo depende del sitio donde vive sino también incluye la suma total de los requisitos de su entorno (Odum y Barret, 2006).

Hutchinson (1957) sugirió que el nicho podría visualizarse como un espacio multidimensional o hipervolumen dentro del cual el entorno permite que el individuo o la especie sobreviva de manera indefinida. También definió al nicho fundamental máximo como “el hipervolumen habitado de manera abstracta” cuando la especie no está restringida por competencia u otras interacciones bióticas limitantes, por lo que cada

individuo de la población tiene un estado óptimo en el cual vivir saludablemente, y por lo tanto su estado de salud es óptimo; y el nicho real como “un hipervolumen más pequeño ocupado bajo restricciones bióticas específicas”.

Considerando los componentes del paradigma ecotoxicológico en su conjunto, y con la intención de aumentar la claridad de la explicación, imaginemos al ambiente como la combinación de un conjunto de factores representados por flechas que poseen diferentes magnitudes. En la figura 5.1a se representa una porción del mundo en 3 dimensiones, la cual podría corresponder a un ecosistema como cualquiera de los estudiados en este trabajo de tesis.

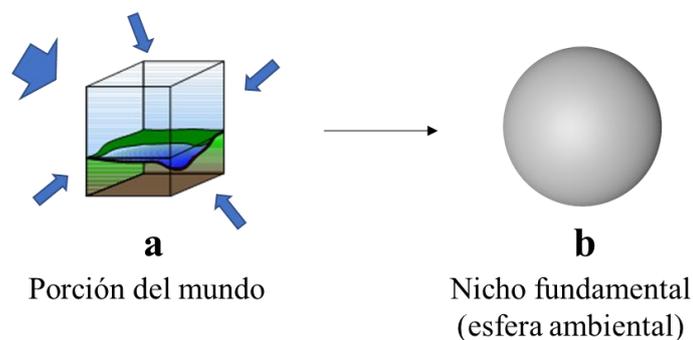


Figura 5.1: Representación del ecosistema estudiado.

En la figura 5.1, las flechas representan los factores, que modelan la porción de mundo en un HIPERVOLUMEN *sensu stricto* Hutchinson, que representa al espacio multidimensional el que, de aquí en adelante, representaremos como una esfera 3D (nicho fundamental-esfera ambiental) (figura 5.1b). Dentro de esta esfera ambiental viven y se desarrollan los individuos de las diferentes especies, entre ellas las especies de anuros objeto de este estudio.

En la presente tesis proponemos que cualquier alteración producida provocará estrés en el ecosistema. Si tenemos en cuenta el modelo conceptual de “esfera ambiental”, estas alteraciones producidas sobre el ecosistema podrían visualizarse como cambios en la forma de la esfera a partir del efecto producido por los factores vinculados al desarrollo de las actividades antrópicas que poseen influencia sobre estos ambientes (ver figura 5.2).

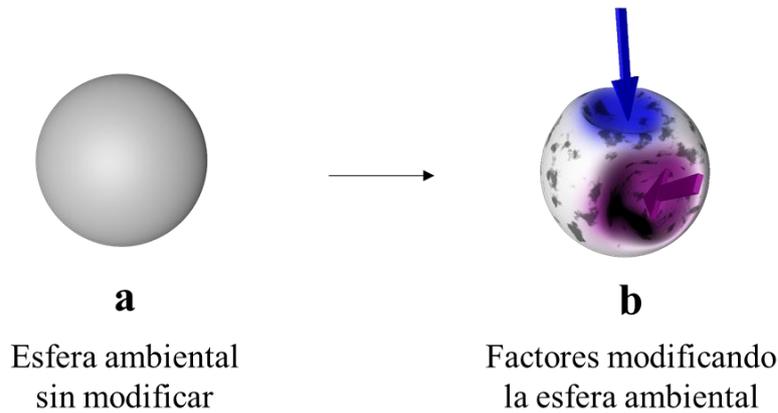


Figura 5.2: Representación del cambio en la esfera ambiental a partir de los factores estresantes. Las flechas representan a los factores estresantes.

Con la idea de representar de manera simple los factores estresantes evaluados, decidimos determinar arbitrariamente para cada una de las actividades antrópicas evaluadas, los dos factores más representativos que influyen sobre el nicho fundamental y los representamos como flechas (figura 5.2b), a saber: para el cinturón florihortícola, insecticidas y herbicidas; para la industria petroquímica, hidrocarburos y metales pesados; y para las descargas cloacales, fármacos y hormonas. Las flechas (factores estresantes) modifican la forma original de las esferas ambientales, y esa modificación en la forma va a producir un efecto negativo sobre el estado de salud de los individuos que habitan dentro de ese nicho, alterando su homeostasis.

El concepto de biomarcador empleado en esta tesis, definido como los cambios estructurales o funcionales que indican influencias ambientales, se encuentra estrechamente vinculado al concepto planteado anteriormente, que indica que, si un factor estresor provoca un cambio en la forma de la esfera ambiental, este cambio afectará a los individuos que habitan dentro de esa esfera. Si recorremos el camino de manera inversa, podemos inferir la calidad del ambiente a partir del efecto observado en los individuos.

Uno de los supuestos de esta investigación es que, en un pasado no tan lejano, antes que se emplace la ciudad (hace aproximadamente 250 años) todos los ambientes (sitios) que evaluamos en la presente tesis tenían la misma forma, dicho en términos estadísticos, pertenecían a una misma población ambiental en donde se distribuían las diferentes especies de anuros cada una con una población con un pool genético homogéneo.

Con la intención de ser claros y facilitar el entendimiento de nuestro modo de razonar al interpretar los resultados obtenidos en los diferentes capítulos, y contextualizar

dichas interpretaciones, es oportuno enunciar cuales serían los resultados esperados. Si realizáramos un muestreo en ese momento, en esos sitios de estudio siguiendo la metodología propuesta en el presente trabajo de tesis, probablemente obtendríamos como producto de la investigación fisicoquímica y del diagnóstico de calidad de ambiente, las mismas esferas ambientales, con las mismas características. Es decir, no encontraríamos diferencias significativas entre los sitios, y al momento de evaluar el estado de salud de los individuos provenientes de cada lugar, nuestra hipótesis hubiera sido que no iba a haber diferencias entre los parámetros clínicos evaluados, ya que los individuos pertenecían a la misma población biológica, y considerando el enfoque univariado, para cada variable estudiada las mediciones realizadas en cada sitio pertenecerían a las mismas poblaciones estadísticas.

Las actividades antrópicas descritas en el capítulo 1, fueron modificando la forma de las esferas, como resultado de la interacción de diversos factores. Por lo tanto, al realizar el muestreo de esos sitios durante el desarrollo de la tesis, obtuvimos esferas ambientales diferentes, con formas distinguibles entre sí y características específicas. Esto trajo como consecuencia que las poblaciones de anuros sean diferentes entre sí, ya que la presencia de barreras geográficas genera un aislamiento de las poblaciones debido a la interrupción de la conectividad, por lo que están expuestas a distintas esferas ambientales, y por lo tanto encontraremos respuestas diferentes en las poblaciones de anuros evaluadas. La relación causa-efecto puede ser visualizada empleando un modelo predictivo de tipo caja negra, el cual es utilizado para corroborar hipótesis simples (causa-efecto). Este modelo, si bien no explica los procesos que suceden dentro de la caja, permite adjudicar al factor estudiado (variable independiente), la culpabilidad de generar el efecto observado. La medición de los efectos, a su vez, se realiza habitualmente como diferencias significativas en la magnitud de la variable de respuesta (variable dependiente). Teniendo en cuenta la idea de caja negra, el efecto de las problemáticas ambientales, independientemente de si tienen un factor o no que las caracterice, lo vamos a interpretar como la exposición de los anuros (organismos de prueba) a cada esfera ambiental (variable independiente) con su forma característica, la cual provoca un efecto (estrés) sobre los individuos que se manifiesta en su estado de salud (variable dependiente). La forma de las esferas ambientales, actúan como factor de estrés (desorganizador y/o perjudicial), que provoca una alteración de la normalidad a la cual el organismo tiende a volver todo el tiempo a partir de diversos mecanismos; el conjunto de respuestas al factor estresante se denomina estrés (Newman, 2013), el cual es estudiado

a partir del estado de salud de los anuros mediante los enfoques propuestos y finalmente aplicando la herramienta desarrollada.

Teniendo en cuenta lo antes dicho, proponemos el siguiente esquema de caja negra (figura 5.3), en el que se observa las esferas ambientales iguales entre sí, las cuales sufren una modificación a causa de las actividades antrópicas, adoptando formas (y características) específicas:

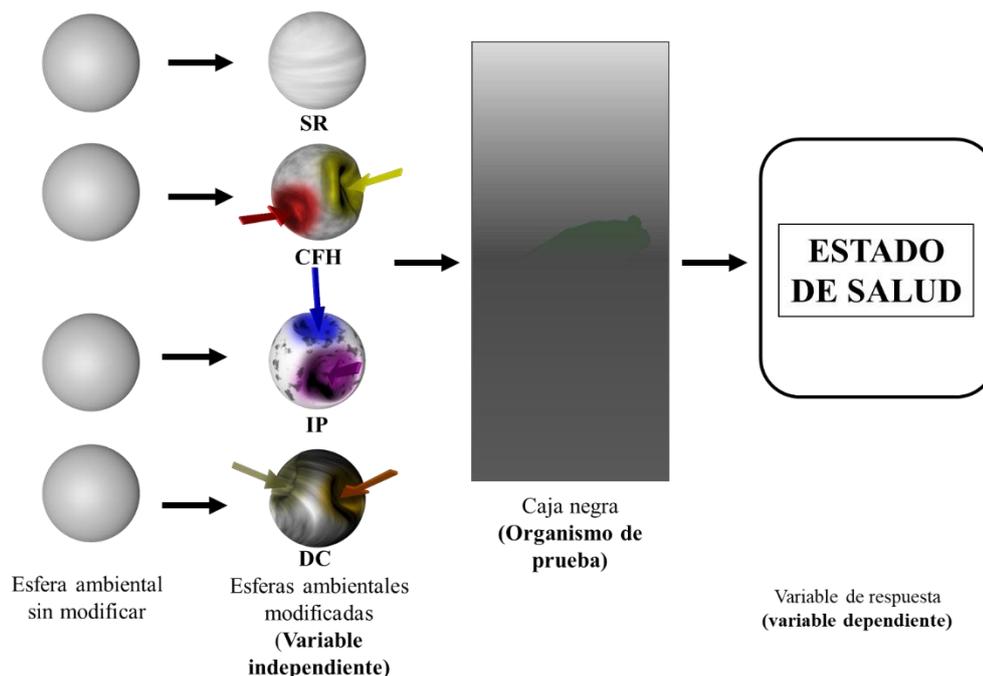


Figura 5.3: Esquema de modelo de *caja negra*, utilizada para esquematizar la relación causa-efecto observada al evaluar un factor (esfera ambiental) en un organismo de prueba, midiendo las variables de respuesta (estado de salud). SR: sitio de referencia. CFH: cinturón florihortícola. IP: industria petroquímica. DC: descargas cloacales.

Teniendo en mente este enfoque de esferas ambientales y de evaluación del estado de salud a partir del estudio integral de los biomarcadores (parámetros clínicos), vamos a repasar cómo cada uno de los capítulos fue aportando a esta idea:

A partir de los resultados obtenidos en el capítulo 1, al evaluar la calidad del agua y sedimentos a partir de la medición de parámetros fisicoquímicos de los sitios de estudio, junto con la información publicada sobre la presencia de diferentes contaminantes y sus concentraciones, podemos concluir que **los sitios de estudio presentan atributos específicos que los caracterizan y permiten diferenciarlos entre sí, y además, asociar estos atributos a cada problemática estudiada en función del tipo de contaminación que estos presentan como consecuencia de las actividades que allí se desarrollan.**

Esta conclusión coincide con uno de los supuestos de la investigación, que considera que los sitios (esferas ambientales) son diferentes y presentan características específicas, producto de las problemáticas ambientales.

Al considerar la información publicada sobre los contaminantes presentes en cada sitio de estudio podemos concluir que en todos los sitios se detectaron contaminantes representativos de la actividad antrópica que se desarrolla en las cercanías. Además, a partir de la comparación de los parámetros fisicoquímicos medidos *in situ* y en el laboratorio con el objetivo de inferir la calidad del ambiente, pudimos determinar que los sitios correspondientes a las descargas cloacales son los que se encuentran en peor estado, con mayores valores de conductividad, dureza, alcalinidad, fósforo, nitrógeno, y menores valores de oxígeno disuelto, seguidos por los sitios correspondientes a la petroquímica.

Desde el punto de vista de la herpetología, en la actualidad se conoce cuáles son las técnicas, el esfuerzo de muestreo y las condiciones al momento de realizar un monitoreo que permita describir, estimar y finalmente comparar los parámetros ecológicos de comunidades de anfibios (diversidad, riqueza específica, abundancia) (Heyer y col., 1994). Realizar este tipo de estudios excedió los tiempos y objetivos de la presente tesis, sin embargo, consideramos que la información obtenida en el presente trabajo de tesis, para la cual se registraron las especies presentes en cada sitio durante los muestreos realizados para la colecta de individuos de manera sistemática considerando los procedimientos y técnicas de monitoreo de anfibios, constituye información valiosa que merece ser considerada e incorporada en el contexto de la investigación. Es por esto que, teniendo en cuenta los alcances y limitaciones antes mencionadas, las conclusiones a las que llegamos las esbozamos como hipótesis o preguntas de investigación para ser abordadas en futuros estudios. Pudimos evidenciar que las especies *C. ornata* y *L. gracilis* fueron encontradas solamente en un sitio de referencia, y *O. americanus* en dos sitios (uno de referencia y uno de la petroquímica). Si comparamos estos resultados con la información provenientes desde la ecotoxicología sobre su sensibilidad, y desde la herpetología sobre su biología y ecología (Natale, 2006), podríamos considerar a estas especies como candidatos para emplear como indicadores de la calidad ambiental.

Si bien en las primeras etapas de la investigación se realizaron prospecciones del área de estudio con el propósito de identificar cuerpos de agua que tuviesen características que permitan la reproducción de las diferentes especies de anuros, a partir de los registros obtenidos se constató la presencia de *R. arenarum* en la mayor cantidad de sitios (12 de

los 14 estudiados), seguida *L. luctator* y *B. pulchella* las cuales se encontraron en 11 sitios.

La presencia en la mayoría de los sitios, sumado a sus características morfológicas, nos permitió corroborar la elección de *R. arenarum* y *L. luctator* como objeto de estudio y evaluar un conjunto de biomarcadores para realizar inferencias de su estado de salud, y finalmente proponerlas como bioindicadores y posibles biomonitores de la calidad del ambiente.

En el capítulo 2, los datos obtenidos de la revisión detallada de las publicaciones que evalúan y reportan información sobre los parámetros clínicos en especies de anuros, fueron clasificados y agrupados para conocer la variabilidad aportada por las variaciones metodológicas producto de los procedimientos empleados por los diferentes grupos de investigación, la variabilidad asociada con el grupo taxonómico, la variabilidad asociada con la procedencia de los individuos, y obtener información útil que permita generar intervalos de referencia. El análisis permitió evidenciar que los parámetros evaluados presentan una gran variabilidad, y que la utilización de los diferentes agrupamientos nos llevaría a diagnósticos e interpretaciones muy diferentes. La variabilidad disminuye significativamente al emplear los datos generados en la presente tesis para la misma especie y el mismo sitio. Por lo que para la generación de intervalos de referencia para ambas especies se utilizaron los datos obtenidos de los individuos de cada especie provenientes de sitios de referencia.

La generación de intervalos de referencia en especies silvestres resulta información muy valiosa, ya que la cantidad de información disponible sobre los parámetros evaluados en estas especies es escasa, lo que dificulta la comparación y discusión de los resultados e impide realizar diagnósticos precisos sobre el estado de salud de los individuos. Si bien en general el número mínimo de muestras para calcular los intervalos según la bibliografía es de referencia es de 120, y en medicina veterinaria se recomienda un mínimo de 40 individuos para establecer un intervalo de referencia, debido a la dificultad de obtener muestras de las especies evaluadas (Kaneko y col., 1997), el análisis de la variabilidad permite establecer el tamaño de muestra mínimo que resulta representativo y permite hacer inferencias confiables sobre los parámetros poblacionales. En la presente tesis, se utilizaron 123 individuos de *L. luctator* y 48 individuos de *R. arenarum*, por lo que consideramos que constituyen un número representativo de la distribución de la variable dentro de la población.

Por otro lado, para cada parámetro clínico, se generó información sobre la probabilidad de cometer un error al medirlo, la dificultad del método utilizado, el costo del método, si requiere sacrificar al animal, y la variabilidad y estabilidad en los agrupamientos propuestos en la metodología del capítulo 2, con el objetivo de describir las ventajas y desventajas de la utilización de cada parámetro clínico en la investigación. Con toda esta información se realizó una valoración de los parámetros, siendo información importante al momento de recomendar los parámetros clínicos a utilizar en estudios sobre el estado de salud de los individuos.

Por lo antes dicho podemos decir que aportamos información valiosa que contribuye con evidencias fuertes, útiles al momento de realizar investigaciones sobre el estado de salud de especies autóctonas de anuros en el marco del estudio de problemáticas ambientales locales. El estudio de la variabilidad y el comportamiento de la variabilidad de los parámetros clínicos permitió establecer intervalos de referencia más confiables para *L. luctator* y *R. arenarum*, los que fueron aplicados a lo largo de la tesis establecer la condición de los individuos y la condición del sitio.

Además, generamos información valiosa de dos especies de anuros autóctonos, aportando información sobre los intervalos de referencia para 47 parámetros clínicos utilizados en la evaluación del estado de salud de los individuos.

En el capítulo 3, se desarrolló una herramienta para la evaluación integral del estado de salud de los anuros, utilizando individuos de *L. luctator* como organismos de prueba, empleando un enfoque integral. **Se logró desarrollar una herramienta de procesamiento y obtención de muestras de los individuos, y se analizó la respuesta individual y conjunta de los parámetros clínicos a diferentes niveles de organización a partir de la aplicación de dos enfoques (univariado y multivariado) para interpretar e integrar la información;** además se evaluaron parámetros como la condición del sitio y la condición del individuo y se definieron criterios para establecer el estado de salud de los individuos.

A partir de la herramienta desarrollada, se evidenció el efecto de la actividad florihortícola, la industria petroquímica, las descargas cloacales y sitios de referencia, sobre los diferentes parámetros clínicos y sobre el estado de salud de los individuos mediante la realización de estudios integrales. Considerando el empleo de la especie estudiada como bioindicador, se definieron criterios para determinar la condición de los ecosistemas estudiados a partir de la respuesta de los parámetros clínicos

(biomarcadores). Los análisis realizados permitieron determinar la efectividad y especificidad de los parámetros clínicos evaluados y las relaciones existentes entre ellos.

Como ya se mencionó en la introducción del capítulo 3, el abordaje de estudios en campo es complejo, y requiere de mucha información al momento evaluar efectos e identificar el factor que los ocasionan, ya que la exposición de los individuos a las esferas ambientales, constituyen escenarios complejos que incluyen tanto las interacciones de los individuos con los contaminantes a lo largo de gran parte de su ciclo, como la influencia de factores intrínsecos y extrínsecos (de origen natural o antrópico). Cada una de las esferas, con su forma específica, actúa como factor de estrés que provoca una alteración de la homeostasis en los organismos. Generalmente, las concentraciones ambientales de los contaminantes no llegan a provocar efectos letales agudos, sino que provocan una respuesta de tipo subletal por exposición de tipo agudo y/o crónico. La respuesta como parte del esfuerzo por mantener o reestablecer un estado que se aproxime a la normalidad (homeostasis), es lo que se conoce como *ESTRÉS*. Según van Straalen (2003), una situación de estrés surge cuando por influencia de uno o varios factores, un organismo se encuentra fuera de su nicho, generando una inversión de energía para volver a la normalidad, impidiendo la inversión de esa energía en procesos como el crecimiento y la reproducción, pero logrando sobrevivir temporalmente. El estrés es aliviado volviendo al nicho mediante el uso de mecanismos de comportamiento, suprimiendo al factor estresante, o generando una respuesta fisiológica para lo que necesita una adaptación fisiológica temporal que permita la supervivencia, o cambiando los límites de su nicho mediante adaptación genética. Es por esto que el uso y la interpretación de un conjunto de parámetros clínicos evaluados simultáneamente a diferentes niveles e interpretados de manera integral para detectar efecto (cambios en los parámetros respecto de sus valores normales) resulta una herramienta adecuada para detectar la expresión de estrés, debido a que se evalúan cambios a diferentes niveles con numerosos indicadores (biomarcadores) los que se encuentran relacionados en diferente grado, resultando una estrategia sensible, representativa e integral.

Este tipo de estrategia, que incluye la medición de varios parámetros clínicos (biomarcadores) a diferentes niveles, la herramienta propuesta para su evaluación, el diagnóstico del estado de salud, y la utilización de especies de anuros como indicadoras, resulta de gran importancia para aplicar en estrategias de biomonitoreo y evaluación de sistemas complejo afectados por diversos factores (contaminación, transformación del hábitat, etc) evitando caer en la trampa del reduccionismo ingenuo (lo que sucedería al

intentar predecir efectos basándonos únicamente en mecanismos observados en un solo nivel, o en un solo parámetro) (van der Oost y col., 2003; Egea-Serrano y col., 2012; Newman, 2014).

En la presente tesis, se utilizaron anfibios como indicadores de la calidad del ambiente, a los cuales se les midió un conjunto de parámetros clínicos a diferentes niveles para evaluar el estado de salud. **Los resultados obtenidos nos permitieron concluir que las actividades antrópicas evaluadas en la presente tesis poseen un efecto negativo sobre el estado de salud de los individuos, lo que se infiere a partir de las variaciones detectadas en el conjunto de parámetros clínicos evaluados. Además, la evaluación del estado de salud de los individuos brinda información que nos permite inferir la calidad del ambiente donde habitan.**

En el capítulo 4, a partir de la información generada en el capítulo 3, se logró aplicar la herramienta desarrollada en diferentes escenarios, los cuales corresponden a individuos machos y hembras de *L. luctator* evaluados en dos años (escenario 2 y 3), y a individuos machos de *R. arenarum* evaluados en tres años (escenario 4, 5 y 6). En los escenarios 3 y 6, además se incorporó la medición de parámetros a nivel plasmático.

Al realizar una interpretación de los resultados obtenidos en ambas especies, pudimos observar, por un lado, que las especies resultan adecuadas como objeto de estudio ya que el procesamiento y obtención de muestras pudo ser realizado correctamente, obteniendo las muestras necesarias para la medición de cada parámetro clínico propuesto. **Se detalló y se realizaron recomendaciones de cómo realizar el procesamiento de los individuos de *L. luctator* y *R. arenarum*, qué orden seguir para la extracción de cada órgano, cómo obtener las muestras y la cantidad de muestra que se necesita para cada medición, cómo conservar las muestras, cómo medir cada parámetro clínico, quedando toda esta información ordenada en un protocolo de procesamiento y obtención de muestras (ver anexo 5).** Por otro lado, en cuanto a los resultados obtenidos de los análisis estadísticos, pudimos observar que **la herramienta funcionó correctamente, quedando claro que, de haber realizado interpretaciones parciales, teniendo en cuenta solamente el enfoque univariado, no hubiésemos llegado a las mismas conclusiones que teniendo en cuenta la herramienta en su totalidad (enfoque uni y multivariado).**

En cuanto a los parámetros plasmáticos, fueron incorporados durante el año 2019 para aprender la técnica junto con el Dr Jorge Pessacq, evaluar las asociaciones con otros parámetros evaluados a diferentes niveles, con la intención de identificar aquellos que

puedan ser utilizados como biomarcadores. Lamentablemente la pandemia impidió completar el estudio, ya que no se pudo realizar la medición de los parámetros a nivel bioquímico y así realizar estudios de asociaciones, por ejemplo. Se espera realizar más estudios de estos parámetros, en individuos sanos e incluso en individuos provenientes de los diferentes sitios afectados por las actividades antrópicas para seleccionar aquellos que puedan ser útiles para evaluar efectos en individuos de *R. arenarum* y *L. luctator*.

En cuanto a los parámetros a nivel sanguíneo, si comparamos la respuesta en ambas especies, podemos observar una respuesta antagónica en todos los casos. Es decir, en *L. luctator* los individuos afectados presentaron valores mayores de Hto RGR y/o Hb (policitemia); mientras que los individuos afectados de *R. arenarum* presentaron valores menores de estos parámetros (anemia) respecto a los valores de referencia. Según Zhelev y col., (2020), quienes evaluaron parámetros a nivel individuo, sanguíneo e inmunológico a lo largo de los años (2013-2019), la evaluación de estos parámetros nos da información sobre los cambios que ocurren en poblaciones que habitan sitios afectados por las actividades antrópicas, y asocian esos cambios con la teoría del síndrome de adaptación planteada por Selye (1956), según la cual la respuesta al estrés de cualquier organismo se considera un proceso de tres fases: reacción de alarma (movilización de la defensa), adaptación o resistencia (adaptación de los sistemas funcionales a la fuerza del estresante) y agotamiento (gasto de la energía de adaptación y posterior muerte). Teniendo en cuenta la teoría del síndrome de adaptación y comparando nuestro estudio con las investigaciones del grupo de Zhelev y col (2013, 2014, 2015a, 2015b, 2017a, 2017b, 2018, 2019) los resultados obtenidos a partir de la evaluación de individuos de *L. luctator*, podrían explicarse como adaptaciones para sobrevivir a las condiciones de estrés (aumento de los valores de los parámetros sanguíneos para satisfacer la demanda metabólica de oxígeno de los tejidos que están “luchando” contra los factores de estrés), mientras que los resultados obtenidos a partir de la evaluación de individuos de *R. arenarum* podrían indicar que se encuentra en la última fase de agotamiento, evidenciado principalmente por la disminución de los parámetros sanguíneos. Sin embargo, al no realizarse un estudio prolongado en el tiempo, y no presentar estudios de genética poblacional, no tenemos evidencia suficiente para dicha explicación.

Otra explicación posible, es que las diferencias observadas en la respuesta a estos parámetros se deben a que las especies presentan diferentes mecanismos de respuesta a los factores de estrés, los que fueron desarrollados de manera independiente durante su historia evolutiva. Otra posible explicación se encuentra vinculada con el mecanismo de

respuesta fisiológica de estos parámetros; y, por otro lado, podría deberse a un proceso de adaptación local. La adaptación local presenta dos componentes, por un lado, una respuesta fisiológica a un estímulo reciente, asociado con un periodo de la vida del individuo, un cambio aislado y temporal de las condiciones ambientales. Y por otro lado un cambio más estable y prolongado de las condiciones ambientales lo que produce en los individuos de la población se adapten incorporando esta respuesta como un atributo a la especie y transmitiéndolo a su descendencia (Kawecki y Ebert 2004).

Con respecto a la especificidad, considerando los resultados obtenidos en todos los escenarios evaluados, podemos asociar los efectos observados en los parámetros clínicos evaluados con la exposición a las diferentes esferas ambientales (actividad florihortícola, industria petroquímica descargas de efluentes cloacales). De los 49 parámetros clínicos evaluados, solamente 3 se correspondieron en la respuesta a la misma problemática en los diferentes escenarios evaluados: aumento de Hto en *L. luctator* provenientes del cinturón florihortícola, aumento de RGR en *L. luctator* provenientes de la industria petroquímica, aumento de Hto y RTT en *L. luctator* provenientes de las descargas cloacales, y un ICC bajo en individuos de *R. arenarum* provenientes de las descargas cloacales, resultando información relevante.

Por lo antes dicho podemos concluir que la herramienta presentada funcionó correctamente en ambas especies, siendo los parámetros a nivel individuo y a nivel sanguíneo los que más respondieron en todos los escenarios. Estos parámetros resultan útiles para conocer la respuesta fisiológica de los individuos expuestos a situaciones de estrés, pudiendo ser utilizados como biomarcadores para evaluar la calidad ambiental.

USO DE ANFIBIOS COMO BIOINDICADORES

Los biomarcadores son utilizados para realizar inferencias sobre el estado de salud de los individuos, mientras que los bioindicadores son utilizados para indicar la calidad del ambiente a partir de su estado de salud. Es por esto que, realizar diagnósticos de salud precisos, nos permitirá realizar mejores inferencias sobre la calidad del ambiente.

Tal como se dijo en el capítulo 2, tanto desde la Ecotoxicología como de la Medicina clínica, se propone la realización de **estudios integrales** utilizando biomarcadores de diferentes niveles para evaluar su objeto de estudio, ya que estos son interdependientes, y su estudio integral permite una mayor comprensión de los resultados (Triquet y col., 2013). Al considerar los estudios que utilizan a los anfibios como

bioindicadores, al momento de comenzar la presente tesis (año 2016), la mayoría de los estudios realizados evaluaban efectos en diferentes niveles de manera aislada, y no existían estudios que integraran la información en un contexto más amplio ((Brodeur y col., 2011; Lascano y col., 2011; Shutler y Marcogliese, 2011; Zhelev y col., 2013; Attademo y col., 2014). Por lo que **el presente estudio aportó elementos para la realización de estudios de la calidad del ambiente de ecosistemas asociados con problemáticas ambientales complejas, empleando un conjunto de biomarcadores a diferentes niveles de organización, utilizando anuros autóctonos como bioindicadores, a partir del diagnóstico integral del estado de salud de los individuos.**

INDICE DE ESTADO DE SALUD

Con respecto a la comparación de los valores de cada parámetro con los intervalos de referencia, si bien estos últimos se generan a partir de un método estadístico, empleando técnicas y protocolos validados y aprobados (ASVCP), la interpretación y el diagnóstico del estado de salud no deja de ser un proceso subjetivo y complejo. En algunos casos las evidencias aportan en un mismo sentido de manera congruente y unificada haciendo que la interpretación y el diagnóstico resulten inequívocos. Por ejemplo, al considerar al individuo 97 no tuvimos dudas de que este individuo estaba afectado, ya que presentó 15 parámetros afectados (incluidos todos los parámetros inmunológicos, el ICC y el IHS), además presentó el hígado, la vesícula biliar y la columna vertebral con anormalidades, y era proveniente de un sitio degradado; por otro lado, para el individuo 27, tampoco tuvimos dudas de que estaba bien, ya que presentó solamente 5 parámetros clínicos afectados (IGS, RGR, VCM, CHCM y AChE en hígado) sin afecciones notorias y además provenía del sitio de referencia. Sin embargo, cuando sucede un caso intermedio, no sabemos si considerarlo afectado o no, por lo que entra en juego el campo de la subjetividad, ya que cada persona tendrá un criterio para considerar a dicho individuo afectado o no. Esta subjetividad individual, resulta un problema al momento de aplicar la herramienta, ya que depende el criterio de cada uno va a dar resultados diferentes. Sin dudas, a la hora de realizar un diagnóstico, todos los parámetros no deberían tener el mismo peso; por ejemplo, no es lo mismo que presenten la actividad GST en hígado afectada, o que presenten el índice hepatosomático elevado, o el índice de condición corporal bajo. Si bien todos los parámetros suman información al momento de realizar un diagnóstico, considerar un enfoque integral y unificado, definiendo la relevancia de cada parámetro al momento de considerar a un individuo como afectado o

no, resulta de gran importancia. En cuanto a la presente tesis, el criterio que nosotros tuvimos en cuenta para considerar a un individuo afectado fue la cantidad de parámetros afectados (cuanta más cantidad de parámetros afectados, mayor probabilidad de considerarlo afectado), la presencia de alguna afección significativa, y en los casos intermedios, tuvimos en cuenta relevancia de cada parámetro.

Teniendo en cuenta los inconvenientes que plantea la subjetividad, una solución es sistematizar el conocimiento generando un índice de salud, tal como se planteó en el objetivo 8 del capítulo 3, y para ello hay varios caminos. Se pueden tomar ideas de cómo se han desarrollado los protocolos de algunos índices bióticos, calidad ambiental, o de índices ya propuestos para biomarcadores (Beliaeff y Burgeot, 2002; Dagnino y col., 2007; Sinha y col., 2009). Con el fin de cumplir con el objetivo 8 (construir un índice de salud a partir de la información obtenida), y no dejar huecos en la investigación, a continuación, presentamos un índice muy simple, con la intención de mostrar cómo la evidencia generada en el presente trabajo consiste en un insumo útil al momento de diseñar un índice. Esta tarea será abordada en un futuro de manera exhaustiva empleando el tiempo y trabajo y dedicación que requiere el desarrollo de un índice útil, no solo en la etapa inicial de diseño sino en el análisis de su comportamiento en general así como también en el de cada uno de sus componentes, lo que permitirá mediante un proceso de comparación y pruebas seleccionar el mejor índice a partir de un conjunto de modelos y opciones, aplicando procedimientos estadísticos y protocolos adecuados para tal fin.

Entonces, a modo de ejemplo, proponemos el siguiente índice: teniendo en cuenta principalmente los resultados del análisis discriminante vinculado con el objetivo 7 del capítulo 3 (seleccionar los parámetros clínicos que permiten detectar diferencias entre los sitios estudiados), y la relevancia biológica de los parámetros evaluados, generamos evidencias para seleccionar los parámetros clínicos a ser utilizados en el índice. Una vez seleccionados los parámetros, a partir de los intervalos de referencia calculados en el capítulo 2, se calculó el intervalo de referencia del índice y para cada sitio. Para el intervalo de referencia se tuvieron en cuenta los valores mínimos y máximos de cada parámetro, mientras que, para los sitios se tuvo en cuenta el promedio de cada parámetro clínico. Para obtener cada valor (los valores del intervalo de referencia y los valores de cada sitio) se realizó una sumatoria de los valores de los parámetros. Para esto se tuvo en cuenta si el efecto negativo observado era “valores mayores” o “valores menores” para cada parámetro (por ejemplo, para ICC, fue “valores menores”, mientras que, para Bas, fue “valores mayores”). Si el efecto negativo era “valores mayores”, se sumaba el valor

del parámetro sin modificaciones; mientras que, si el efecto negativo era “valores menores”, se aplicó la función 1/raíz del valor. Una vez realizada la sumatoria, se generó el intervalo de referencia del índice y luego se realizó una comparación de los resultados obtenidos de la sumatoria de los parámetros de cada sitio, considerando que, si el valor caía dentro del intervalo, el estado de salud era normal; mientras que, si el valor caía por fuera del intervalo, el estado de salud estaba afectado.

$$\text{Índice de salud} = 1/\sqrt{\text{ICC} + \text{IHS} + \text{ICG} + \text{Hto} + \text{Hb} + \text{GST en hígado} + 1/\sqrt{\text{CAT en hígado} + 1/\sqrt{\text{CAT en riñón} + 1/\sqrt{\text{AChE en plasma} + \text{Neu} + \text{Eos} + \text{Bas} + \text{Mon} + 1/\sqrt{\text{Lin} + \text{N.L} + \text{RTT}}}}$$

A partir de la sumatoria de los términos, se obtuvo un intervalo de referencia con un valor mínimo de 41,46 y un valor máximo de 73,89. Para el sitio correspondiente al cinturón florihortícola se obtuvo un valor de 90,66; para la industria petroquímica un valor de 88,88; para las descargas cloacales un valor de 102,29; y para el sitio de referencia un valor de 57,53. Teniendo en cuenta estos resultados podemos determinar que el estado de salud de los individuos provenientes del cinturón florihortícola (CFH1), la industria petroquímica (IP1) y las descargas cloacales (DC1) se encuentra afectado; mientras que el estado de salud de los individuos provenientes del sitio de referencia (SR1) no se encuentra afectado, lo que coincide con los resultados obtenidos a partir de la herramienta presentada.

COMPARACION DE ENFOQUES ANALÍTICOS

Como ya se mencionó, en la presente tesis se abordó el estudio del efecto de las actividades antrópicas sobre diferentes parámetros clínicos mediante la aplicación de una herramienta que involucra dos enfoques estadísticos (univariado y multivariado) para poner a prueba su utilidad en el abordaje de estudios en los que se utilizan un gran número de parámetros y comparar los resultados. En la medicina clínica, el análisis de datos de manera integral es importante al momento de realizar diagnósticos, o determinar si un individuo está enfermo o no, ya que se considera al individuo como un sistema integral y complejo (Triquet y col., 2013). En cuanto a los análisis estadísticos, la comparación entre grupos de los valores de cada parámetro, a través del análisis univariado, se realiza de una variable a la vez, por lo que arroja un resultado para cada variable evaluada lo que arroja resultados y conclusiones independientes para cada parámetro (en el caso de la presente tesis, hasta 49 parámetros), ignorando la información sobre las relaciones entre los parámetros y la cantidad de parámetros que se están comparando, lo que puede llevar a

resultados imprecisos y decisiones sesgadas, basado fundamentalmente en la dificultad de interpretar de manera integral una gran cantidad de información (Benjamini y Hochberg, 1995).

El análisis multivariado analiza de forma conjunta más de un parámetro en función de su distribución conjunta. Este enfoque reúne simultáneamente todos los parámetros en forma de vector de tal manera que todo el vector se considera como una variable aleatoria que sigue una distribución multivariada, aumentando la potencia de la prueba estadística. Nos permite ver los resultados en un gráfico conjunto (a diferencia del análisis univariado que muestra un gráfico por cada parámetro evaluado) (Mengual-Macenne y col., 2015; Mishra y col., 2021).

En la presente tesis, se realizaron ambos análisis de manera simultánea, y en el capítulo 3 se realizó una comparación de la efectividad de cada uno. Como parte de la comparación de los resultados obtenidos, se procedió del siguiente modo: cuando hubo coincidencia en la presencia o en la ausencia de diferencias, se interpretó que dicho parámetro aportó a la separación (o no) entre sitios; mientras que cuando hubo diferencias en la efectividad de ambos análisis, se interpretó de manera diferente teniendo en cuenta las características de cada análisis. La desventaja que presenta utilizar solamente el análisis univariado es que, si bien es un análisis riguroso que nos indica la presencia de diferencias significativas, al evaluar un gran número de parámetros, tal como mencionamos anteriormente resulta difícil sintetizar y procesar la información para interpretarla. El análisis multivariado combina todas las variables, lo que es más representativo, y brinda información integrada y objetiva (considerando que es un procedimiento matemático), y de manera simplificada resume la información a un gráfico bivariado que se puede interpretar fácilmente mostrando en la gran mayoría de los casos, relaciones o escenarios difíciles de imaginar (atributos o propiedades emergentes) o visualizar si consideramos que provienen de un espacio multidimensional y que no podríamos observar si analizamos por partes.

En cuanto a la relevancia biológica, y siendo el escenario 5 (correspondiente a *R. arenarum* del año 2018) un ejemplo concreto, al utilizar un número elevado de variables, la interpretación de los resultados de los análisis univariados de manera aislada puede llevarnos a realizar inferencias erróneas, ya que un parámetro puede mostrar diferencias significativas entre al menos dos sitios al realizar un ANOVA, pero al momento de realizar el análisis multivariado, no mostrar una separación entre los sitios. Es por esto que la utilización de análisis multivariados, los cuales combinan todas las variables,

considerando a los individuos como sistemas integrales, son de gran utilidad para la realización de este tipo de estudios, brindando mayor significancia a los resultados, y logrando interpretaciones con mayor relevancia biológica.

La variable condición del sitio, nos brinda información sobre el porcentaje de individuos con valores afectados para cada uno de los parámetros que existe en cada sitio. Si bien esta información es útil, ya que nos permite conocer cuántos individuos afectados hay en cada sitio, se trata de un conteo realizado a partir de la comparación con los valores de referencia obtenidos en el capítulo 2. La información sobre la presencia de individuos afectados en los sitios se puede interpretar mejor con la estadística multivariada, que, a partir de los datos colectados y su análisis, nos brinda información sobre cómo se distribuyen en el espacio los individuos, permitiendo por ejemplo observar correspondencias entre los individuos afectados y los sitios de origen.

Por lo antes dicho, podemos decir que el presente estudio evidenció las ventajas de la herramienta propuesta, ya que, si se hubiese hecho el análisis solamente desde un enfoque sin tener en cuenta el estudio integral, hubiésemos arribado a conclusiones diferentes. Por lo tanto, la interpretación conjunta de los resultados, a partir de los análisis presentados en la metodología (figura 3.1), resulta de gran utilidad ya que cada elemento de la herramienta presentada brinda información importante (y complementaria) para interpretar los resultados obtenidos, funcionando la herramienta como un todo.

Si bien la lista de biomarcadores para evaluar efectos en individuos puede ser muy extensa, la evaluación integral del estado de salud, utilizando biomarcadores a diferentes niveles, en individuos provenientes de sitios donde se desarrollan actividades antrópicas que generan problemáticas ambientales complejas, resulta una herramienta útil para ser utilizada en estrategias de biomonitoreo y evaluación de la calidad ambiental.

***Leptodactylus luctator* y *Rhinella arenarum* resultaron ser especies adecuadas para realizar este tipo de estudios, y resultaron ser buenas indicadoras de la calidad ambiental.**

REFERENCIAS

Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A., 2004. Pesticides and oxidative stress: A review. *Med. Sci. Monit.* 10:141-147.

Achim Zeileis, David Meyer, and Kurt Hornik (2007). Residual-based Shadings for Visualizing (Conditional) Independence. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 16(3), 507-525.

Adams, SM., Shepard, KL., Greeley Jr, MS., Jimenez, BD., Ryon, MG., Shugart, R., McCarthy, JF., y Hinton, DE. (1989). The Use of Bioindicators for Assessing the Effects of Pollutant Stress on Fish. In: *Marine Environmental Research* (Vol. 28)

Adham, K. (2002) Sublethal effects of aquatic pollution in Lake Maryut on the African sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Journal of Applied Ichthyology*, 18, 87-94

Agostini, MG., Natale, GS., & Ronco, AE. (2010). Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. *Ecotoxicology*, 19(8), 1545–1550. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0539-3>

Agostini, M., Kacoliris, F., Demetrio, P., Natale, G., Bonetto, C. and Ronco, A. (2013) 'Abnormalities in amphibian populations inhabiting agroecosystems in northeastern Buenos Aires Province, Argentina', *Diseases of Aquatic Organisms*, 104(2), pp. 163-171

Aguirre, AA., & Tabor, GM. (2008). Global factors driving emerging infectious diseases: Impact on wildlife populations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149(December), 1–3. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.052>

Alberro N., Bedregal P., Crubellati R., Stegen S. (2011). Manual de protocolos armonizados y evaluados para la toma de muestra y análisis de agua y sedimentos para la región de América Latina y el Caribe. Proyecto ARCAL RLA 010. Auspiciado por Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA). 1ª edición: Patricia Bedregal Salas, Lima, Perú

Alboukadel Kassamba and Fabian Mundt (2020). factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>

Alder, A. y Huber, E. (1923) Unstersucheng über blutcellen bei Amphibien und Reptilien. *Folia Haematol.* 29: 1 - 22.

Allender, M.C. y Fry, M.M. (2008) Amphibian Hematology. *Vet. Clin. Exot. Anim.* 11: 463 - 480.

Al-Murrani, WK., Al-Rawi, IK. & Raof, NM. (2002) Genetic resistance to *Salmonella typhimurium* in two lines of chickens selected as resistant and sensitive on the basis of heterophil/lymphocyte ratio. *British Poultry Science*, 43, 501–507.

Alperin, M, (2013) Introducción al análisis estadístico de datos geológicos. 1ra ed. Universidad Nacional de La Plata, ISBN 978-950-34-1029-5.

Ankley, GT., Brooks, BW., Huggett, DB., & Sumpter, JP. (2007). Repeating history: Pharmaceuticals in the environment. *Environmental Science and Technology*, 41(24), 8211–8217. <http://doi.org/10.1021/es072658j>

APHA (1998) American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edn. Baltimore: American Public Health Association

Arcand-Hoy, LD., y Metcalfe, CD. (1999). Biomarkers of exposure of brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) to contaminants in the lower great lakes, North America. In *Environmental Toxicology and Chemistry*. (Vol. 18, Issue 4)

Arikan, H; Olgun, K; Ilgaz, Ç; Baran, Ý. y Kumlutaş, Y. (2003) Erythrocyte size and number in *Neurergus strauchii* (Urodela: Salamandridae). *Russ. J. Herpetol.* 10: 163 - 166.

Arikan, H. y Çiçek, K. (2010) Morphology of peripheral blood cells from various species of Turkish Herpetofauna. *Acta Herpetologica* 5 (2): 179 - 198.

Arserim, SK. y Mermer, A. (2008) Hematology of the Uludağ frog, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 in Uludağ National Park (Bursa, Turkey). *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi* 25: 39 - 46.

Arvy, L. (1947) Le dimorphisme sexuel sanguin chez *Rana temporaria* L. et *Bufo vulgaris*. *Laur. Compt. Rend. Soc. Biol.* 141: 457 - 459.

ASVCP. (2005). Quality Assurance and Laboratory Standards Committee (QALS) Guidelines for the Determination of Reference Intervals in Veterinary Species and other related topics: SCOPE. Ocean Modelling.

Attademo, AM., Peltzer, PM., Lajmanovich, RC., Cabagna-Zenklusen, MC., Junges, CM., y Basso, A. (2014). Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(1), 635–649. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3404-z>

Bach, NC., Natale, GS., Somoza, GM., & Ronco, AE. (2016). Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole frog, *Leptodactylus latrans*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(23). <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7631-z>

Bai, X., Lutz, A., Carroll, R., Keteles, K., Dahlin, K., Murphy, M., & Nguyen, D. (2018). Occurrence, distribution, and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds. *Chemosphere*, 200, 133–142. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.106>

Ballesteros, ML.; Wunderlin, DA. y Bistoni, MA. (2009) Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 199 - 205.

Banerjee, V. (1983) Morphometry of erythrocytes of *Bufo melanostictus* with relation to season and body weight. *Biol. Bull. India* 5: 28 - 32.

Banerjee, V. (1988) Erythrocyte related blood parameters in *Bufo melanostictus* with reference to sex and body weight. *Environ. Ecol. Kalyani* 6: 802 – 806

Barja de Quiroga, G., Gil, P., y Alonso-Bedate, M. (1985). Catalase enzymatic activity and electrophoretic patterns in adult amphibians - a comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 80B (4), 853–858.

Barni, S.; Boncompagni, E.; Grosso, A.; Bertone, V.; Freitas, I.; Fasola, M.; Fenoglio, C. (2007) Evaluation of *Rana esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquat. Toxicol.* 81: 45 - 54.

Barreto, E., Salgado Costa, C., Demetrio, P., Lascano, C., Venturino, A., y Natale, GS. (2020). Sensitivity of *Boana pulchella* (Anura: Hylidae) Tadpoles to Environmentally Relevant Concentrations of Chlorpyrifos: Effects at the Individual and Biochemical Levels. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(4), 834–841. <https://doi.org/10.1002/etc.4664>

Bartholomus GT (1994) Biological roles of amphibian skin secretions. En: Heatwole H & GT Bartholomus (eds) *Amphibian biology (volume 1): the integument*: 382-410. Surrey Beatty & Sons, Chipping Norton, Australia

Baudhuin, P., Beaufy, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Wattiaux, R., Jacques, P., De Duve, C., 1964. Intracellular distribution of monoamine oxidase, alanine aminotransferase, d-amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue. *Biochem J* 92:179-184.

Beebee, T.J.C., y Griffiths, RA. (2005). The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biological Conservation*, 125(3), 271–285. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.04.009>

Beketov, MA., y Liess, M. (2012). Ecotoxicology and macroecology - Time for integration. *Environmental Pollution*, 162, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.11.011>

Beliaeff, B y Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(6), 1316–1322. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>

Benencia, R., y Quaranta, G. (2003). Reestructuración y contratos de mediería en la región pampeana argentina. *European Review of Latin American and Caribbean Studies. Revista Europea de Estudios Latinoamericanos y Del Caribe*, 0(74), 65. <https://doi.org/10.18352/erlacs.9704>

Benjamini Y, y Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol.*;57: 289–300. 2 Kannel WB

Blaustein AR. y Wake DB. (1990). Declining amphibian populations: A global phenomenon? *Trends in Ecology and Evolution*. 5(7): 203-204.

Blaustein, AR., & Kiesecker, JM. (2002). Complexity in conservation: Lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters*, 5, 597–608. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00352.x>

- Blaustein, AR., Gervasi, SS., Johnson, PTJ. Hoverman, JT., Belden, LK., Bradley, PW., y Xie, GY. (2012). Ecophysiology meets conservation: understanding the role of disease in amphibian population declines. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1596), 1688–1707. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0011>
- Blaustein, AR., Wake, B., & Sousa, WP. (1994). Amphibian Declines: Judging Stability, Persistence, and Susceptibility of Populations to Local and Global Extinctions. *Conservation Biology*, 8(1), 60–71. <https://doi.org/10.1046/j.1523-739.1994.08010060.x>
- Bogan, JE., & Mitchell, MA. (2017). Characterizing tissue enzyme activities of Cuban tree frogs (*Osteopilus septentrionalis*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 27, 22–28. <https://doi.org/10.5818/16-12-100.1>
- Boone, MD., & James, SM. (2005). Aquatic and terrestrial mesocosms in amphibian ecotoxicology. *Applied herpetology* 2: 231-257.
- Boral MC. y Deb C. (1970). Seasonal changes in body fluids and hematology in toad (*Bufo melanostictus*) - a poikilothermic cold torpor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India* 36(6): 369-373.
- Botkin, DB. and Keller, EA. (2010) *Environmental science: Earth as a living planet*. Wiley.
- Bounous, D y Harpur, E. (2018). *Evaluation of Renal Function and Injury*. En: *the clinical chemistry of laboratory animals*. Kurtz, D y Travlos, G. CRC Press Taylor & Francis Group
- Bridges, CM., & Semlitsch, RD. (2005). Xenobiotics. In M. Lannoo (Ed.), *Amphibian Declines, the Conservation Status of United States Species* (Ch. 15, pp. 89–92). Berkeley, CA: University of California Press
- Brito, M. S., De la Cruz Barrón, M., Caretta, CA., Goñi-Urriza, M., Andrade, LH., Cuevas-Rodríguez, G., Malm, O., Torres, JPM., Simon, M., & Guyoneaud, R. (2015). Impact of hydrocarbons, PCBs and heavy metals on bacterial communities in Lerma River, Salamanca, Mexico: Investigation of hydrocarbon degradation potential. *Science of the Total Environment*, 521–522(March), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.098>
- Brodeur, JC., Bahl, MF., Natale, GS., y Poliserpi, MB. (2020). Biomarker and hematological fieldwork with amphibians: is it necessary to sample all night? *Environmental Science and Pollution Research*, 27 (14), 17152–17161. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08313-2>
- Brodeur, JC., Candiotti, JV., Soloneski, S., Larramendy, ML., & Ronco, AE. (2012). Evidence of Reduced Feeding and Oxidative Stress in Common Tree Frogs (*Hypsiboas pulchellus*) from an Agroecosystem Experiencing Severe Drought. *Journal of Herpetology*, 46(1), 72–78. <https://doi.org/10.1670/10-200>
- Brodeur, JC., Damonte, MJ., Vera Candiotti, J., Poliserpi, MB., D’Andrea, MF.; Bahl, MF. (2020). Frog body condition: Basic assumptions, comparison of methods and characterization of natural variability with field data from *Leptodactylus latrans*. *Ecological Indicators*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106098>

- Brodeur, J.C., Suarez, R.P., Natale, G.S., Ronco, A.E., & Elena Zaccagnini, M. (2011). Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(5), 1370–1380. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.024>
- Brodeur, J.C., Vera Candiotti, J., Damonte, M J., Bahl, M.F., Poliserpi, M.B. y D'Andrea, M.F. (2020). Frog somatic indices: Importance of considering allometric scaling, relation with body condition and seasonal variation in the frog *Leptodactylus latrans*. *Ecological Indicators*, 116. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106496>
- Broeg, K., y Lehtonen, K.K. (2006). Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin* 53(8–9), 508–522. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.02.004>
- Brown, D.J., Street, G.M., Nairn, R.W., Forstner, M.R. (2012). "A Place to Call Home: Amphibian Use of Created and Restored Wetlands", *International Journal of Ecology*. <https://doi.org/10.1155/2012/989872>
- Brühl, C.A., Schmidt, T., Pieper, S., & Alscher, A. (2013). Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? *Scientific Reports*, 3, 1–4. <https://doi.org/10.1038/srep01135>
- Bruyette, D. (2020). *Clinical Small Animal Internal Medicine*. John Wiley y Sons, Inc.
- Cabagna M.; Lajmanovich, R.; Attademo, A.; Peltzer, P.; Junges, C.; Fiorenza, G. y Bassó A. (2011) Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Amphibia, Anura) en ambientes del Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. *Rev. Biol. Trop.* 59 (1): 17 - 28.
- Cabagna Zenklusen, M. (2012). Caracterización hematológica de especies de anfibios anuros con distribución en los ecosistemas del litoral fluvial argentino (provincias de Entre Ríos y Santa Fé): potencialidad de su utilización como biomarcadores. Universidad Nacional del Litoral.
- Cabagna, M.; Lajmanovich, R.; Stringhini, G.; Sanchez-Hernandez, J.C.; Peltzer, P. (2005) Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa fe Province, Argentina. *App. Herpetol.* 2 (4): 373 - 380.
- Cabrera Christiansen, F., Sosa, E., Dobal, M., & Bianco, C. (2015). Polos: Injusticias ambientales e industrialización petrolera en Argentina. In *Polos: injusticias ambientales e industrialización petrolera en Argentina*.
- Cairns, J., y Niederlehner, B.R. (1996). Developing a Field of Landscape Ecotoxicology. In: *Source: Ecological Applications* (Vol. 6, Issue 3).
- Calder, P.C. (2007). Immunological Parameters: What Do They Mean? *The Journal of Nutrition* Effects of Probiotics and Prebiotics. <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/137/3/773S/4664745>
- Camargo J., Alonso A., Salamanca A., 2005. "Nitrate Toxicity to Aquatic Animals: A Review with New Data for Freshwater Invertebrates". Madrid. *Chemosphere* 58: 1255 - 1267.

Camilión, MC., Manassero, MJ., Hurtado, M. and Ronco, AE. (2003) 'Copper, lead and zinc distribution in soils and sediments of the south-western coast of the Río de la Plata estuary', *Journal of Soils and Sediments*, 3(3), pp. 213-220.

Campbell, TW. (2015). *Exotic Animal Hematology and Cytology* (Inc. John Wiley y Sons, Ed.; 4th ed

Campuzano Maya, G. (2007). La clínica y el laboratorio Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. En: *Medicina & Laboratorio*, Vol. 13 (11-12).

Cannon, MS., y Cannon, AM. (1979). The blood leukocytes of *Bufo alvarius*: a light, phase-contrast, and histochemical study. *Canadian Journal of Zoology*. 57:314–322.

Carey, C., y Bryant, C. J. (1995). Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. *Environmental Health Perspectives*, 103(SUPPL. 4), 13–17. <https://doi.org/10.2307/3432406>

Carins, Jr, J. (2014). Emergence and Future of Ecotoxicology. In *Fundamentals of Ecotoxicology* (4th ed.). CRC Press Taylor & Francis Group.

Carmena-Suero AS., Siret JP., Callejas J. y Carmena DA. (1980). Blood volume in male *Hyla septentrionalis* (Tree Frog) and *Rana catesbeiana* (Bullfrog). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology* 67: 187-189.

Carpenter, SR., Mooney, HA., Agard, J., Capistrano, D., Defries, RS., Diaz, S., Dietz, T., Duraiappah, AK., Oteng-Yeboah, A., Pereira, HM., Perrings, C., Reid, WV., Sarukhan, J., Scholes, RJ., y Whyte, A. (2009). Science for managing ecosystem services: Beyond the Millennium Ecosystem Assessment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(5), 1305–1312. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808772106>

Carvalho, CS., Utsunomiya, HSM., Pasquoto, T., Lima, R., Costa, MJ., Fernandes, MN., (2016). Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals. *Environ. Pollut.* 221, 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.012>

Caswell, H. (1996). Demography meets ecotoxicology: Untangling the population level effects of toxic substances, in *Ecotoxicology: A Hierarchical Treatment*, Newman, M.C. and C.H. Jagoe, Eds., CRC/Lewis Publishers, Boca Raton, FL,.

Cathers, TG. A. Lewbart, M. Correa, and Stevens, JB. (1997). Serum chemistry and hematology values for anesthetized American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 28:171–174.

Cazenave, J., Wunderlin, DA., Hued, AC., y Bistoni, M D. (2005). Haematological parameters in a neotropical fish, *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Callichthyidae), captured from pristine and polluted water. *Hydrobiologia*, 537(1–3), 25–33. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-1638-z>

Cazenave, J.; Bacchetta, C.; Parma, MJ.; Scarabotti, PA. y Wunderlin, DA. (2009) Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the

water quality of Salado River basin (Santa Fe; Argentina). *Environ. Poll.* 157: 3025 - 3033.

Cei, J. (1980). Amphibians of Argentina. *Italian Journal of Biology*.

Chaves, MF., Tenório, FC., Santos, IL, Neto, CJ, Texeira, VW., Moura, GJ y Texeira, Á. (2017). Correlations of condition factor and gonadosomatic, hepatosomatic and liposomatic relations of *Leptodactylus macrosternum* (ANURA: Leptodactylidae) in the Brazilian semi-arid. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 89(3), 1591–1599. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160221>

Chernyshova, EV y Starostin, VI (1994). The peripheral blood of frogs in the genus *Rana* as a test system for assessing environmental pollution]. *Izv Akad Nauk Ser Biol.* Jul-Aug;(4):656-60. Russian. PMID: 7987204.

Chiesa, ME., Rosenberg, CE., Fink, NE., y Salibián, A. (2006). Serum protein profile and blood cell counts in adult toads *Bufo arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae): Effects of sublethal lead acetate. *Archives of Environmental Contamination and Toxicolog*, 50(3), 384–391. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0252-4>

Cianciarullo, AM.; Naoum, PC.; Bertho, AL.; Kobashi, LS.; Beçak, W. y Soares, MJ. (2000) Aspects of gene regulations in the diploid and tetraploid *Odontophrynus americanus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Genet. Mol. Biol.* 23 (2): 357 - 364.

Clements, WH. (2000). Integrating Effects of Contaminants Across Levels of Biological Organization. In *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*(Vol. 7).

Cohen, AA., Martin, LB., Wingfield, JC., McWilliams, SR., & Dunne, A. (2012). Physiological regulatory networks: Ecological roles and evolutionary constraints. *Trends in Ecology and Evolution*, 27(8), 428–435. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.04.008>

Colman Lerner, JE., Gutierrez, M. de los A., Mellado, D., Giuliani, D., Massolo, L., Sanchez, EY., y Porta, A. (2018). Characterization and cancer risk assessment of VOCs in home and school environments in gran La Plata, Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(10), 10039–10048. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1265-2>

Colombo, JC., Khalil, MF., Arnac, M., Horth, AC. and Catoggio, JA. (1990) 'Distribution of chlorinated pesticides and individual polychlorinated biphenyls in biotic and abiotic compartments of the Rio de La Plata, Argentina', *Environmental science & technology*, 24(4), pp. 498-505.

Connon, RE., Geist, J, y Werner,I. (2012). Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. In *Sensors* (Switzerland). Vol. 12(9), pp12741–12771). <https://doi.org/10.3390/s120912741>

Coppo, J.A. (2003) El medio interno de la “rana toro” (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802). Revisión bibliográfica. *Rev. Vet.* 14 (1): 25 - 41.

Coppo, JA.; Mussart, NB.; Fioranelli, SA. y Zeinstege, PA. (2005) Blood and urine physiological values in captive bullfrog, *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae). *Analecta Vet.* 25: 15 - 17.

Correll DL. (1998). The Role of Phosphorus in the Eutrophication of Receiving Waters: A Review. *Journal of Environmental Quality* 27:261-266.

Costanza R, d'Arge R, de Groot R, Farber S, Grasso M, Hannon B, Limburg K, Naeem S, O'Neill RV, Paruelo J, Raskin RG, Sutton P, van den Belt M (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387:253–260

Crump ML (2010) Amphibian diversity and life history. In: Dodd CK Jr (ed) *Amphibian ecology and conservation. A handbook of techniques*, *Techniques in Ecology and Conservation Series*. Oxford University Press, Oxford, U.K., pp 3–35

Crump, ML. y J. Scoot. (1994). Visual Ecometer Survey. In: Heyer, W.R., M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.C. Hayek, and M.S. Foster (Eds). 1994. *Measuring and Monitoring biological Diversity. Standard methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press. Washington and London.

Daapoian, A.y Castanhoo, MA.. (2015). *Integrative Human Biochemistry A Textbook for Medical Biochemistry*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3058-6>

Dagnino, A., Allen, JI., Moore, MN., Broeg, K., Canesi, L., y Viarengo, A. (2007). Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers*, 12(2), 155–172. <https://doi.org/10.1080/13547500601037171>

Daily, G. (1997). *Nature's Services: Societal dependence on natural ecosystems*. In *Nature's Services: Societal Dependence On Natural Ecosystems*. Island Press, Washinton, D.C.

Damonte, J. (2018). *Biomonitoreo del impacto de plaguicidas usados en cultivos extensivos sobre anuros adultos de la región pampeana*. Tesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Ecología, Genética y Evolución. Universidad Nacional de Buenos Aires. 1–189.

Das M. & Mahapatra PK. (2014). Hematology of Wild Caught Dubois's Tree Frog *Polypedates teraiensis* Dubois, 1986 (Anura: Rhacophoridae). *The Scientific World Journal*, Article ID 491415: 1-7. (<http://dx.doi.org/10.1155/2014/491415>).

David Meyer, Achim Zeileis, and Kurt Hornik (2006). The Strucplot Framework: Visualizing Multi-Way Contingency Tables with vcd. *Journal of Statistical Software*, 17(3), 1-48. URL <https://www.jstatsoft.org/v17/i03/>

Davidson, C. (2004). Declining downwind: Amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecological Applications*, 14(6), 1892–1902. <https://doi.org/10.1890/03-5224>

Davis, AK., & Maerz, JC. (2011). Assessing stress levels of captive-reared amphibians with hematological data: Implications for conservation initiatives. *Journal of Herpetology*, 45(1), 40–44. <https://doi.org/10.1670/10-180.1>

Davis, AK., y Golladay, C. (2019). A survey of leukocyte profiles of red-backed salamanders from Mountain Lake, Virginia, and associations with host parasite types. *Comparative Clinical Pathology*, 28(6), 1743–1750. <https://doi.org/10.1007/s00580-019-03015-9>

Davis, AK. y Durso, AM. (2009) White blood cell differentials of northern cricket frogs (*Acris c. crepitans*) with a compilation of published values from other amphibians. *Herpetologica*, 65(3): 260 - 267.

Davis, AK., Maney DL y Maerz, JC. (2008) The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Fun. Ecol.* 22: 760 - 772.

Denevan, WM. (1992). The pristine myth: the landscape of the Americas in 1492. *Ann. Assn. Am. Geog.*, 82: 369–385.

Dönmez, F.; Tosunoğlu, M. y Gül. Ç. (2009) Hematological values in hermaphrodite, *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758). *North-West J. Zool.* 5: 97 - 103.

Drabkin DL, Austin JH (1935) Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *J Biol Chem* 112:51–65

Dray S, Dufour A (2007). “The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists.” *Journal of Statistical Software*, *22*(4), 1-20. doi:10.18637/jss.v022.i04

Duellman, WE. y Trueb, L. (1994). *Biology of amphibians*.

Egaas, E; Sandvik, M; Fjeld, E.; Kallqvist, T.; Goksøyr, A. y Svensen, A. (1999) Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.* 122C: 337 - 344.

Egea-Serrano, A., Relyea, RA., Tejedo, M., Torralva, M., (2012). Understanding of the impact of chemicals on amphibians: A meta-analytic review. *Ecology and Evolution* 2, 1382-1397

El-Bakary, AS, Abdel-Gawad, AF.; El-Mofty, MM y Attia, SI. (1995) Effect of dimethoate on some haematological parameters of toad *Bufo regularis*. *J. King Saud Univ, Agrc. Sci* 1: 85 - 93.

Ellman GL, Courtney KD, Valentino AJ, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95

Elorriaga, Y., Marino, DJ., Carriquiriborde, P. and Ronco, AE. (2013) 'Screening of pharmaceuticals in surface water bodies of the Pampas region of Argentina', *International Journal of Environment and Health*, 6(4), pp. 330-339.

Fabbri, E. (2015). Pharmaceuticals in the environment: Expected and unexpected effects on aquatic fauna. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1340(1), 20–28. <http://doi.org/10.1111/nyas.12605>

Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2, 1084-1104.

Ferrari, A., Anguiano, L., Lascano, C., Sotomayor, V., Rosenbaum, E. and Venturino, A. (2008) 'Changes in the antioxidant metabolism in the embryonic development of the common South American toad *Bufo arenarum*: Differential responses to pesticide in early embryos and autonomous-feeding larvae', *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 22(4), pp. 259-267.

Foley, JA., DeFries, R., Asner, GP., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, SR., Stuart Chapin, F., Coe, MT., Daily, GC., Gibbs, HK., Helkowski, JH., Holloway, T., Howard, EA., Kucharik, CJ., Monfreda, C., Patz, JA., Colin Prentice, I., Ramankutty, N., y Snyder, PK. (2005). Global Consequences of Land Use. *Science* 309 (5734), 570-574. doi: 10.1126/science.1111772

Fondo de Población de las Naciones Unidas (UNFPA) (2001). Annual Report: 1-34.

Forbes, MR.; McRuer, DL. y Shutler, D. (2006) White blood cell profiles of breeding American toads (*Bufo americanus*) relative to sex and body size. *Comp. Clin. Pathol.* 15: 155 - 159.

Forzán, MJ., Heatley, J., Russell, KE., y Horney, B. (2017). Clinical pathology of amphibians: a review. In *Veterinary Clinical Pathology*(Vol. 46, Issue 1, pp. 11–33). American Society for Veterinary Clinical Pathology. <https://doi.org/10.1111/vcp.12452>

Forzán, MJ., Smith, TG., Vanderstichel, R, Hogan, NS., y Gilroy, C. (2016). Hematologic reference intervals for *Rana sylvatica* (*Lithobates sylvaticus*) and effect of infection with Frog Virus 3 (Ranavirus sp., Iridoviridae). *Veterinary Clinical Pathology*, 45(3), 430–443. <https://doi.org/10.1111/vcp.12393>

Fournier, B., Philpott, DJ. (2005). Recognition of *Staphylococcus Aureus* by the Innate Immune System. *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (3), 521–540. doi: 10.1128/cmr.18.3.521-540.2005

Fulton TW. (1904). The rate of growth of fishes. *Fish Board of Scotland Annual Report* 22, 141–241.

Gagne, Francois. (2014). *Ecotoxicology Principles and Methods*. Academic Press Elsevier.

Gallagher, EP. y Sheehy, KM. (2000). Altered glutathione S-transferase catalytic activities in female brown bullheads from a contaminated central Florida lake. *Marine Environmental Research*, 50, 399-403

Gallardo, JM. (1974). *Anfibios de los alrededores de Buenos Aires*. EUDEBA. 231p.

Gálvez Martínez, FC., Ramirez Benavides, GF, Osorio, JH. (2009). The clinic laboratory in hematology of exotic birds

Geffré A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun JP. (2009). Reference values: a review. *Vet Clin Pathol*;38(3):288-98.

Glomski, CA.; Tamburlin, J. Hard, R. y Chainani M. (1997) The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. IV. The amphibians. *Histol. Histopathol.* 12: 147 - 170.

Goede, RW.y Barton, B.A. (1990). Organismic indices and an autopsy based assessment as indicators of health and condition of fish, in: Adams, S.M., (Ed.), *Biological indicators*

of stress in fish. American Fisheries Society, Symposium 8, Bethesda, Maryland, pp. 93–108.

Gomez-Hoyos, D. y Gonzalez-Maya, J. (2014). Body condition of *Oophaga pumilio* males (Anura: Dendrobatidae) related to habitat elements at La Selva Biological Station, Sarapiquí, Costa Rica. *Rev. Biodivers. Neotrop.* (1), 16–20.

Goniakowska, L. (1970) The respiration of erythrocytes of some amphibians in vitro. *Bull. Acad. Polon. Sci., Sér. Sci. Biol.* 12: 793 - 797.

González, A., Kroll, KJ., Silva-Sanchez, C., Carriquiriborde, P., Fernandino, JI., Denslow, ND., & Somoza, GM. (2020). Steroid hormones and estrogenic activity in the wastewater outfall and receiving waters of the Chascomús chained shallow lakes system (Argentina). *Science of the Total Environment*, 743, 140401. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140401>

Grace IO. & Akinola AA. 2013. Seasonal and sex variation in the blood parameters of the common African toad *Bufo regularis*. *Canadian Journal of Pure and Applied Sciences* 7(3): 2537-2539.

Gräsbeck R, y Saris NE. (1969). Establishment and use of normal values. *Scand J Clin Lab Invest.* 26(Suppl 110):62-63.

Gräsbeck, R. (2004). The evolution of the reference value concept. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42(7), 692–697. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2004.118>

Gross-Sorokin, Roast y Brighty. (2006). Assessment of Feminization of Male Fish in English Rivers by the Environment Agency of England and Wales *Environ Health Perspect* 114(suppl 1):147–151.

Guerra, C., & Aráoz, E. (2016). Amphibian malformations and body condition across an agricultural landscape of northwest Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms*, 121(2), 105–116. <https://doi.org/10.3354/dao03048>

Gül, Ç. y Tok, CV. (2009) Blood cell counts and sizes of some anurans from Turkey. *Russ. J. Herp.* 16: 119 - 125.

Gül, Ç.; Tosunoğlu, M.; Erdoğan, D. y Özdamar, D. (2011) Changes in the blood composition of some anurans. *Acta Herpetologica* 6(2): 137 - 147.

Haddad, N.M., Brudvig, L.A., Clobert, J., Davies, K.F., Gonzalez, A., Holt, R.D., Townshend, J.R., (2015). Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Sci. Adv.* 1, e1500052.

Hadji-Azimi, I.; Coosemans, V.; Canicatti, C. (1987) Atlas of adult *Xenopus laevis* hematology. *Dev. Comp. Immunol.* 11: 807 - 874.

Halling-Sorensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lutzhoft HC, Jorgensen SE. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere* 36: 357-393

- Halliwell, B. y Gutteridge, JMC. (2007) Free Radicals in Biology and Medicine Fourth Ed. Oxford University Press, New York.
- Handy RD, Galloway TS, Depledge MH. (2003). A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology* 12:331-343.
- Haris, J.A. (1972): Seasonal variation in some hematological characteristics of *Rana pipiens*. *Comp. Biochem. Physiol.* 74: 975-989.
- Harrison, T. (2016). Principios de medicina interna (D. Kasper, A. Fauci, S. Hauser, D. Longo, J. Jameson, y J. Loscalzo, Eds.; Vol. 2). McGraw-Hill interamericana editores.
- Hayes, JD., Pulford, DJ., y Tew, K. D. (1995). The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST* and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* Downloaded from Informahealthcare 30(6), 445–600.
- Hazard, ES. y Hutchison, VH. (1978) Ontogenetic changes in erythrocytic organic phosphates in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *J. Exp. Zool.* 206: 109 - 117.
- Hazard, ES. y Hutchison, VH. (1982) Distribución of acid-soluble phosphates in the erythrocytes of selected species of amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.* 73A: 111 - 124.
- Heatley, J., & Russell, K. (2020). Exotic Animal Laboratory Diagnosis. In Exotic Animal Laboratory Diagnosis. Wiley Blackwell.
- Heatley, JJ. y Johnson, M. (2009) Clinical Technique: Amphibian Hematology: A Practitioner's Guide. *J. Exotic. Pet. Med.* 18 (1): 14 - 19.
- Heatwole H y GT Barthalamus (1994). Amphibian biology (volume 1): the integument. Surrey Beatty & Sons, Chipping Norton, Australia. 418 pp.
- Heyer, R., Donnelly, MA., Foster, M. and McDiarmid, R. (2004) Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians. Smithsonian Institution.
- Hill, MK. (2010) Understanding environmental pollution. Cambridge University Press.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., y Kratz, KL. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 225(1–2), 109–118. [http://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00337-4](http://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00337-4)
- Horn PS, Pesce AJ. (2005). Reference intervals: a user's guide, AACC Press, Washington DC.
- Horowitz GL, Altaie S, Boyd J, Ceriotti F, Gard U, Horn P, Pesce A, Sine H, Zakowski J. (2008). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guidelines, 3rd ed, CLSI document C28-A3, Vol. 28, No. 3.
- Hota, J., Das, M., & Mahapatra, PK. (2013). Blood cell profile of the developing tadpoles and adults of the ornate frog, *Microhyla ornata* (Anura: Microhylidae). *International Journal of Zoology*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/716183>

Houck LD & DM Sever (1994) Role of the skin in reproduction and behaviour. En: Heatwole H & GT Barthalmus (eds) Amphibian biology (volume 1): the integument: 351-381. Surrey Beatty & Sons, Chipping Norton, Australia.

Houlahan, JE., Findlay, CS., Schmidt, BR., Meyer, AH., Kuzmin, SL., (2000). Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404, 752-755.

Htun-Han, M. (1978). The reproductive biology of the dab *Limanda limanda* (L.) in the North Sea: gonosomatic index, hepatosomatic index and condition factor. In *Fish Biol* (Vol. 13).

Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle PM, Bergman HL (2018) Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. CRC Press, Boca Raton

Hunt, L, Bonetto, C, Resh, VH., Buss, DF., Fanelli, S., Marrochi, N., y Lydy, MJ. (2016). Insecticide concentrations in stream sediments of soy production regions of South America. *Science of the Total Environment*, 547, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.140>

Hurtado, MA., Giménez, JE. and Cabral, MG. (2006) 'Análisis ambiental del partido de La Plata: Aportes al ordenamiento territorial', Buenos Aires: Consejo Federal de Inversiones.

Hyne RV, Maher WA. (2003). Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54:366-374.

Ilizaliturri-Hernández, CA., González-Mille, DJ., Mejía-Saavedra, J., Espinosa-Reyes, G., Torres-Dosal, A., y Pérez-Maldonado, I. (2013). Blood lead levels, δ -ALAD inhibition, and hemoglobin content in blood of giant toad (*Rhinella marina*) to asses lead exposure in three areas surrounding an industrial complex in Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(2), 1685–1698. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2660-7>

IPCC. Climate Change and Land: An IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. (2019). Shukla, PR., Skea, J., Buendia, EC., Masson-Delmotte, V., Pörtner, HO.

IUCN The Red List of Threatened Species (2020). Version 2020-1. <http://www.iucnredlist.org/>

Janowitz, HD., Dreiling, DA., York, N. (1959). The Plasma Amilase: Source, Regulation and Diagnostic Significance. *American Journal of Medicine*

Jari Oksanen, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGlinn, Peter R. Minchin, RB. O'Hara, Gavin L. Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs and Helene Wagner (2019). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-6. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Javed, M, Ahmad, I, Ahmad, A, Usmani, N, y Ahmad, M. (2016). Studies on the alterations in haematological indices, micronuclei induction and pathological marker enzyme activities in *Channa punctatus* (spotted snakehead) perciformes, channidae exposed to thermal power plant effluent. SpringerPlus, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2478-9>

Jayawardena, UA., Angunawela, P., Wickramasinghe, DD., Ratnasooriya, WD., y Udagama, PV. (2017). Heavy metal-induced toxicity in the Indian green frog: Biochemical and histopathological alterations. Environmental Toxicology and Chemistry, 36(10), 2855–2867. <https://doi.org/10.1002/etc.3848>

Kamrath, C, Wudy, SA., & Krone, N. (2014). Steroid biochemistry. Understanding Differences and Disorders of Sex Development (DSD), 27, 41–52. <http://doi.org/10.1159/000363612>

Kaneko, JJ; Harvey, JW and Bruss, ML. (1997). Clinical biochemistry of domestic animals. 5th ed. Academic Press.

Kaplan, HM. (1951) A study of frog blood in red disease. Trans. State Acad. Sci. 44: 209 - 215.

Kawecki, T.J., y Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. In Ecology Letters (Vol. 7, Issue 12, pp. 1225–1241). <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x>

Klion AD, Nutman TB (2004) The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. J Allergy Clin Immunol 113:30–37

Kogut MH, McGruder ED, Hargis BM, Corrier DE, DeLoach JR (1994) Dynamics of avian inflammatory response to Salmonella-immune lymphokines. Changes in avian blood leukocyte populations. Inflammation 18:373–388

Kokkali, V, y van Delft, W. (2014). Overview of commercially available bioassays for assessing chemical toxicity in aqueous samples. In: Trends in Analytical Chemistry Vol. 61, pp. 133–155). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.001>

Kolpin, DW., Furlong, ET., Meyer, MT., Thurman, EM., Zaugg, SD., Barber, LB., y Buxton, HT. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. Environmental Science and Technology, 36(6), 1202–1211. <http://doi.org/10.1021/es011055j>

Kuramoto, M. (1981) Relationships between number, size and shape of red blood cells in amphibians. Comp. Biochem. Physiol. 69(4): 771 - 775.

Kwet, A., Steffen, R., Silvano, D, Úbeda, C, Baldo, D, y Di Tada, I. (2004). *Rhinella arenarum*. In The IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/54576/0>

Lajmanovich, RC., Sanchez-Hernandez, JC., Peltzer, PM., Attademo, AM., Fiorenza, GS., Cabagna, MC y Basso, A. (2008). Levels of plasma B-esterases and glutathione-S-transferase activities in three South American toad species. Toxicological and

Lajmanovich, RC., Cabagna, M., Peltzer, PM., Stringhini, GA., Attademo, AM., (2005). Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research* 587, 67-72.

Lalonde-Robert, V., Beaudry, F., y Vachon, P. (2012). Pharmacologic Parameters of MS222 and Physiologic Changes in Frogs (*Xenopus laevis*) After Immersion at Anesthetic Doses. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 51(4), 464–468.

Lannoo, M. (2008) Malformed frogs: the collapse of aquatic ecosystems. University of California Press.

Lascano, CI., Ferrari, A. y Venturino, A. (2011) 'Sublethal concentrations of azinphosmethyl induce biochemical and morphological alterations in *Rhinella arenarum* embryos', *Chemistry and Ecology*, 27(6), pp. 557-568.

Lasier, PJ., Urich, ML., Hassan, SM., Jacobs, WN., Bringolf, RB. and Owens, KM. (2016) 'Changing agricultural practices: potential consequences to aquatic organisms', *Environmental Monitoring and Assessment*, 188, pp. 672.

Lassen, ED. y Weiser, G. (2004). Laboratory technology for Veterinary Medicine. pp. 3-37. En: Thrall, M. A., D. C. Backer, T. W. Campbell, D. DeNicola, M. J. Fettman, E. D. Lassen, A. Rebar & G. Weiser (ed.) *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia

Lavilla, EO. & Rouges, M. (1992). Reproducción y desarrollo de anuros argentinos. *Asociación Herpetológica Argentina Serie de Divulgación* 5, 66.

Leonard P. (2002). The role of biological research in supporting policy needs. *Marine Environmental Research* 54:209-213.

Li, X., y Huang, C. (2007). Environment impact of heavy metals on urban soil in the vicinity of industrial area of Baoji city, P.R. China. *Environmental Geology*, 52(8), 1631–1637. <https://doi.org/10.1007/s00254-006-0608-3>

Liendro, N., Ferrari, A., Mardirosian, M., Lascano, C. I., y Venturino, A. (2015). Toxicity of the insecticide chlorpyrifos to the South American toad *Rhinella arenarum* at larval developmental stage. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(2), 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.12.022>

Linder, G., and B. Grillitsch. (2000). Ecotoxicology of metals. Pp 325–459 in D. W. Sparling, G. Linder, and C. A. Bishop, eds. *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, FL.

Lindström, K., Hawley, D., Davis, AK. & Wikelski, M. (2005) Stress responses and disease in three wintering house finch (*Carpodacus mexicanus*) populations along a latitudinal gradient. *General and Comparative Endocrinology*, 143, 231–239.

- Lionetto MG, Caricato R, Calisi A, Giordano ME, Schettino T. (2013). Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *Biomed Res Int.* doi: 10.1155/2013/321213
- Lloyber, I.; Schinitman, NI. y Londero, HF. (1967) Efectos de la anestesia etérea y de la destrucción medular sobre constantes hemocirculatorias del *Bufo arenarum* Hensel. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 43: 278 - 285.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–75
- Mac Loughlin, TM., Peluso, L. and Marino, DJG. (2017) 'Pesticide impact study in the peri-urban horticultural area of Gran La Plata, Argentina', *Science of the Total Environment*, 598, pp. 572-580.
- Madigan M., Martinko J., Parker J., (2004). "Brock: Biología de los Microorganismos", 10a edición, Pearson-Prentice Hall. Madrid, 19: 624-686.
- Magalhães, F. D. M., Lyra, M. L., De Carvalho, T. R., Baldo, D., Brusquetti, F., Burella, P., y Garda, A. A. (2020). Taxonomic Review of South American Butter Frogs: Phylogeny, Geographic Patterns, and Species Delimitation in the *Leptodactylus latrans* Species Group (Anura: Leptodactylidae). *Herpetological Monographs*, 34(1), 131-177.
- Mahapatra, BB.; Das, M.; Dutta, SK. y Mahapatra, PK. (2010) Hematology of Indian rhacophorid tree frog *Polypedates maculatus* Gray, 1833 (Anura: Rhacophoridae). *Comp. Clin. Pathol.* DOI 10.1007/s00580-010-1118-y
- Manahan, S. (2007). *Introduction to Environmental Chemistry*. Reverte Editorial Sa.
- Manassero, MJ., Da Silva, MM., Boff, D. and Hurtado, MA. (2013) 'Metales pesados en suelos de la planicie costera del río de la plata, partidos de Ensenada y Berisso'.
- Maniero, GD., and C. Carey. (1997). Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold. *Journal of Comparative Physiology B* 167:256–263.
- Mardirosian, MN., Lascano, CI., Bongiovanni, GA., y Venturino, A. (2017). Chronic toxicity of arsenic during *Rhinella arenarum* embryonic and larval development: Potential biomarkers of oxidative stress and antioxidant response. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36(6), 1614–1621. <https://doi.org/10.1002/etc.3693>
- Mardirosian, MN., Lascano, CI., Ferrari, A., Bongiovanni, GA., y Venturino, A. (2015). Acute toxicity of arsenic and oxidative stress responses in the embryonic development of the common South American toad *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 34(5), 1009–1014. <https://doi.org/10.1002/etc.2856>
- Mariñelarena Alejandro. (2006). *Manual de Autoconstrucción de Sistemas de tratamiento de aguas residuales domiciliarias*. (FREPLATA, Ed.). LA PLATA.
- Markert, BA., Breure, AM., Zechmeister H.G. (2003). *Bioindicators y Biomonitoring: Principles, Concepts and Applications* Amsterdam: Elsevier.
- Markich S., Brown P., Batley G., Apte S., Stauber J. (2001). Incorporating metal speciation and bioavailability into water quality guidelines for protecting aquatic ecosystems. *Australasian Journal of Ecotoxicology* 7:109-122.

- Marques, M., Antunes, SC., Pissarra, H., Pereira, ML., Gonçalves, F., y Pereira, R. (2009). Histopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in Iberian green frogs (*Rana perezi* Seoane) from a uranium mine pond. *Aquatic Toxicology*, 91(2), 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.04.010>
- Martin, LB., Liebl, AL; Trotter, JH; Richards, CL; McCoy, K y McCoy, MM. (2011). Integrator networks: illuminating the black box linking genotype and phenotype. *Integr. Comp. Biol.* 51:514–527.
- Martín-Díaz, M., Tuberty, S., McKenney Jr, C., Sales, D., y del Valls, T. (2005). Effects of cadmium and zinc on *Procambarus clarkii*: Simulation of the Aznalcóllar mining spill. *Ciencias Marinas*, 31(1B), 197–202. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48003106>
- Martínez, FJ.; Mendiola, P. y de Costa, J. (1985) Parámetros hematológicos de *Rana perezi* (Amphibia: Salientia). *An. Biol.* 5: 73 - 78.
- Matson, PA, Parton, WJ., Power, AG., y Swift, M.J. (1997). Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5325), 504–509. <https://doi.org/10.1126/science.277.5325.504>
- McCuskey, R. (2006). Anatomy of the liver. In *Hepatology: A Textbook of Liver Disease* No. 1. Eds. T.D. Boyern and M.P. Manns. Philadelphia, PA: Elsevier.
- McDiarmid, R., y Altig, R. (2000). *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. University Of Chicago Press.
- McKinney, M.L., (2002). Urbanization, biodiversity, and conservation: the impacts of urbanization on native species are poorly studied but educating a highly urbanized human population about these impacts can greatly improve species conservation in all ecosystems. *Bioscience* 52, 883e890.
- Medina, MF., González, ME., Klyver, SMR., y Aybar Odstreil, IM. (2016). Histopathological and biochemical changes in the liver, kidney, and blood of amphibians intoxicated with cadmium. *Turkish Journal of Biology*, 40(1), 229–238. <https://doi.org/10.3906/biy-1505-72>
- Mengual-Macénlle, N., Marcos, PJ., Golpe, R., y González-Rivas, D. (2015). Multivariate analysis in thoracic research. *Journal of Thoracic Disease*, 7(3), E2–E6. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.01.43>
- Meteyer, CU. (1997) 'Diagnostic Findings Associated with Malformed Frogs from Vermont Summer 1997', USGS Biol. Resources Div. Investigation of Deformities in the Northern Leopard Frog.
- Millennium Ecosystem Assessment. (2005). Capital natural y bienestar humano. 1–28.
- Milot, EAA. Cohen, F. Vezina, DM. Buehler, KD. Matson, and T. Piersma. (2014). A novel integrative method for measuring body condition in ecological studies based on physiological dysregulation. *Methods Ecol. Evol.* 5:146–155.

Ministerio de Infraestructura y Servicios Públicos. (2004). Informe. Proyecto: Reacondicionamiento del Sistema de Recolección y Conducción de Berisso - Ampliación del Sistema Cloacal del B° Villa Progreso.

Mishra, A., Harichandrakumar, KT., Satheesh, S., y Nair, NS. (2021). Multivariate approach in analyzing medical data with correlated multiple outcomes: An exploration using ACCORD trial data. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 11. <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2021.100785>

Mishra, V. y Banerjee, V. (1983) Haematology of *Rana tigrina* erythrocytes and related parameters with relation to body weight. *Ann. Zool.* 20: 25 -32.

Molina, N., Pezzani, B., Ciarmela, M., Orden, A., Rosa, D., Apezteguía, M., Minvielle, M. (2011). Intestinal parasites and genotypes of *Giardia intestinalis* in school children from Berisso, Argentina. *Journal of Infection in Developing Countries*, 5(7), 527–534. <http://doi.org/10.3855/jidc.1660>

Moore MN, Viarengo A. (1987). Lysosomal membrane fragility and catabolism of cytosolic proteins: evidence for a direct relationship. *Experientia* 43:320-323.

Moore, MN., Icarus Allen, J, y McVeigh, A. (2006). Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Marine Environmental Research*, 61(3), 278–304. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2005.10.005>

Moore, MN., Kohler, A., Lowe, DM., y Simpson, MG. (1994). An integrated approach to cellular biomarkers in fish. In MC. Fossi & C. Leonzio (Eds.), *Non-destructive biomarkers in vertebrates* (pp. 171–197). Boca Raton: Lewis/CRC.

Moore, MN; Viarengo, PJ; Somerfield, PJ and Sforzini, S. (2013). Linking Lysosomal Biomarkers and Ecotoxicological Effects at Higher Biological Levels, pp107-130. In Triquet, C., Amiard, J.-C. y S.Raibow, P. *Ecological biomarkers: Indicators of ecotoxicological effects*. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952.

Narayan, E. y Hero, JM. (2011) Urinary corticosterone responses and haematological stress indicators in the endangered Fijian ground frog (*Platymantis vitiana*) during transportation and captivity. *Aust. J. Zool.* 59: 79 - 85.

Natale, GS. (2006) *Análisis ecotoxicológico de una comunidad de anuros de la Región Pampeana*. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.

Natt MP, Herrick CA (1952) A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poult Sci* 31:735–738

Newman, MC. (2013). *Quantitative ecotoxicology*. 2° ed., Taylor and Francis Group.

Newman, MC. y Unger, MA (2003). *Fundamentals of ecotoxicology*. Lewis Press, Boca Raton.

Newman, MC. y Clements, WH. (2008). *Ecotoxicology: a comprehensive treatment*. Taylor and Francis Group.

Newman, MC. y Jagoe, CH. (1994): Inorganic toxicants-ligands and the bioavailability of metals in aquatic environments. In Bioavailability-Physical, Chemical, and Biological Interactions, SETAC Spec. Pub. Series, J.L. Hameling, P.F. Landrum, H.L. Bergman & W.H. Benson, eds. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 39-61.

Odum, EP y Barret, GW. (2006). Fundamentos de ecología. 5ed. Thomson editores.

Olawoyin, R, Heidrich, B, Oyewole, S, Okareh, OT. y McGlothlin, CW. (2014) 'Chemometric analysis of ecological toxicants in petrochemical and industrial environments', Chemosphere, 112, pp. 114-119.

Omonona, AO. y Ekpenko V. (2011) Haematology and prevalence of blood parasites of the common frog (*Rana temporaria*) in the tropical environment. J. Vet. Med. Anim. Health 3(2): 14 – 20.

Orozco, BC. (2003). Contaminación ambiental: Una visión desde la Química. Madrid: Thomson-Paraninfo.

Ostojic, H; Monge-CC. y Cifuentes, V. (2000) Hemoglobin affinity for oxygen in three subspecies of toads (*Bufo sp.*) living at different altitudes. Biol. Res. 33 (1): 5 - 10.

Pai, RM. y Shangbay, SV. (1988) On erythrocytes of certain Indian amphibians. Comp. Physiol. Ecol. 13: 103 - 110.

Palermo, P., Chaparro, MA., Jurado, S., Bidegain, JC. and Sinito, AM. (2011). Estudio magnético y de contaminación en sedimentos de canales de La Plata'.

Peig, J. y Green, AJ., (2009). New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. Oikos 118, 1883-1891.

Peltzer, PM., Lajmanovich, C., Attademo, AM., Junges, CM., Teglia, CM., Martinuzzi, C., Curi, L., Culzoni, MJ., y Goicoechea, HC. (2017). Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. Environmental Toxicology and Pharmacology, 51, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.01.021>

Peltzer, M., Lajmanovich, RC., Sánchez-Hernandez, JC., Cabagna, MC., Attademo, AM., & Bassó, A. (2008). Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. Ecotoxicology and Environmental Safety, 70(1), 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.06.005>

Peluso, J., Aronzon, CM., Acquaroni, M., & Pérez Coll, C. S. (2020). Biomarkers of genotoxicity and health status of *Rhinella fernandezae* populations from the lower Paraná River Basin, Argentina. Ecological Indicators, 117. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106588>

Peluso, L., Giusto, A., Rossini, GDB., Ferrari, L., Salibián, A. and Ronco, AE. (2011) 'Hyalella curvispina (Amphipoda) as a test organism in laboratory toxicity testing of environmental samples', Fresenius Environmental Bulletin, 20(2), pp. 372-376.

Pereira, JJ., Mercaldo-Allen, R., Kuropat, C., Luedke, D., y Sennefelder, G. (1993). Environmental Contamination and Toxicology Effect of Cadmium Accumulation on Serum Vitellogenin Levels and Hepatosomatic and Gonadosomatic Indices of Winter Flounder (*Pleuronectes americanus*). In Arch. Environ. Contam. Toxicol(Vol. 24).

Pesce, SF., Cazenave, J., Monferrán, MV, Frede, S. y Wunderlin, DA. (2008). Integrated survey on toxic effects of lindane on neotropical fish: *Corydoras paleatus* and *Jenynsia multidentata*. *Environmental Pollution*, 156(3), 775–783. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.06.016>

Pessier, A., y Pinkerton, M. (2003). Practical Gross Necropsy of Amphibians. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 12(2), 81–88.

Ponsen, S.; Narkkong, N.; Pamok, S.; Sappaso, K. y Aengwanich Ponsen, W. (2008) Hematological values and morphological observation of blood cells in balloon frog, *Glyphoglossus molossus*. *J. Microsc. Soc. Thailand* 22: 71 - 75.

Poole T. (1997) Happy animals make good science. *Lab Anim*; 31(2):116-24.

Porter, CM., y Janz, DM. (2003). Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. In *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Vol. 54)

Postel, SL., Daily, GC, Ehrlich, PR. (1996). “Human appropriation of renewable freshwater.” *Science* 271: 785–788.

Pyne, SJ. (1995). *World fire: the culture of fire on earth*. New York: Henry Holt and Company.

Quiroga LB. y E.A. Sanabria. 2012. Variation in reproductive parameters of *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura: Bufonidae) between the reproductive and post-reproductive periods. *Belg. J. Zool.*, 142 (1): 68-73.

R Core Team (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.

Rand , GM. , ed . (1995). *Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate, and risk assessment* . 2nd ed. Taylor & Francis, Washington , DC

Reigart, JR., Roberts, JR., Morgan, DP., 1999. *Recognition and Management of Pesticide Poisoning*. 5th Edn., EPA., Washington, 34-38 pp.

Rocha, CA. (2011) The micronucleus test in erythrocytes of amphibian larvae as tool for xenobiotic exposure risk assessment: A brief review and an example using *Lithobates catesbeianus* exposed to copper sulphate. *Middle-East J. Sci. Res.* 8(1): 23 - 29.

Romanova, EB., Romanova, O. Yu., (2003). Peculiarities of leukocytic formula of peripheral blood of green frogs under conditions of anthropogenetic load. *J. Environ. Physiol.* 39 (4), 480–484.

Ronco, A., Camilión, C. and Manassero, M. (2001) 'Geochemistry of heavy metals in bottom sediments from streams of the western coast of the Río de la Plata estuary, Argentina', *Environmental Geochemistry and Health*, 23(2), pp. 89-103.

- Ronco, A., Peluso, L., Jurado, M., Rossini, GB. and Salibian, A. (2008) 'Screening of sediment pollution in tributaries from the southwestern coast of the Río de la Plata estuary', *Latin American journal of sedimentology and basin analysis*, 15(1), pp. 67-75.
- Rosenberg, CE., Fink, NE., Arrieta, MA. y Salibián A. (2003) Effect of lead acetate on the in vitro engulfment and killing capability of the toad (*Bufo arenarum*) neutrophils. *Comp. Biochem. Physiol.* 136C: 225 - 233.
- Rouf, MA. (1969) Hematology of the leopard frog, *Rana pipiens*. *Copeia* 4: 682 – 687.
- Ruiz de Arcaute, C., Pérez-Iglesias, JM., Nikoloff, N., Natale, GS., Soloneski, S., Larramendy, ML., (2014). Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecological Indicators* 45, 632-639.
- Ruiz, G.; Rosenmann, M. y Veloso, A. (1983). Respiratory and hematological adaptations to high altitude in *Telmatobius* frogs from the Chilean Andes. *Comp. Biochem. Physiol.* 7614: 109 - 113.
- Russell V. Lenth (2021). emmeans: Estimated Marginal Means, aka. Least-Squares Means. R package version 1.6.1. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- Salinas, Z., Salas, N, Baraquet; M, y Martino, AL. (2015). Hematologic biomarkers of the common toad *Bufo arenarum* in altered ecosystem of Córdoba provincecordoba. *Acta Toxicol. Argent.*, 23(1), 25–35.
- Samantaray, K. (1985). Studies on hematology of Indian skipper frog, *Rana cyanophlyctis* Schneider. *Comp. Physiol. Ecol.* 10: 71 - 74.
- Sanabria, EA., Quiroga, LB. & Acosta, JC. (2005). Dieta de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Anura: Leptodactylidae) en un humedal del oeste de Argentina. *Revista Peruana de Biología* 12, 473-477.
- Sandhu, H. (2017). Ecosystem Functions and Management. In *Ecosystem Functions and Management*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-53967-6>
- Sansiñena, JA., Peluso, L., Costa, CS., Demetrio, PM., Mac Loughlin, TM., Marino, DJ., Alcalde, L. and Natale, GS. (2018) 'Evaluation of the toxicity of the sediments from an agroecosystem to two native species, *Hyalella curvispina* (CRUSTACEA: AMPHIPODA) and *Boana pulchella* (AMPHIBIA: ANURA), as potential environmental indicators', *Ecological indicators*, 93, pp. 100-110.
- Santucci, L., Carol, E., Borzi, G. and García, MG. (2017) 'Hydrogeochemical and isotopic signature of surface and groundwater in a highly industrialized sector of the Rio de la Plata coastal plain (Argentina)', *Marine pollution bulletin*, 120(1-2), pp. 387-395.
- [Sarandón, Colombo y colaboradores UNLP. \(2015\). Relevamiento de la utilización de agroquímicos en la Provincia de Buenos Aires. Mapa de situación e incidencia sobre la salud. Defensor del Pueblo, Buenos Aires, Argentina, 533.](#)
- Schulte-Hostedde, AI., Zinner, B., Millar, JS., y Hickling, GJ. (2005). Restitution of mass-size residuals: validating body condition indices. In *Ecology* (Vol. 86, Issue 1).
- Sebastien Le, Julie Josse, Francois Husson (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1-18.10.18637/jss.v025.i01

Selye, H. (1956). *The stress of life*. New York: McGraw-Hill.

Shugart, LR., McCarthy, JF., & Halbrook, RS. (1992). Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Analysis: An Official Publication of the Society for Risk Analysis*, 12(3), 353–360. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.1992.tb00687.x>

Shutler, D. y Marcogliese, DJ. (2011) Leukocyte profiles of northern leopard frogs, *Lithobates pipiens*, exposed to pesticides and hematozoa in agricultural wetlands. *Copeia* 301 - 307.

Shutler, D., Smith, TG and Robinson, SR. (2009). Relationships between leukocytes and hepatozon spp. In green frogs, *Rana clamitans*. *Journal of Wildlife Diseases* 45:67–72.

Sinha, RC. (1983) Haematological studies on the prewintering and wintering frog, *Rana esculenta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 74(2): 311 - 314.

Solberg HE, Gräsbeck R. 1989. Reference values. *Adv Clin Chem.*;27:1-79.

Song WC, Sarrias MR, Lambris JD. (2000). Complement and innate immunity. *Immunopharmacol.* 49: 187-198.

Souza Casadinho J. (2009). La problemática del uso de plaguicidas en Argentina. Modelos productivos e impacto en el ambiente. Cátedra de Extensión y Sociología Rurales. Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Sparling, DW., Linder, G., Bishop, CA., Krest, SK., (2010). *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. SETAC Books, Boca Raton, FL.

Stebbins, RC., y Cohen, NW. (1995). *A Natural History of Amphibians*.

Steffen, W., Sanderson, A., Tyson, P., Jager, J., Matson, P., Moore, B., Oldfield, F., Richardson, K., Schellnhuber, B., y Wasson, R. (2005). *Global change and the Earth system - A planet under pressure*. Springer.

Stevenson, RD., & Woods, WA. (2006). Condition indices for conservation: New uses for evolving tools. *Integrative and Comparative Biology*, 46(6), 1169–1190. <https://doi.org/10.1093/icb/icl052>

Stolyar, OB., Loumbourdis, NS., Falfushinska, HI., y Romanchuk, LD. (2008). Comparison of metal bioavailability in frogs from urban and rural sites of Western Ukraine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(1), 107–113. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9012-6>

Stuart, SN. (2004). Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*, 306(5702), 1783–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>

Suárez, RP., Zaccagnini, ME., Babbitt, KJ., Calamari, NC., Natale, GS., Cerezo, A., Codugnello, N., Boca, T., Damonte, MJ., Vera-Candioti, J., (2016). Anuran responses to spatial patterns of agricultural landscapes in Argentina. *Landscape Ecology* 31, 2485-2505.

Taghavi Jelodar, H., y Fazli, H. (2012). Monthly Changes in Condition, Hepatosomatic Index and Bioavailability in Frogs (*Rana ridibunda*). Research Journal of Biology, 02, 9–14. www.scientific-journals.co.uk

Taiyun Wei y Viliam Simko (2017). R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84). Available from <https://github.com/taiyun/corrplot>

Thain, JE., Vethaak, AD., and Hylland, K. 2008. Contaminants in marine ecosystems: developing an integrated indicator framework using biological-effect techniques. – ICES Journal of Marine Science, 65: 1508–1514

Thammachoti, P, Khonsue, W, Kitana, J, Varanusupakul, P, y Kitana, N. (2012). Morphometric and Gravimetric Parameters of the Rice Frog *Fejervarya limnocharis* Living in Areas with Different Agricultural Activity. Journal of Environmental Protection (10), 1403–1408. <https://doi.org/10.4236/jep.2012.310159>

Thioulouse J, Dray S, Dufour A, Siberchicot A, Jombart T, Pavoine S (2018). Multivariate Analysis of Ecological Data with ade4. Springer. doi: 10.1007/978-1-4939-8850-1 (URL: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8850-1>).

Thrall, MA., Weiser, G., Allison, RW., & Campbell, W. (2012). Veterinary Hematology and Clinical Chemistry (2nd ed.). John Wiley & Sons, Inc.

Toledo, RC., & Jared, C. (1993). Cutaneous Adaptations to Water Amphibians Balance. Comp. Biochem. Pysiol., 105A (4), 593–608.

Torremorell, A., Bustigorry, J., Escaray, R., Zagarese, H.E., 2007. Seasonal dynamics of a large, shallow lake, Laguna Chascomús: the role of light limitation and other physical variables. Limnologica 37, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2006.09.002>

Truhaut, R., (1977). Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. Ecotoxicol. Environ. Saf., 1, 151–173

Turner, BL., Kasperson, RE., Meyer, WB., Dow, KM., Golding, D., Kasperson, JX., Mitchell, RC. y Ratick, SJ. (1990). Two types of global environmental change. Definitional and spatial-scale issues in their human dimensions. Global Environmental Change, 1(1), 14–22. [https://doi.org/10.1016/0959-3780\(90\)90004-S](https://doi.org/10.1016/0959-3780(90)90004-S)

UN-Water. (2016). Towards a Worldwide Assessment of Freshwater Quality: a UN-Water Analytical Brief. UN-Water Analytical Brief, 1–36.

Valbona, A., Adiola, B., Eldores, S., & Alketa, G. (2009). Effects of pollution on amphibian (Ranidae: *Rana balcanica* & *Rana lessonae*) from the Albania's coastal zone. 1–7.

Valdés, ME., Marino, DJ., Wunderlin, DA., Somoza, GM., Ronco, AE. and Carriquiriborde, P. (2015) 'Screening concentration of E1, E2 and EE2 in sewage effluents and surface waters of the “Pampas” region and the “Rio de la Plata” estuary (Argentina)', Bulletin of environmental contamination and toxicology, 94(1), pp. 29-33.

van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, NPE. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13,57–149.

Varela, ME y Sellares, ME. (1938) Nuevas observaciones sobre las variaciones estacionales del cuadro hemático en el *Bufo arenarum* Hensel. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 14: 229 - 235.

Velazco, Evangelina; López, Isabel y Bono, N. (2006). Evaluación de riesgo ambiental. El caso de las Actividades Industriales y Portuarias en el Partido de Ensenada. VI Biental Del Coloquio de Transformaciones Territoriales, 1–18.

Venturino, A., Rosenbaum, E., Caballero De Castro, A., Anguiano, O. L., Gauna, L., Fonovich De Schroeder, T., y Pechen De D'Angelo, A. M. (2003). Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers*, 8(3–4), 167–186. <https://doi.org/10.1080/1354700031000120116>

Vera Candiotti, J., Natale, GS., Soloneski, S., Ronco, AE., Larramendy, ML., (2010). Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®. *Chemosphere* 78, 249-255.

Vitousek, P. M., Mooney, H. A., Lubchenco, J., & Melillo, J. M. (1997). Human domination of Earth's ecosystems. *Science*, 277(5325), 494–499. <https://doi.org/10.1126/science.277.5325.494>

Wake, D. B., & Vredenburg, V. T. (2009). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *In the Light of Evolution*, 2, 27–44. <https://doi.org/10.17226/12501>

Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., y Peakall, D. B. (2012). *Principles of ecotoxicology*. CRC Press Taylor y Francis Group. Boca Raton, FL

Walker, D y Tomlinson, L (2018). *Lipids*. En: *the clinical chemistry of laboratory animals*. Kurtz, D y Travlos, G. CRC Press Taylor & Francis Group.

Walton, R. M. (2001). Establishing reference intervals: Health as a relative concept. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 10(2), 66–71. [https://doi.org/10.1053/s1055-937x\(01\)80026-8](https://doi.org/10.1053/s1055-937x(01)80026-8)

Wang, W., Ren, P. (2009). Design of multiplexed detection assays for identification of avian influenza a virus subtypes pathogenic to humans by SmartCycler real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 47 (1): 86–92.

Warne, R. W., Proudfoot, G. a., & Crespi, E. J. (2015). Biomarkers of animal health: Integrating nutritional ecology, endocrine ecophysiology, ecoimmunology, and geospatial ecology. *Ecology and Evolution*, 5(3), 557–566. <https://doi.org/10.1002/ece3.1360>

Wells, Kentwood D. (2010) *The Ecology and Behavior of Amphibians*, Chicago: University of Chicago Press. <https://doi.org/10.7208/9780226893334>

Wickham y col., (2019). Welcome to the tidyverse. Journal of Open Source Software, 4(43), 1686, <https://doi.org/10.21105/joss.01686>

Wilder, S. M., Raubenheimer, D., y Simpson, S. J. (2016). Moving beyond body condition indices as an estimate of fitness in ecological and evolutionary studies. Functional Ecology, 30(1), 108–115. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12460>

Wilson, M. F. (2013) 'Agriculture and industry as potential origins for chemical contamination in the environment. A review of the potential sources of organic contamination', Current Organic Chemistry, 17(24), pp. 2972-2975.

Wilson, S., Felt, S., Torreilles, S., Howard, A., Behan, C., Moorhead, R., & Green, S. (2011). Serum clinical biochemical and hematologic reference ranges of laboratory-reared and wild-caught *Xenopus laevis*. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 50(5), 635–640.

Winkler, M., 1995. "Tratamiento Biológico de Aguas de Desecho". Editorial Limusa. México D.F., 338 pp.

Wojtaszek, J. y Adamowicz, A. (2003) Haematology of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L. Comp. Clin. Path. 12: 129 - 134.

Wright, K. (2001) Amphibian hematology. En: Amphibian medicine and captive husbandry. (Wright, K. y Whitaker, B., eds.). Krieger Publishing, Malabar, Florida, Estados Unidos, p. 129 - 146.

WWF (2020) Living Planet Report 2020 - Bending the curve of biodiversity loss. Almond, R.E.A., Grooten M. and Petersen, T. (Eds). WWF, Gland, Switzerland

Young, S., Warner, J., Speare, R., Berger, L., Skerratt, L. F., & Muller, R. (2012). Hematologic and plasma biochemical reference intervals for health monitoring of wild Australian tree frogs. Veterinary Clinical Pathology, 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2012.00470.x>

Zhelev Zh. M., 2007. Investigation on the blood differential formula in *Rana ridibunda* (Amphibia: Anura) from the area of the Maritsa-Istok-1 Steam Power Plant. Acta Zoologica Bulgarica, 59: 181-190.

Zhelev, Z. M., Arnaudova, D. N., Popgeorgiev, G. S., & Tsonev, S. V. (2020). In situ assessment of health status and heavy metal bioaccumulation of adult *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) individuals inhabiting polluted area in southern Bulgaria. Ecological Indicators, 115(January), 106413. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106413>

Zhelev, Z. M., Popgeorgiev, G. S., & Mehterov, N. H. (2014). Changes in the basic morphophysiological parameters in the populations of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) from anthropogenically polluted biotopes in southern Bulgaria. Part 1. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 20(5), 1202–1210.

Zhelev, Z., Tsonev, C., Georgieva, K., Arnaudova, D. (2018). Health status of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) in a rice paddy ecosystem in Southern Bulgaria and its

importance in assessing environmental state: Haematological parameters. Environ. Sci. Pollut. Res. 25 (8), 7884–7895. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1109-5>.

Zhelev, Z.M. (2007). Investigation on the blood differential formula in *Rana ridibunda* (Anura, Amphibia) from the Area of the Maritsa – Iztok 1 Steam Power Plant. Acta Zool. Bulg. 59(2): 181 - 190.

Zhelev, Zh.M., Popgeorgiev, G.S., Angelov, M.V. (2013). Investigating the changes in the morphological content of the blood of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) as a result of anthropogenic pollution and its use as an environmental bioindicator. Acta Zool. Bulg. 65 (2), 187–196.

Zhelev, Zh.M., Popgeorgiev, G.S., Mehterov, N.H. (2015a). Haematological parameters of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) from the region of the lead and zinc plant “Kardzhali” (South Bulgaria) and their use in the environmental quality assessment. Acta Zool. Bulg. 67 (2), 271–282.

Zhelev, Zh.M., Popgeorgiev, G.S., Mehterov, N.H., (2015b). Changes in the Hepatosomatic Index and Condition Factor in the populations of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) from anthropogenically polluted biotopes in Southern Bulgaria. Pt. II. Bulg. J. Agric. Sci. 21 (3), 534–539.

Zhelev, Zh.M., Tsonev, C.V., Arnaudova, D.N. (2017). Health status of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Ranidae) in a rice paddy ecosystem in southern Bulgaria: body condition factor and fluctuating asymmetry. Acta Zool. Bulg. 69 (Suppl. 8), 169–177.

Zhukova, T.I. y Kubantsev, B.S. (1979) Changes in the blood composition of salientians during hibernation. Soviet. J. Ecol. 9: 379 - 382.

Zimmerman, B. L. (1994) 'Audio strip transects', Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians, pp. 92-97.

ANEXO 1: TABLAS CAPÍTULO 2

Tabla 1: Valores de los parámetros clínicos a nivel individuo evaluados en anuros adultos encontrados en la bibliografía.

Autores	Especie	ICC	IHS	ICG	IGS
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>		0.0325		
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>		0.0275		
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>		0.0325		
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>		0.029		
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>		0.033		
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>		0.0275		
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>		0.0295		
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>		0.024		
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>		0.029		
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>		0.0275		
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>		0.0295		
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>		0.032		
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>		0.0275		
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>		0.0255		
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>		0.0295		
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>		0.0325		
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>		0.028		
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>		0.022		
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>		0.0255		
Lajmanovich y col., 2008	<i>R. arenarum</i>	0.113070174			
Lajmanovich, 2008	<i>R. fernandezae</i>	0.018517587			
Lajmanovich, 2008	<i>R. schneideri</i>	0.091484798			
Damonte, 2019	<i>B. pulchella</i>		0.03		
Damonte, 2019	<i>B. pulchella</i>		0.033		
Damonte, 2019	<i>B. pulchella</i>		0.021		
Damonte, 2019	<i>B. pulchella</i>		0.02		
Damonte, 2019	<i>B. pulchella</i>		0.0215		
Damonte, 2019	<i>B. pulchella</i>		0.028		
Damonte, 2019	<i>B. pulchella</i>		0.031		
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>		0.023	0.004	
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>		0.03	0	0.12
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>		0.024	0.007	
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>		0.026	0.0019	0.05
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>		0.023	0.0038	
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>		0.029	0.0025	0.06
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>		0.0185	0.0038	
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>		0.0195	0.0017	0.08

Tabla 2: Valores de los parámetros clínicos a nivel sanguíneo evaluados en anuros adultos encontrados en la bibliografía.

Autores	Especie	Hto	RGR	Hb	VCM	HCM	CHCM
Alder y Huber, 1923*	<i>H. arborea</i>		0.67				
Alder y Huber, 1923*	<i>R. esculenta</i>		0.32				
Alder y Huber, 1923*	<i>R. temporaria</i>		0.41				
arikan y col 2003 en zhelav 2015	<i>Polodytes caucasicus</i>		0.777				
Arikan y col., 1989*	<i>R. ridibunda</i>		0.33				
Arikan y col., 2010	<i>B. bombina</i>		0.25				
Arrieta y col., 2004	<i>B. arenarum</i>	35.7					
Arserim y Mermer, 2008	<i>R. macrocnemis</i>	35	0.51	8.07	716.39	165.1	25.99
Arserim y Mermer, 2008	<i>R. macrocnemis</i>	32	0.52	8.12	674.07	170.48	24.24
Arvy, 1947*	<i>R. temporaria</i>		0.45				
Arvy, 1947*	<i>R. temporaria</i>		0.3				
Banerjee, 1983, 1988*	<i>B. melanostictus</i>	20	1.22	13.6	168	112	69
Banerjee, 1983, 1988*	<i>B. melanostictus</i>	14.4	0.85	10.6	169	125	74
Biswas y Boral, 1985; Pai y Shangbay, 1988*	<i>B. melanostictus</i>	32.1	0.69	11	465	159	34
Biswas y col., 1981 (en Martínez y col., 1985)*	<i>B. melanostictus</i>	32.2	0.68	11.1	480		34.6
Boral & Deb (1970) en zhelav y col., 2015	<i>Bufo melanostictus</i>	47.68	0.67	14.91	742.56		
Boral & Deb (1970) en zhelav y col., 2015	<i>Bufo melanostictus</i>	40.95	0.67	12.64	616.7		
Boral & Deb (1970) en zhelav y col., 2015	<i>Bufo melanostictus</i>	34.55	0.48	10.62	725.98		
Cabagna y col 2010	<i>Rhinella fernandezae</i>	27.37	0.505	9.18	535.48	18.5	33.5
Cabagna y col., 2005	<i>B. arenarum</i>	41	0.58	8.19	717.78	143.1	19.94
Cabagna, 2012	<i>Rhinella arenarum</i>	34.83	0.55	8.32	657.81	158	24.17
Cabagna, 2012	<i>R. arenarum</i>	41	0.58	8.19	717.78	143.1	19.94
Cabagna, 2012	<i>R. arenarum</i>	29.17	0.46	5.66	655.28	125.2	19.36
Cabagna, 2012	<i>R. arenarum</i>	35.37	0.55	9.87	650.09	181.4	27.91
Cabagna, 2012	<i>R. arenarum</i>	34.37	0.55	8.57	636.43	160.4	24.86
Cabagna, 2012	<i>L. latrans</i>	26.07	0.775	7.6	322.25	94.46	29.29
Cabagna, 2012	<i>Rhinella fernandezae</i>	27.37	0.505	9.18	535.48	181.15	33.5
Cabagna, 2012	<i>Rhinella schneideri</i>	29.86	0.47	8.76	644.01	188.64	29.42
Cabagna, 2012	<i>L. chaquensis</i>	23	0.77	6.82	302.87	88.04	29.47
Cabagna, 2012	<i>T. typhonus</i>	24.62	0.41	7.98	575.58	156.77	26.57
Cabagna, 2012	<i>Hypsiboas raniceps</i>	25	0.43	8.07	581.4	187.61	32.27
Cabagna, 2012	<i>Rhinella arenarum</i>						
carmena suero y col 1980 en zhelev y col., 2015	<i>Hyla septentrionalis</i>	22.4		6.2			
Carmena Suero, 1980 (en Dönmez y col., 2009)	<i>R. catesbeiana</i>	40.4		9.5			23.5
Chiesa y col., 2006	<i>B. arenarum</i>		0.51				
Cianciarullo y col., 2000b*	<i>O. americanus</i>	29	1.9	7.3	155	38	25
Cianciarullo y col., 2000b*	<i>O. americanus</i>	15	0.7	4.8	225	69	32
COPPO y col., 2003	<i>Rana catesbeiana</i>	30.1		6.8	709	157	23.3
Coppo y col., 2005	<i>R. catesbeiana</i>	30.1	0.42	6.8	709	157	23.3
das y mahapatra 2014 en zhelev y col., 2015	<i>Polypedates seraiensis</i>	51.55	0.62	5.82	822.41	96.71	
das y mahapatra 2014 en zhelev y col., 2015	<i>Polypedates seraiensis</i>	50.62	0.59	5.95	851.31	100.05	
Dönmez y col., 2009	<i>B. bufo</i>	26.88	0.59	8.6	471.3	135.19	32.44
Dönmez y col., 2009	<i>B. bufo</i>	27.2	0.44	7.8	633.17	182.69	28.5

Dönmez y col., 2009	<i>B. bufo</i>	38.71	0.71	9.8	551.35	140.99	26.16
Dönmez y col., 2009	<i>B. bufo</i>	42.36	0.9	11.8	470.74	131.02	27.83
Dönmez y col., 2009	<i>B. bufo</i>	33.08	0.87	10.1	378.9	115.95	30.81
Dönmez y col., 2009	<i>B. bufo</i>	33.36	0.86	9.72	391.8	114.18	30.32
El-Bakary y col., 1995*	<i>B. regularis</i>	32.7	1.52	11.6	21.5	35.5	
El-Bakary y col., 1995*	<i>B. regularis</i>	30.2	1.21	10.6	25.6	35.1	
Goniakowska, 1970 (en Glomski y col., 1997)*	<i>H. arborea</i>					1390	
grace y akinola 2013 en zhelev y col., 2015	<i>Bufo regularis</i>	28.2	0.36	9			
grace y akinola 2013 en zhelev y col., 2015	<i>Bufo regularis</i>	34.3	0.52	11.2			
grace y akinola 2013 en zhelev y col., 2015	<i>Bufo regularis</i>	33.2	0.42	10.4			
grace y akinola 2013 en zhelev y col., 2015	<i>Bufo regularis</i>	31	0.39	10.1			
Gül y col., 2011	<i>Pseudepidalea viridis</i>	58.5	0.94	15.76	638.63	174.18	27.24
Gül y col., 2011	<i>P. viridis</i>	43.75	0.98	12.95	450.18	133.93	29.67
Gül y col., 2011	<i>H. arborea</i>	50.18	0.73	12.21	758.1	186.89	24.68
Gül y col., 2011	<i>H. arborea</i>	45	0.65	11.82	878.72	194.08	26.19
Gül y col., 2011	<i>P. syriacus</i>	40	0.77	10.38	468.2	138.59	28.86
Gül y col., 2011	<i>P. syriacus</i>	38	0.65	9.3	577.35	141.37	24.21
Gül y col., 2011	<i>P. ridibundus</i>	43.19	0.89	9.52	488.83	107.5	21.95
Gül y col., 2011	<i>P. ridibundus</i>	38.19	0.76	8.66	499.71	114.69	23.78
Gül y col., 2011	<i>R. dalmatina</i>	34.91	0.72	8.51	495.14	120.58	24.61
Gül y col., 2011	<i>R. dalmatina</i>	30.26	0.65	8.2	472.77	129.09	27.16
Gül y Tok, 2009	<i>B. bufo</i>		0.53				
Gül y Tok, 2009	<i>B. viridis</i>		0.52				
Gül y Tok, 2009	<i>Pelobates syriacus</i>		0.66				
Gül y Tok, 2009	<i>R. dalmatina</i>		0.42				
Gül y Tok, 2009	<i>R. ridibunda</i>		0.32				
Hadji-Azimi y col., 1987; Merkle, 1989	<i>X. laevis</i>	43.3	0.9	16.4	483	183	38
Hall, 1966 (en Martínez y col., 1985)*	<i>B. americanus</i>	37.3	0.82	11.1	257	135	29.7
Harris, 1972 (en Gül y col., 2011)	<i>R. pipiens</i>	8	0.16	2			
Harris, 1972 (en Gül y col., 2011)	<i>R. pipiens</i>	41.5	0.55	9.5			
Harris, 1972 (en Gül y col., 2011)	<i>R. pipiens</i>	17	0.11	2.9			
Harris, 1972 (en Gül y col., 2011)	<i>R. pipiens</i>	47.5	0.46	12.7			
Hazard y Hutchison, 1978*	<i>R. catesbeiana</i>	23.8		6.6			27.7
Hazard y Hutchison, 1982	<i>R. berlandieri foreri</i>	22.6		5.19			23.5
Hazard y Hutchison, 1982	<i>R. b. berlandieri</i>	26.35		7.56			28.6
Hazard y Hutchison, 1982	<i>R. blairi</i>	21.47		7.43			34.6
Hazard y Hutchison, 1982*	<i>B. americanus</i>	23.07		6.93			30
Hazard y Hutchison, 1982*	<i>B. cognatus</i>	25.14		9.98			39.6
Hazard y Hutchison, 1982*	<i>B. marinus</i>	11.76		4.61			39.2
Hazard y Hutchison, 1982*	<i>B. w. woodhousei</i>	39.71		11.95			37.6
Hazard y Hutchison, 1982*	<i>Hyla gratiosa</i>	18.18		4.49			24.6
Hazard y Hutchison, 1982*	<i>H. versicolor</i>	13.65		4.63			33.9
Hazard y Hutchison, 1982*	<i>R. catesbeiana</i>	37.3		8.99			24.1
Herter, 1941*	<i>B. variegata</i>		0.45				
Hutchison y col., 1965 (en Glomski y col., 1997)*	<i>B. americanus</i>		0.66				
Hutchison y col., 1965; Matson, 1990*	<i>H. versicolor</i>		0.62				

Hutchison y col., 1976 (en Glomski y col., 1997)*	<i>B. melanostictus</i>	38	0.73	15	516	204	39
Hutchison y col., 1976 (en Glomski y col., 1997)*	<i>B. melanostictus</i>	24.9	0.51	9.3	487	183	38
Hutchison y col., 1976 (en Glomski y col., 1997)*	<i>T. culeus</i>	27.9	0.73	8.1	394	110	28
Hutchison y Szarski, 1965*	<i>R. catesbeiana</i>		0.25				
Hutchison y Szarski, 1965*	<i>R. clamitans</i>		0.28				
Ilizaliturri-Hernández 2013	<i>Rhinella marina</i>	34.6		9			26.6
Ilizaliturri-Hernández 2013	<i>Rhinella marina</i>	33.4		8			24
Ilizaliturri-Hernández 2013	<i>Rhinella marina</i>	32.3		7.4			23.8
Jordan, 1938; Andrew, 1965 (en Glomski y col., 1997)*	<i>R. temporaria</i>		0.41				
Kaloustian y col., 1982 (en Glomski y col., 1997)*	<i>R. catesbeiana</i>	27.1	0.31	6.5	874	208	24
Kaloustian y col., 1982 (en Glomski y col., 1997)*	<i>R. pipiens</i>	22	0.34	6.6	653	192	29
Kaloustian y Dulac, 1982 (en Martínez y col., 1985)*	<i>B. marinus</i>	36.8	0.68	10.6	538	154	28.6
Kaloustian y Dulac, 1982 (en Martínez y col., 1985)*	<i>R. pipiens</i>	22	0.34	6.6	653	192	29.4
Kaplan, 1951, 1952 (en Singh,1977)*	<i>R. pipiens</i>		0.48				
Kuramoto, 1981	<i>M. ornata</i>		0.66				
Kuramoto, 1981*	<i>B. orientalis</i>		0.18				
Kuramoto, 1981*	<i>H. hallowelli</i>		1.06				
Kuramoto, 1981*	<i>Hyla japonica</i>		0.6				
Kuramoto, 1981*	<i>R. brevipoda</i>		0.23				
Kuramoto, 1981*	<i>R. catesbeiana</i>		0.33				
Kuramoto, 1981*	<i>R. japonica</i>		0.56				
Kuramoto, 1981*	<i>R. limnocharis</i>		0.78				
Kuramoto, 1981*	<i>R. nigromaculata</i>		0.33				
Kuramoto, 1981*	<i>R. tagoi</i>		0.36				
Kuramoto, 1981*	<i>R. tsushimensis</i>		0.99				
Kuramoto, 1981*	<i>Rhacophorus schlegelii</i>		0.6				
Kuramoto, 1981*	<i>Rh. v. amamiensis</i>		0.58				
Kuramoto, 1981*	<i>Rh. buergeri</i>		0.59				
Lenfant y col., 1967 (en Glomski y col., 1997)*	<i>R. catesbeiana</i>	23.5	0.33	5.7			
Lloyber y col., 1967*	<i>B. arenarum</i>	41.9	0.83		518		
Lloyber y col., 1967*	<i>B. arenarum</i>	40.6	0.76		540		
Mahapatra y col 2012 en zhelev 2015	<i>Polypedates maculatus</i>	23.8	0.57	7.8	419.56	135.82	
Mahapatra y col 2012 en zhelev 2015	<i>Polypedates maculatus</i>	28.65	0.48	6.56	582.01	137.51	
Martinez y col., 1985*	<i>R. perezi</i>	25.7	0.48	5.19	533.29	107.5	20.15
Mishra y col., 1983 (en Glomski y col., 1997)*	<i>R. tigerina</i>	20.2	0.75	12.8	269	171	63
Mishra y col., 1983 (en Glomski y col., 1997)*	<i>R. tigerina</i>	22.5	0.7	12.4	321	177	55
Mishra y Mitra, 1998*	<i>B. melanostictus</i>	41.8	1.11	9.87	376.3	88.87	23.06
Omonona y Ekpenko, 2011	<i>R. temporaria</i>	27.08	2.69	8.96	104.52	34.56	33.1
Ostojic y col., 2000	<i>B. s. limensis</i>	39.53	0.63		621.9	172.65	28.06
Ostojic y col., 2000	<i>B. s. trifolium</i>	36.06	0.6		612.73	194.34	31.54
Ostojic y col., 2000	<i>B. s. flavolineatus</i>	26.76	0.47		599.11	181.28	30.45
Pai y Schanbhag, 1988; Samantaray 1986	<i>R. tigrina</i>		1.85				
Pauison y col., 1987 (en Glomski y col., 1997)*	<i>B. cognatus</i>	25.8	0.52	10.6	497	204	41
Ponsen y col., 2008	<i>G. molossus</i>	26.94	1.04	8.62	409.29	142.11	32.96
Roofe, 1961 (en Glomski y col., 1997)*	<i>B. viridis</i>			10.4		199	
Rouf, 1969*	<i>R. pipiens</i>	24.65	0.32	6.75			

Rouf, 1969*	<i>R. pipiens</i>	24.7	0.32	6.8	773	212	27
Ruiz y col., 1983*	<i>T. halli</i>	34.3	0.89	9.8	390	119	29
Ruiz y col., 1983*	<i>T. marmoratus</i>	35.5	0.8	11.2	448	144	31
Ruiz y col., 1983*	<i>T. pefauri</i>	19.3	0.56	7.6	338	115	32
Ruiz y col., 1983*	<i>T. peruvianus</i>	26.9	0.6	9.5	446	158	35
Ruiz y col., 1989	<i>B. spinolosus</i>	38.5	0.71	10.4	544	148	27
Ruiz y col., 1989	<i>B. spinolosus</i>	34.6	0.77	9.8	451	129	28
Samantaray y col., 1984, 1985 (en Glomski y col., 1997)*	<i>R. breviceps</i>	27.4	1.25	9.5	219	76	35
Samantaray y col., 1984, 1985 (en Glomski y col., 1997)*	<i>R. breviceps</i>	26.9	1.47	8.3	182	56	31
Samantaray y col., 1984, 1985; Pai y col., 1988*	<i>R. cyanophyctis</i>	32	1.61	7.7	219	54	24
Samantaray y col., 1984, 1985; Pai y col., 1988*	<i>R. cyanophyctis</i>	33		7.8	184	44	24
Samantaray y col., 1984, 1985; Pai y Shangbay, 1988 *	<i>R. tigerina</i>	34.4	1.85	12.5	186	68	36
Samantaray y col., 1984, 1985; Pai y Shangbay, 1989*	<i>R. tigerina</i>	36.4	1.67	11.3	217	68	31
Schermer, 1954 (en Arserim y Mermer, 2008)*	<i>R. temporaria</i>		0.4				
Sinha, 1983*	<i>R. esculenta</i>	21.6	0.48	8.8	459.4	183.9	40.7
Sinha, 1983*	<i>R. esculenta</i>	23.6	0.42	7.1	554.4	169	31.2
Stephan, 1954 (en Singh,1977)*	<i>R. temporaria</i>		0.4				
Valbona y col 2012		40		12			
Valbona y col 2012		32.2		9.6			
Wilson y col., 2011	<i>X. laevis (cautiverio, A)</i>	36.9	0.76	9.64	50.7	15.4	25.7
Wilson y col., 2011	<i>X. laevis (cautiverio, B)</i>	49.4	1.1	14.62	46.5	15.5	29.5
Wilson y col., 2011	<i>X. laevis (silvestre)</i>	41.2	0.67	10.94		15.6	
Wintrobe, 1933 (en Glomski y col., 1997)*	<i>R. catesbeiana</i>	29.3	0.44	7.8	671	179	27
Wojtaszek y Adamowicz, 2003*	<i>B. bombina</i>	20	0.34	7.44	558.22	206.49	37.63
Wojtaszek y Adamowicz, 2003*	<i>B. bombina</i>	19	0.29	6.78	655.77	230.61	35.89
Young y col, 2012	<i>Litoria caurolea</i>	38	0.735	9.3	507	126	255
Young y col, 2012	<i>Litoria infrafrenata</i>	30	0.72	7	418	99	236
Zhelav y col. 2015	<i>Bufo viridis</i>				578.58	161.96	
Zhelav y col. 2015	<i>Bufo viridis</i>				354.31	98.42	
Zhelav y col. 2015	<i>Bufo viridis</i>				560.65	157.43	
Zhelav y col. 2015	<i>Bufo viridis</i>				687.64	163.72	
Zhelav y col. 2015	<i>Bufo viridis</i>	48	0.935	13.21	561.66	151.37	
Zhelav y col. 2015	<i>Bufo viridis</i>	46	0.939	12.33	521.11	137.91	
Zhelev y col 2020	<i>Pelophylax ridibundus</i>	36	0.65	7.92	647.66	142.86	216.25
Zhelev y col 2020	<i>Pelophylax ridibundus</i>	35	0.54	8.02	712.46	160.28	219.14
Zhelev y col 2020	<i>Pelophylax ridibundus</i>	23	0.35	5.31	651.11	149.69	227.79
Zhelev y col 2020	<i>Pelophylax ridibundus</i>	23	0.36	5.57	612.65	154.08	238.58
Zhukova y col., 1979 (en Glomski y col., 1997)*	<i>R. ridibunda</i>		0.52	9.8		190	
Zhukova y kubantcev (1978) en zhelev 2015	<i>Bufo viridis</i>		0.48	9.6			
Zhukova y kubantcev (1978) en zhelev 2015	<i>Bufo viridis</i>		0.57	11.5			
Zhukova y kubantcev (1978) en zhelev 2015	<i>Bufo viridis</i>		0.52	10.4			
Zhukova y kubantcev (1978) en zhelev 2015	<i>Bufo viridis</i>		0.6	11.7			

*tomados de Cabagna, 2012

Tabla 3: Valores de los parámetros clínicos a nivel inmunológico evaluados en anuros adultos encontrados en la bibliografía.

Autores	Especie	%Neu	%Eos	%Bas	%Mon	%Lin	N:L	RTGB	RTT
Gül y Tok, 2009	<i>A. c. crepitans</i>	22.4	1.6	5	2.7	68.3	0.33		
Davis y Durso, 2009	<i>Acris c. crepitans</i>	22.4	1.6	5	2.7	68.3	0.33		
Forbes y col., 2006	<i>B. alvarius</i>	48	9	1	5	37	1.30		
Davis y DeVore (en Davis y Maerz, 2011)	<i>B. americanus</i>	68	3.3	7.4	1.5	20	3.40		
Varela y Sellares, 1938*	<i>B. americanus</i>	7	5.9	10.5	0.6	75.9	0.09		
Cabagna y col., 2005	<i>B. arenarum</i>	13.89	6.76	10.15		66.31	0.21		
Chiesa y col., 2006	<i>B. arenarum</i>	20.9	13.7	0	1.3	64	0.33		
Gül y Tok, 2009	<i>B. arenarum</i>	27.3	3.7	3.8	1.7	60.9	0.45		
Cannon y Cannon, 1979 (en Davis y Maerz, 2011)*	<i>B. bombina</i>	25	3.9	7.6	12.6	51.6	0.48		
Gül y Tok, 2009	<i>B. bufo</i>	22.72	15.72	7.45	16.72	37.36	0.61		
Das y Bhattacharjee, 2011*	<i>B. fowleri</i>	8.5	8.5	9.8	0.8	72.3	0.12		
Friedsohn, 1910 (en Davis y Maerz, 2011)	<i>B. viridis</i>	19.15	18.26	8.21	18.52	35.27	0.54		
Davis y Maerz, 2011	<i>B. vulgaris</i>	18.3	1.3	6.7	0	73	0.25		
Wojtaszek and Adamowicz, 2003	<i>Bombina bombina</i>	25	3.9	7.6	12.6	51.6	0.48		
Cannon and Cannon, 1979 en Davis y Durso, 2009	<i>bufo alvarius</i>	48	9	1	5	37	1.30		
Forbes y col., 2006 en Davis y Durso, 2009*	<i>Bufo americanus</i>	68	3.3	7.4	1.5	20	3.40		
Forbes y col. 2006 en Davis 2008	<i>Bufo americanus</i>	20	3.3	7.4	1.5	68	0.29		
Friedsohn, 1910 en Davis y Durso 2009	<i>Bufo vulgaris</i>	18.3	1.3	6.7	0	73	0.25		
Zhelav y col. 2015	<i>Bufotes viridis</i>					57.33			
Zhelav y col. 2015	<i>Bufotes viridis</i>					60.91			
Zhelav y col. 2015	<i>Bufotes viridis</i>					56.41			
Zhelav y col. 2015	<i>Bufotes viridis</i>					56.33			
Zhelav y col. 2015	<i>Bufotes viridis</i>	9.24	3.74	13	10.76	57.76	0.16		
Zhelav y col. 2015	<i>Bufotes viridis</i>	9.29	3.92	12.18	10.92	57.89	0.16		
Narayan y Hero 2011	<i>D. himalayanus</i>	48.7	2.7	2.1	28.2	16.4	2.97		
CABAGNA, 2012 (MAX)	<i>E. bicolor</i>	80	9	10	0	86	4.00	24	42
CABAGNA, 2012 (MED)	<i>E. bicolor</i>	35	0	0	0	54.5	0.65	7	5
CABAGNA, 2012 (MIN)	<i>E. bicolor</i>	9	0	0	0	20	0.10	1	1
Gül y Tok, 2009	<i>G. c. carolinensis</i>	11.7	0.7	11.7	3.6	72.3	0.16		
Davis y Maerz, 2011	<i>G. molossus</i>	26.27	1.07	8.27	22.77	41.62	0.63		
Ponsen y col., 2008 in davis y Durso, 2009	<i>Glyphogloossus molossus</i>	26.3	1.1	8.3	22.7	41.6	0.63		
Davis y Maerz, 2011	<i>H. arborea</i>	19.84	19.14	7.42	17.28	37.28	0.53		
CABAGNA, 2012 (MAX)	<i>H. pulchellus</i>	25	20	38	0	88	0.33	50	26
CABAGNA, 2012 (MED)	<i>H. pulchellus</i>	13.6	0	3.55	0	75.73	0.22	27	5
CABAGNA, 2012 (MIN)	<i>H. pulchellus</i>	0	0	0	0	50	0.00	10	2
Davis y Horan (en Davis y Maerz, 2011)	<i>H. versicolor</i>	9.4	2.6	3.2	1.4	83.3	0.11		
CABAGNA, 2012 (MAX)	<i>Hypsiboas raniceps</i>	24	2	0	0	80	0.32	15	
CABAGNA, 2012 (MIN)	<i>Hypsiboas raniceps</i>	20	0	0	0	74	0.25	10	
CABAGNA, 2012 (MAX)	<i>L. chaquensis</i>	54	3	2	3	73	1.00	20	44
CABAGNA, 2012 (MED)	<i>L. chaquensis</i>	38.5	0	0	0	58.5	0.66	15.5	38
CABAGNA, 2012 (MIN)	<i>L. chaquensis</i>	23	0	0	0	40	0.00	8	14
CABAGNA, 2012 (MAX)	<i>L. latrans</i>	79	18	19	1	65	3.80	9	56
CABAGNA, 2012 (MED)	<i>L. latrans</i>	19.1	7.77	4.25	0	55.56	0.37	4.95	14.5

CABAGNA, 2012 (MIN)	<i>L. latrans</i>	12	0	0	0	21	0.24	3	3
CABAGNA, 2012 (MAX)	<i>L. limellum</i>	67	0	33	0	100	6.00	18	30
CABAGNA, 2012 (MED)	<i>L. limellum</i>	16.07	0	13.89	0	66.67	0.23	8	10
CABAGNA, 2012 (MIN)	<i>L. limellum</i>	0	0	0	0	11	0.00	4	4
CABAGNA, 2012 (MAX)	<i>L. mystacinus</i>	47	8	8	0	96	0.89	82	52
CABAGNA, 2012 (MED)	<i>L. mystacinus</i>	12.59	0	0	0	87.5	0.13	48	22
CABAGNA, 2012 (MIN)	<i>L. mystacinus</i>	4	0	0	0	53	0.04	16	12
Cathers y col., 1997 (en Davis y Maerz, 2011)	<i>L. pipiens</i>	50	11.9			22.7	2.20		
Shutler y Marcogliese, 2011	<i>Lithobates pipiens</i>	38.2	17.4			33	1.16		
Shutler y Marcogliese, 2011	<i>Lithobates pipiens</i>	58	6.9			26	2.23		
Shutler y Marcogliese, 2011	<i>Lithobates pipiens</i>	50	11.9			22.7	2.20		
Shutler y Marcogliese, 2011	<i>Lithobates pipiens</i>	34.2	19.5			37.9	0.90		
Shutler y Marcogliese, 2011	<i>Lithobates pipiens</i>	38.7	18.6	5.9	0.8	36	1.08		
Young y col, 2012	<i>Litoria cauroleale</i>	21.5	2	0	7	67.5	0.32		
Young y col, 2012	<i>Litoria infrafrrenata</i>	20	0	0	6	70	0.29		
HOTA Y COL., 2013	<i>Microhyla ornata</i>	30.41	10.21	2.72	6.24	50.42	0.60		
Valbona y col., 2012	<i>Microhyla ornata</i>	31.21	9.32	2.91	5.28	51.28	0.61		
Bennett & Daigle 1983 en Davis 2008	<i>Notophthalmus viridescens</i>	24.3	6.2	3.2	2.8	63.5	0.38		
CABAGNA, 2012 (MAX)	<i>O. americanus</i>	67	57	62	0	40	6.00	14	48
CABAGNA, 2012 (MED)	<i>O. americanus</i>	43.31	0	21.11	0	23.37	2.00	11	21.5
CABAGNA, 2012 (MIN)	<i>O. americanus</i>	14	0	0	0	11	0.50	6	2
Ponsen y col., 2008	<i>Osteopilus septentrionalis</i>	24.6	6.2	1.5	4.2	63.6	0.39		
*	<i>P. maculatus</i>	27.43	12.59	2.71	7.57	49.71	0.55		
CABAGNA, 2012 (MAX)	<i>P. minuta</i>	77	7	14	1	100	6.42	28	28
CABAGNA, 2012 (MED)	<i>P. minuta</i>	35	0	0	0	59.54	0.62	22	22
CABAGNA, 2012 (MIN)	<i>P. minuta</i>	0	0	0	0	0	0.00	10	10
Hadji-Azimi y col., 1987	<i>P. syriacus</i>	23.1	15.3	7.4	14	40.2	0.57		
Zhelev y col 2020	<i>Pelophylax ridibundus</i>	9.41	0.7	3.2	4.5	82.2	0.11		
Zhelev y col 2020	<i>Pelophylax ridibundus</i>	9.1	1	4.5	3.6	81.8	0.11		
Zhelev y col 2020	<i>Pelophylax ridibundus</i>	20.21	5.5	0.5	11.3	62.5	0.32		
Zhelev y col 2020	<i>Pelophylax ridibundus</i>	19.6	4.4	0.7	11.8	63.5	0.31		
Davis y Durso 2009	<i>Platymantis vitiana</i>	25.3	5	15.3	5	66.7	0.38		
Mahapatra y col 2012 en zhelev 2015	<i>Polypedates maculatus</i>	22	12.72	3.72	7.43	50.29	0.44		
Mahapatra y col 2012 en zhelev 2015	<i>Polypedates maculatus</i>	27.42	12.59	2.71	7.57	49.71	0.55		
Das y Mahapatra 2014 en zhelev 2015	<i>Polypedates seraiensis</i>	26.66	9.97	2.8	5.7	54.92	0.49		
Das y Mahapatra 2014 en zhelev 2015	<i>Polypedates seraiensis</i>	23.52	11.02	3.5	6.42	55.52	0.42		
Coppo y col., 2005	<i>R. catesbeiana</i>	22	8.9	2.5	0.6	62.9	0.35		
Davis y Durso, 2009	<i>R. catesbeiana</i>	60.9	5.8	3.5	2.9	26.8	2.27		
Rocha y col., 2010 (en Davis, 2011)	<i>R. catesbeiana</i>	8.8	11.6	10.5	1.8	67.4	0.13		
Shutler y col., 2009	<i>R. catesbeiana</i>	0.8	1.8	5.6	0	91.8	0.01		
Gül y Tok, 2009	<i>R. clamitans</i>	16	17	1	1	66	0.24		
Friedsohn, 1910 (en Davis y Maerz, 2011)	<i>R. dalmatina</i>	19.85	15.25	10.25	19.25	37.5	0.53		
Bennett y Alspaugh, 1964 (en Davis y Maerz, 2011)	<i>R. esculenta</i>	15.2	14.4	12.4	0.5	57.6	0.26		
Romanova y Romanova, 2003	<i>R. esculenta</i>	17.1	5.7	1.9	0	75.2	0.23		
Maniero y Carey, 1997 (en Davis y Maerz, 2011)	<i>R. pipiens</i>	26.5	7.3	4.4	11	53.4	0.50		
Rouf, 1969	<i>R. pipiens</i>	61.8	7	1.8	5.2	25.4	2.43		

Zehlev y col., 2007	<i>R. pipiens</i>	55.4	10.1	19.2	4.1	11.3	4.90		
Davis y Maerz, 2011	<i>R. ridibunda</i>	20	15.1	7.6	16.4	40.9	0.49		
Gül y Tok, 2009	<i>R. ridibunda</i>		6.5	21.08	4.38	41.95			
Davis y Maerz, 2011	<i>R. sphenocephala</i>	13.8	4.2	12.4	5.9	63.6	0.22		
Mahapatra y col., 2010	<i>R. sphenocephala</i>	23.9	1.99	9.9	3.5	60.7	0.39		
Cathers y col. 1997 en Davis 2008	<i>Rana catesbeiana</i>	22	8.9	2.5	0.6	62.9	0.35		
Coppo y col., 2003	<i>Rana catesbeiana</i>	60.8	5.8	3.5	2.9	26.8	2.26		
Shutler y col., 2009 en Davis y Durso, 2009	<i>rana clamitans</i>	16	17	1	1	66	0.24		
Friedsohn, 1910 (cited in Jordan 1938)	<i>Rana esculenta</i>	17.1	5.7	1.9	0	75.2	0.23		
Romanova and Romanova, 2003	<i>rana esculenta</i>	15.2	14.4	12.4	0.5	57.6	0.26		
Bennett and Alspaugh, 1964 en Davis y Durso 2009	<i>Rana pipiens</i>	61.8	7	1.8	5.2	25.4	2.43		
Maniero and Carey, 1997 en davis y Durso 2009	<i>Rana pipiens</i>	11.3	10.1	19.2	4.1	55.4	0.20		
Rouf, 1969 en Davis y Durso 2009	<i>Rana pipiens</i>	26.5	7.3	4.4	11	53.4	0.50		
Barni 2007	<i>Rana skn esculenta</i>		10						
Barni 2007	<i>Rana skn esculenta</i>		2.5						
CABAGNA, 2012 (MAX)	<i>Rhinella arenarum</i>	44	26	0	8	91	16.50	22	14
CABAGNA, 2012 (MED)	<i>Rhinella arenarum</i>	21	11	0	0	61	0.34	9.86	6.5
CABAGNA, 2012 (MIN)	<i>Rhinella arenarum</i>	7	2	0	0	26	0.73	6	2
Chiesa 2003	<i>Rhinella arenarum</i>	27.3	3.7	3.8	1.7	60.7	0.45		
Chiesa 2003	<i>Rhinella arenarum</i>	24.2	6.5	2.3	1.6	62.2	0.39		
Rosemberg y col., 2003	<i>Rhinella arenarum</i>	14.3	9.2	3.3	0.3	71	0.20		
Rosemberg y col., 2003	<i>Rhinella arenarum</i>	16.6	11	3.8	0.3	64	0.25		
Cabagna y col 2010	<i>Rhinella fernandezae</i>	19	5	32	1	41	0.46		
CABAGNA, 2012 (MAX)	<i>Rhinella fernandezae</i>	48	16	69	6	75	1.85	19	30
CABAGNA, 2012 (MED)	<i>Rhinella fernandezae</i>	15	4	18	0	39	0.37	8.33	4
CABAGNA, 2012 (MIN)	<i>Rhinella fernandezae</i>	3	0	1	0	14	0.08	5	2
CABAGNA, 2012 (MAX)	<i>Rhinella schneideri</i>	30	32	36	6	84	0.56	14	39
CABAGNA, 2012 (MED)	<i>Rhinella schneideri</i>	11	9	9	0	61	0.17	9.03	10.5
CABAGNA, 2012 (MIN)	<i>Rhinella schneideri</i>	0	3	2	0	22	0.02	4	8
CABAGNA, 2012 (MAX)	<i>S. berthae</i>	29	1	30	0	63	0.46	34	
CABAGNA, 2012 (MIN)	<i>S. berthae</i>	10	0	0	0	60	0.33	12	
CABAGNA, 2012 (MAX)	<i>S. squalirostris</i>	71	3	15	4	79	3.60	35	18
CABAGNA, 2012 (MED)	<i>S. squalirostris</i>	38	0	1.89	0	60	0.67	13.5	6.5
CABAGNA, 2012 (MIN)	<i>S. squalirostris</i>	17	0	0	0	19	0.21	10	1
CABAGNA, 2012 (MAX)	<i>T. thyphoniuss</i>	50	15	5	2	86	1.00	44	46
CABAGNA, 2012 (MED)	<i>T. thyphoniuss</i>	13	6.5	0	0	75.5	0.17	17	11
CABAGNA, 2012 (MIN)	<i>T. thyphoniuss</i>	4	0	0	0	50	0.00	6	2
Shutler y Marcogliese, 2011	<i>X. laevis</i>	26.5	1.2	40.5	1.6	30.1	0.88		
Hadji-Azimi y col., 1987 en davis y Durso, 2009	<i>Xenopus laevis</i>	26.5	1.2	40.5	1.6	30.1	0.88		

*tomados de Cabagna, 2012

Tabla 4: Valores de los parámetros clínicos a nivel bioquímico evaluados en anuros adultos encontrados en la bibliografía.

Autores	Especie	GST H	CAT H	AChE H	GST R	CAT R	GST M	AChE M	AChE P	GST P
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>	8.5	652	0.015						
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>	8.25	806	0.017						
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>	7.75	112	0.02						
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>	5.2	123	0.021						
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>	4.8	601	0.015						
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>	7.5	102	0.021						
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>	7.1	605	0.018						
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>	7.1	654	0.02						
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>	5.5	105	0.021						
Damonte, 2019	<i>L. latrans</i>	7.2	104	0.023						
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>		1150							
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>		1310							
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>		1000							
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>		1050							
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>		1000							
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>		1400							
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>		1050							
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>		980							
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>		1300							
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>		1000							
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>		1250							
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>		1270							
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>	7.7		0.06						
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>	6.9		0.078						
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>	6.8		0.092						
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>	4.8		0.078						
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>	8.7		0.058						
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>	9.3		0.083						
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>	8.7		0.055						
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>	7.6		0.077						
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>	5.4		0.083						
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>	6.9		0.1						
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>	8.6		0.062						
Brodeur y col., 2011	<i>L. latrans</i>	9.1		0.062						
COPPO y col., 2003	<i>Rana catesbeiana</i>								168	
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>	5.9	154	0.035						
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>	5.5	152	0.03						
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>	6.1	151	0.04						
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>	5.7	152	0.038						
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>	5	125	0.052						
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>	5.7	120	0.041						
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>	4.2	175	0.056						

Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>	4.75	125	0.047	
Damonte, 2019	<i>L. latinasus</i>	5.9	195	0.048	
Damonte, 2019	<i>B. pulchella</i>	8	141	0.027	
Damonte, 2019	<i>B. pulchella</i>	9.8	162	0.02	
Damonte, 2019	<i>B. pulchella</i>	7.95	171	0.027	
Damonte, 2019	<i>B. pulchella</i>	8.1	220	0.016	
Damonte, 2019	<i>B. pulchella</i>	8.05	153	0.02	
Damonte, 2019	<i>B. pulchella</i>	8	155	0.023	
Damonte, 2019	<i>B. pulchella</i>	11.2	225	0.027	
Brodeur y col., 2011	<i>H. pulchellus</i>	2.9	55	0.105	
Brodeur y col., 2011	<i>H. pulchellus</i>	2.1	70	1.115	
Brodeur y col., 2011	<i>H. pulchellus</i>	2.88	68	0.116	
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>	1.25	300	0.068	
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>	1.15	230	0.058	
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>	1.32	340	0.079	
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>	1.28	330	0.08	
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>	1.5	380	0.087	
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>	1.42	280	0.087	
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>	1.05	390	0.078	
Brodeur y col., 2012	<i>H. pulchellus</i>	1.23	420	0.081	
Lajmanovich y col., 2008	<i>R. arenarum</i>				1.59
Lajmanovich y col., 2008	<i>R. fernandezae</i>				1.94
Lajmanovich y col., 2008	<i>R. schneideri</i>				1.6
Barja de Quiroga y col., 1985	<i>R. ridibunda</i>		16	0.6	
Barja de Quiroga y col., 1985	<i>D. pictus</i>		14	0.5	

H: hígado; R: riñón; M: músculo; P: plasma.

Tabla 4: Valores de los parámetros clínicos a nivel plasmático evaluados en anuros adultos encontrados en la bibliografía.

Autores	Especie	LDH	CPK	TGP	TGO	FA	PT	Alb	Glob	A/G	COL	TGC	HDL	LDL	VLDL	Ca	P	Mg	Creat	Ur	Ami
Chiesa 2003	<i>Rhinella arenarum</i>						5.5	1.7	3.5	0.49											
Chiesa 2003	<i>Rhinella arenarum</i>						4.5	1.2	3.3	0.36											
Wilson y col., 2011	<i>X. laevis (cautiverio, A)</i>	1809	1658	21	453	148	3.3	1	2.3	0.7	232	117	36	114		8.9	7.4		0.4		270
Coppo y col., 2003	<i>Rana catesbeiana</i>	117	432	12.4	48.1		4.34	1.58	2.92	0.54	62	43	4	39		8.31	8.83	2.41	0.483	8.42	
Cathers et aly col. 1997 en Davis 2008	<i>Rana catesbeiana</i>	33			45			1.6									3.3	2.05	0.99	3	
Young y col, 2012	<i>Litoria caurolea</i>		470		91		6.2									11.78	4.123				
Young y col, 2012	<i>Litoria infrafrenata</i>		399		67		3.5									9.82	4.03				
Bogan 2017	<i>Osteopilus septentrionalis</i>	2907	1292	132	494.2																1717

ANEXO 2: ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL USO DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS PROPUESTOS

Medición del error (Alperin, 2013):

Para explicar la inconsistencia en los valores de ciertos parámetros se utiliza el concepto de error. Existen varios tipos de errores que se introducen por el operador, o son causados por errores en el instrumento de medición, o por falta de precisión. Aquellos relacionados principalmente con el instrumental o a reactivos en el caso de análisis químicos, o los relacionados con fallas y distracciones del operados se los denomina “**errores determinados**”. Generalmente son grandes en magnitud e irregulares en ocurrencia. Los errores en la calibración de los aparatos, o cambios en las condiciones externas al momento de realizar las mediciones, se llaman “**errores sistemáticos**” y las medidas tienden a ser siempre más grandes o pequeñas. Aquellos relacionados con las diferencias entre la definición conceptual de la cualidad a ser medida y la definición operacional utilizada para efectuar esa medida se denominan “**errores de método**”. Por último, puede suceder que, aunque los procesos de medidas estén libres de errores determinados, sistemáticos y de método, existan fluctuaciones en los valores numéricos que se obtienen al repetir la medida. Estos errores impredecibles son los “**errores aleatorios**”, que si se producen en un gran número de observaciones tienden a anularse (las desviaciones positivas o negativas del valor verdadero, en promedio, tienden a compensarse aproximándose al valor verdadero).

A continuación, se realiza una evaluación de cada parámetro evaluado en la presente tesis, para realizar una calificación en base a los siguientes criterios: 1-probabilidad de cometer alguno de los errores mencionados anteriormente, 2-dificultad (baja, media, alta) del método, 3-costo del método (bajo, medio, alto), 4-si requiere sacrificar al animal (si/no), 5-variabilidad y estabilidad de esa variabilidad en los agrupamientos propuestos en la metodología del capítulo 2. A partir de la información obtenida teniendo en cuenta los criterios mencionados, se realizará una clasificación de cada parámetro, teniendo en cuenta ventajas y desventajas, para armar un ranking de los parámetros más recomendados para evaluar el estado de salud de los anuros.

ICC. Se utilizan varios métodos para su cálculo, todos basados en la relación entre la masa corporal y las medidas de longitud. El error en la medición de este parámetro es bajo, y puede deberse a la utilización de balanzas y calibres con diferentes precisiones para realizar las mediciones de peso y longitud hocico-cloaca, respectivamente. Además, entre los factores a los que se le puede atribuir el error, se encuentran el movimiento del animal al realizar las mediciones, o el exceso de fluidos al momento de pesarlo. Es un parámetro fácil de medir, con muy bajo costo, y no requiere el sacrificio del animal.

En cuanto a la variabilidad, el ICC se mantiene en la categoría de $CV < 50\%$, en todos los agrupamientos.

En el caso de la presente tesis, para el cálculo de este índice se contó con balanza de 0,01 gr de precisión y calibre de 0,01 cm de precisión. Los individuos fueron anestesiados antes de ser pesados y medidos mediante inmersión en solución de 2 gr/l de MS222, y luego secados con papel secante. La variabilidad aportada por el operador en este parámetro es mínima ya que constituye un proceso sencillo de llevar a cabo.

Los **índices somáticos** relacionan el peso de un determinado órgano con el tamaño corporal de los individuos. Entre los índices somáticos utilizados se encuentran el índice hepatosomático (IHS), gonadosomático (IGS) y de cuerpos grasos (ICG) que relacionan el peso del hígado, gónadas y cuerpos grasos con el peso de los individuos, respectivamente. El error en el cálculo de estos parámetros puede ser aportado por la técnica utilizada por el operador para extraer los órganos (tamaño del instrumental y cantidad de tejido extra cortado) y por la precisión de la balanza al momento de pesarlos ya que se trata de órganos pequeños. Son parámetros fáciles de medir, de muy bajo costo, y requiere el sacrificio del animal para extraer los órganos.

En cuanto a la variabilidad, el IHS se mantiene en la categoría de $CV < 50\%$, en todos los agrupamientos. Mientras que ICG y IGS presentan un $CV > 100\%$ en todos los agrupamientos, menos para *R. arenarum* de referencia que presenta CV entre 50 y 100%.

Para el cálculo de estos índices, cada órgano fue extraído utilizando tijeras y pinzas de pequeño tamaño que facilitaron la toma de muestra. El peso fue tomado con balanza digital de 0,0001 gramos de precisión. La variabilidad aportada por el operador en este parámetro es mayor que la aportada en el ICC, ya que depende con la precisión que se corte cada órgano, el tiempo que pase entre que se extrae y se pesa, o cuestiones como si se secan o no se secan para sacar exceso de fluidos.

El **hematocrito (Hto)**, generalmente expresado en porcentaje, constituye la fracción de sangre ocupada por los eritrocitos, sin incluir los leucocitos ni los trombocitos. El método más común para su medición es la centrifugación de capilares (microhematocrito). La toma de muestra de sangre se realiza mediante capilares, los cuales son sellados y llevados a la centrífuga de microhematocrito a 15000 rpm durante 5 minutos y se mide el % apoyando los capilares sobre una tabla para hematocrito. Presenta un error de $\pm 1\%$. Entre los factores a los que se le puede atribuir el error, se encuentra la falla en la toma de muestra de sangre, ya que depende de donde se toma, puede estar contaminada con linfa, por ejemplo. Es por eso que se recomienda realizar la extracción de sangre directamente del corazón para reducir la probabilidad de contaminación con otros fluidos corporales. Otro de los factores a los que se les atribuye el error es la demora en centrifugar los capilares, ya que la sangre puede sufrir proceso de hemólisis y alterar el resultado.

La dificultad de la técnica es baja, no requiere el sacrificio del animal, y el costo es medio ya que se necesita contar con centrífuga de microhematocrito para realizar la medición.

En cuanto a la variabilidad, el Hto se mantiene en la categoría de $CV < 50\%$, en todos los agrupamientos.

Para el cálculo de hematocrito, la sangre fue tomada directamente del corazón latiendo mediante capilares, por duplicado, los cuales fueron sellados inmediatamente y llevados a la centrífuga de microhematocrito a 15000 rpm durante 5 min.

El **recuento de glóbulos rojos (RGR)** es la cantidad de glóbulos rojos por unidad de volumen de sangre. Generalmente se expresa como millón de millones por litro de sangre. Para el conteo de los glóbulos rojos se toma una muestra de 10 μl de sangre y se la diluye en 2 ml de solución Natt & Herrick, o en solución salina y se realiza el conteo de glóbulos rojos. La precisión del recuento manual usando cámara hematocitométrica (cámara de Neubauer) es baja, presentando un error de $\pm 20\%$. El recuento de glóbulos rojos medido usando contadores automáticos humanos no es fiable principalmente debido a que los anfibios presentan glóbulos rojos nucleados. La variabilidad aportada por el operador puede ser por error en la preparación de la solución Natt & Herrick, en el conteo, o en la distinción de diferentes tipos celulares. La técnica no requiere el sacrificio del animal, y la dificultad es media, ya que el operador debe estar entrenado y ser capaz de identificar los glóbulos rojos de otros tipos celulares. En cuanto al costo, es medio ya que se debe contar con reactivos de preparación de solución Natt & Herrick, cámara de Neubauer y microscopio.

En cuanto a la variabilidad, el RGR se mantiene en la categoría de $CV < 50\%$, en todos los agrupamientos, menos en los datos de la bibliografía que presenta un CV de 51,39%.

Para la medición de RGR, se tomaron 10 μl de sangre y se la diluyeron en 2 ml de solución Natt & Herrick, por duplicado, y el conteo se realizó al día siguiente en cámara de Neubauer bajo microscopio.

La **concentración de hemoglobina (Hb)** es la cantidad de hemoglobina en un volumen determinado de sangre. Generalmente se expresa como gramo por decilitro (g/dl) o gramo por litro (g/l). Para realizar esta medición se toma una muestra de 10 μl de sangre con micropipeta y se diluye en 2 ml de solución de Drabkin al 10%, y se mantiene en la oscuridad, para luego ser medida mediante espectrofotómetro. La precisión del cálculo mediante el método de la cianmetahemoglobina presenta un error de $\pm 5\%$. La variabilidad aportada por el operador puede ser por el error de toma de muestra con micropipeta, error en la preparación y conservación de la solución de Drabkin, o la falla en el mantenimiento de las muestras a oscuras y refrigeradas. En cuanto a la dificultad, es una prueba sencilla ya que solamente se debe preparar las soluciones y

llevar las muestras a espectrofotómetro. En cuanto al costo, es medio ya que se debe contar con reactivo de preparación de solución Drabkin y espectrofotómetro para realizar la medición.

En cuanto a la variabilidad, la Hb se mantiene en la categoría de $CV < 50\%$, en todos los agrupamientos.

Para la medición de Hb, se tomaron 10 μl de sangre con micropipeta y se diluyeron en 2 ml de solución de Drabkin al 10%, por duplicado. Estas fueron mantenidas en heladera y oscuridad hasta el momento de ser medidas mediante espectrofotómetro (máximo 6 meses).

Considerando la precisión de las tres técnicas (Hto, RGR y Hb), en caso de tener poco volumen de sangre y tener que elegir entre los procedimientos a realizar, el más recomendable es el hematocrito, seguido por la hemoglobina y por último el recuento de glóbulos rojos.

A partir de Hto y RGR se calcula el volumen corpuscular medio (VCM) y se expresa en femtolitros; los parámetros Hb y RGR se utilizan para el cálculo de hemoglobina corpuscular media (HCM) expresada en picogramos; y la Hb y Hto se utilizan para calcular la concentración de Hb en un volumen dado de eritrocitos (HCMC) que se expresa en g/dl.

Recuento total de trombocitos: comprende el número total de trombocitos sobre cierta unidad. Generalmente se emplea la medición de la cantidad de trombocitos cada 1000 eritrocitos, aunque también se puede evaluar subjetivamente y observar si existen aglutinaciones de trombocitos. Esta técnica posee una baja precisión.

Recuento total de leucocitos: comprende el número total de leucocitos de cualquier tipo sobre cierta unidad. Puede considerarse número total de leucocitos en un determinado volumen de sangre (generalmente se expresa como mil millones por litro) (Natt & Herrick, 1951) (precisión de $\pm 20\%$), o número total de leucocitos cada 1000 eritrocitos utilizando microscopio con un objetivo de 100x con una menor precisión.

Recuento diferencial de leucocitos: proporciona información de la cantidad relativa de los diferentes tipos de leucocitos. Se emplea microscopio con objetivo de 100x.

Para el recuento total y diferencial de leucocitos y recuento total de trombocitos, se utilizan frotis teñidos con diferentes soluciones (por ejemplo: Giemsa, Wright, May-Grünwald Giemsa) y se realizan bajo microscopio con un objetivo de 100x.

Los procedimientos empleados para el recuento diferencial de leucocitos y el recuento total de leucocitos y de trombocitos, basados en la preparación de extensiones sanguíneas, se caracterizan por un elevado error, debido a la imprecisión y la inexactitud de la técnica. La variabilidad de cada tipo de leucocito está relacionada con la frecuencia en la que aparecen en la circulación. Los linfocitos y neutrófilos son los leucocitos más abundantes, mientras que eosinófilos, basófilos y monocitos son los menos abundantes, por lo que estos últimos tres tendrán mayor variabilidad

que puede ser producto de distribuciones celulares poco homogéneas. Además, a los recuento total y diferencial de glóbulos blancos (RTGB y RDGB) y recuento total de trombocitos (RTT) se le suma la variabilidad aportada por el operador, que puede ser el error de tinción de preparados, error en el conteo, o el error en la distinción de diferentes tipos celulares, lo que le suma dificultad a la técnica ya que el operador debe estar entrenado para poder diferenciar las células. Todo eso resulta en que la dificultad sea de media a baja, ya que, una vez entrenado el operador, las células pueden distinguirse con facilidad. Estas técnicas no requieren el sacrificio del animal, y el costo es medio ya que se requiere los reactivos para la tinción y un microscopio con objetivo 100x.

En cuanto a la variabilidad, existen diferencias en los diferentes parámetros estudiados: el RTGB, presenta un $CV < 50\%$ en los agrupamientos pertenecientes a la presente tesis; RTT presenta CV entre 50 y 100% en todos los agrupamientos, menos en el agrupamiento de *R. arenarum* de la tesis. En cuanto a los diferentes tipos de leucocitos, los neutrófilos presentaron CV entre 50 y 100% en los datos de la bibliografía y de toda la tesis; los eosinófilos presentaron $CV > 100\%$ en todos los agrupamientos, menos en los correspondientes a *R. arenarum* que presentaron CV entre 50 y 100%; los basófilos presentaron un $CV > 100\%$ en todos los agrupamientos, los monocitos presentaron $CV > 100\%$ en los agrupamientos “todos” y “bibliografía”, entre 50 y 100% en los agrupamientos de *L. luctator*, y $CV < 50\%$ en los agrupamientos correspondientes a *R. arenarum*. Por último, los linfocitos presentaron $CV < 50\%$ en todos los agrupamientos, menos en los correspondientes a *R. arenarum* en lo que el CV fue mayor a 100%.

Para la medición de estos parámetros, se tomaron muestras de sangre de los individuos para la realización de los frotis, los cuales, una vez secos, fueron bañados con metanol para fijar la muestra. Luego se procedió a realizar la tinción con Wright. Cabe destacar que antes de realizar la medición de estos parámetros, se recurrió a la bibliografía para identificar los diferentes tipos celulares.

En cuanto al **nivel bioquímico**, los niveles enzimáticos se miden en términos de actividad enzimática en un volumen dado de homogenato de cada tejido. La preparación de cada muestra incluye varios pasos que cada uno le sumará variabilidad al parámetro estudiado: 1-toma de muestra de parámetros: deben realizarse en el animal anestesiado, para evitar la muerte celular, y liberación indeseada de enzimas. Las muestras deben ser guardadas en frío, y mantenidas a -20 o -80°C . 2-Previo a la medición, se debe realizar homogenización de cada tejido para romper las células y liberar las enzimas. En este proceso se debe descongelar las muestras y mezclar cada una con solución de homogenato (previamente preparada), homogeneizar y luego centrifugar a -4°C , y tomar el sobrenadante. 3- Es el sobrenadante el que se utilizará para la medición de la actividad enzimática, por duplicado. En el caso de las tres enzimas medidas en tejido en la presente tesis (GST, CAT y AChE), el procedimiento es el mismo, sólo cambian los sustratos y

cantidades a utilizar. Se trabaja con cantidades muy pequeñas de muestras, sustrato y buffers (entre 1 y 300 μ l). Es importante aclarar que las muestras de sobrenadante deben mantenerse en frío, pero la preparación de la muestra (buffer+sustrato+muestra) se realiza en placa a 25°C. 4-La medición se realiza mediante espectrofotómetro, dura entre 90 y 180 segundos, y el programa arroja una planilla con las absorbancias medidas en cada pocillo. Es por esto que la dificultad de la técnica es media-alta ya que se requiere de mucha práctica, precisión y concentración para llevar a cabo ese procedimiento. Estas técnicas requieren el sacrificio del animal, y el costo es bajo-medio ya que se debe contar con los reactivos para preparar todas las soluciones, y con equipos como homogenizador, centrífuga refrigerada, y espectrofotómetro.

En cuanto a la variabilidad, se puede observar que las mediciones realizadas presentaron CV<100% en todos los parámetros, menos en GST y AChE medidos en plasma.

La medición de los **parámetros plasmáticos**, si bien muchos involucran la medición de actividad enzimática, es más sencilla. Los pasos que se incluyen son: 1-toma de muestra de sangre, la cual debe ser guardada en frío (4°C), en eppendorf previamente heparinizado. 2-Centrifugación de sangre para obtener plasma. 3-Traslado al laboratorio bioquímico. 4-Medición de parámetros mediante equipo automatizado y personal especializado. Entre los errores que pueden suceder, que suman a la variabilidad de estos parámetros se encuentran: cambio en el sustrato en el análisis, o la temperatura de incubación o el buffer que puede cambiar el resultado numérico. Al existir muchos métodos para medir la actividad enzimática, los resultados obtenidos pueden variar considerablemente. El intervalo de cada laboratorio dependerá del método que utilice. Por lo tanto, para las enzimas es muy importante interpretar el valor enzimático con el valor de referencia generado por el mismo laboratorio.

Para la medición de la actividad enzimática se utilizan espectrofotómetros. Durante el proceso, la presencia de una fuerte coloración (por ejemplo, por hemólisis) o de turbidez (por lipemia) puede reducir la transmisión de luz y producir valores erróneamente elevados. Además, si ocurre hemólisis en alguna parte del proceso, se produce liberación de enzimas que se encuentran en los eritrocitos (como LDH y AST) y esta liberación puede causar también valores erróneamente altos.

La dificultad de la técnica es baja ya que sólo consta de la toma de muestra de sangre y su conservación hasta el momento de ser evaluada. Estas técnicas no requieren el sacrificio del animal, y el costo es bajo-medio.

En cuanto a la variabilidad, cabe destacar que TGP, TGC y VLDL fueron los únicos tres parámetros que presentaron CV>100% en el agrupamiento *R. arenarum* de la tesis. El resto de los parámetros presentaron CV de hasta 100% en todos los agrupamientos.

Entre los parámetros que se mantuvieron estables a lo largo de todos los agrupamientos, PT, Alb, Glob, A/G, Ca, P son los que presentaron valores de CV<50% en los agrupamientos correspondientes a la bibliografía y a todos los agrupamientos de la tesis. Además, LDH, TGO y LDL presentaron valores de CV entre 50 y 100 % en los agrupamientos correspondientes a la bibliografía y a todos los agrupamientos de la tesis. Por otro lado, TGP, CREAT, UREA, CPK, COL y Ami presentaron diferencias en el CV entre *L. luctator* y *R. arenarum*. TGP se mantuvo estable en *L. luctator* con CV entre 50 y 100%, mientras que en el agrupamiento *R. arenarum* de la tesis aumentó el CV. Creat se mantuvo estable en *L. luctator* con CV<50%, pero el CV aumentó en *R. arenarum* de referencia. Urea también se mantuvo estable en *L. luctator* con CV entre 50 y 100%, pero este disminuyó en *R. arenarum* de la tesis.

Para *R. arenarum*, CPK, COL y Ami se mantuvieron estables con CV entre 50 y 100% para CPK y Ami, y CV<50% para COL. Sin embargo, estos parámetros no fueron estables en *L. luctator*, ya que CPK disminuyó el CV con respecto a los datos de la bibliografía, el COL aumentó su CV en *L. luctator* de los sitios de referencia, y el CV de Ami disminuyó en *L. luctator* de los sitios de referencia.

Los parámetros que no se mantuvieron estables a lo largo de los agrupamientos en ambas especies fueron TGC, HDL y Mg.

Para la medición de los parámetros plasmáticos, se tomaron muestras de 500 – 1000 µl de sangre directamente del corazón latiendo, las cuales fueron mantenidas en frío siguiendo las recomendaciones de bioquímico al que se le llevaron las muestras para ser analizadas con un límite de 12 hs luego de la extracción.

A partir de la información obtenida y su interpretación, en la tabla 2.11 se muestra el ranking de los parámetros más recomendados para evaluar el estado de salud de los anuros, teniendo en cuenta principalmente la variabilidad, la probabilidad de cometer un error y si hay que sacrificar al animal para realizar su medición.

ANEXO 3: TABLAS RESUMEN DE LAS PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA PARA ANÁLISIS UNIVARIADOS REALIZADOS:

Tabla 1: Tabla resumen análisis univariado para comparación de parámetros clínicos de *Leptodactylus luctator* coelctadas en el año 2016 (capítulo 3).

Parámetro clínico	n	Grados libertad	Estadístico de prueba	Valor del estadístico	p-valor
ICC	82	3	F	9.92	0.000013
IHS	82	3	H	32.07	0
ICG	82	3	H	29.95	0
IGS	82	3	H	2.9	0.4073
Hematocrito	77	3	F	18.43	0
RGR	80	3	F	4.1	0.0093
Hemoglobina	76	3	F	18.57	0
VCM	79	3	H	20.95	0.0001
HCM	79	3	H	7.21	0.0653
CHCM	76	3	H	22.46	0.0001
GST hígado	80	3	H	33.42	0
CAT hígado	80	3	H	19.99	0.0002
AChE hígado	80	3	H	2.73	0.4343
GST riñón	80	3	H	3.82	0.2808
CAT riñón	77	3	H	25.02	0
GST músculo	81	3	H	2.98	0.3943
AChE músculo	81	3	H	1.69	0.6385
AChE plasma	69	3	H	16.46	0.0009
GST plasma	73	3	H	8.57	0.0355
Neutrófilos	82	3	H	29.6	0
Eosinófilos	82	3	H	26.25	0
Basófilos	82	3	H	28.85	0
Monocitos	81	3	H	8.31	0.04
Linfocitos	82	3	H	42.09	0
N:L	77	3	H	34.18	0
RTGB	82	3	F	1.13	0.2751
RTT	82	3	H	13.72	0.0033
MNs	82	3	H	19.12	0.0003
Anuel	82	3	H	36.1	0

F: corresponde al estadístico de prueba para el test de AVOVA. H: corresponde al estadístico de prueba para el test de Kruskal-Wallis

Tabla 2: Tabla resumen análisis univariado para comparación de parámetros clínicos de *Leptodactylus luctator* coelctadas en el año 2017 (capítulo 4 – escenario 2).

Parámetro clínico	n	Grados libertad	Estadístico de prueba	Valor del estadístico	p-valor
ICC	72	3	F	5.24	0.0025
IHS	72	3	H	7.58	0.05
ICG	49	3	H	7.61	0.05
IGS	72	3	H	2.87	0.41
Hematocrito	72	3	F	6.27	0.0008
RGR	72	3	F	6.41	0.0006
Hemoglobina	72	3	F	2.96	0.038
VCM	72	3	H	19.86	0.0002
HCM	72	3	H	14.83	0.002
CHCM	72	3	F	1.77	0.161
GST hígado	71	3	F	1.41	0.244
CAT hígado	70	3	H	0.93	0.817
AChE hígado	71	3	H	12.2	0.006
GST riñón	68	3	H	9.16	0.027
CAT riñón	68	3	H	8.7	0.03
GST músculo	66	3	F	4.64	0.005
AChE músculo	67	3	H	9.64	0.021
AChE plasma	58	3	H	2.81	0.4212
GST plasma	63	3	H	4.36	0.2244
Neutrófilos	71	3	H	2.47	0.4805
Eosinófilos	70	3	H	8.5	0.0367
Basófilos	71	3	H	1.34	0.7189
Monocitos	69	3	H	3.15	0.3685
Linfocitos	71	3	H	0.84	0.8392
N:L	69	3	H	2.31	0.5104
RTGB	71	3	H	9.38	0.0246
RTT	71	3	H	7.66	0.0534
MNs	71	3	H	3.34	0.34
Anucl	71	3	H	7.08	0.0692

F: corresponde al estadístico de prueba para el test de AVOVA. H: corresponde al estadístico de prueba para el test de Kruskal-Wallis

Tabla 3: Tabla resumen análisis univariado para comparación de parámetros clínicos de *Leptodactylus luctator* colectadas en el año 2017 (capítulo 4 – escenario 3).

Parámetro clínico	n	Grados libertad	Estadístico de prueba	Valor del estadístico	p-valor
ICC	39	2	F	1.35	0.2692
IHS	39	2	F	0.17	0.9103
IGS	39	2	H	4.74	0.0933
Hematocrito	39	2	F	3.92	0.0287
RGR	39	2	F	13.82	0.00003

VCM	39	2	F	7.73	0.0016
Neutrófilos	39	2	H	18.87	0.0001
Eosinófilos	39	2	H	19.56	0.0001
Basófilos	39	2	H	3.03	0.2194
Monocitos	39	2	H	5.11	0.0774
Linfocitos	39	2	H	1.17	0.5552
N:L	39	2	H	11.82	0.0027
RTGB	39	2	H	4.52	0.1039
RTT	39	2	H	1.74	0.4172
Anucl	39	2	H	6.05	0.0486
LDH	22	2	H	4.49	0.1055
CPK	24	2	H	1.53	0.4637
TGP	20	2	F	4.32	0.0303
TGO	25	2	H	4.22	0.1211
FA	24	2	H	1.56	0.4582
PT	25	2	H	1.23	0.5395
Alb	24	2	H	2.36	0.307
Glob	24	2	H	1.03	0.5948
A/G	24	2	H	1.72	0.4229
COL	25	2	H	1.11	0.5734
TGC	23	2	H	4.15	0.1255
HDL	25	2	H	11.26	0.0036
LDL	24	2	H	0.31	0.8563
VLDL	24	2	H	7.12	0.0283
Ca	24	2	H	3.44	0.1785
P	23	2	H	3.5	0.1733
Mg	24	2	H	10.1	0.006
Creat	24	2	H	0.31	0.8558
Urea	26	2	H	1.99	0.3681
Ami	24	2	H	7.55	0.0229

F: corresponde al estadístico de prueba para el test de AVOVA. H: corresponde al estadístico de prueba para el test de Kruskal-Wallis

Tabla 4: Tabla resumen análisis univariado para comparación de parámetros clínicos de *Rhinella arenarum* colectados en el año 2017 (capítulo 4 – escenario 4).

Parámetro clínico	n	Grados libertad	Estadístico de prueba	Valor del estadístico	p-valor
ICC	33	2	F	19.6	0.0000004
IHS	33	2	H	10.97	0.0041
ICG	26	2	H	14.4	0.0007
IGS	33	2	F	5.12	0.0122
Hematocrito	33	2	H	13.36	0.0013
RGR	33	2	F	18.76	0.000005
Hemoglobina	33	2	F	18.79	0.000006
VCM	33	2	H	11.07	0.0039

HCM	32	2	H	7.98	0.0185
CHCM	33	2	H	8.51	0.0142
Neutrófilos	31	2	H	0.58	0.7464
Eosinófilos	33	2	H	3.2	0.2011
Basófilos	33	2	H	6.92	0.0313
Monocitos	33	2	H	8.6	0.0135
Linfocitos	33	2	F	2.47	0.1013
N:L	33	31	H	1.06	0.5866
RTGB	33	2	H	1.53	0.4645
RTT	33	2	F	0.004	0.9953
MNs	33	2	H	2.62	0.2691
Anucl	33	2	H	10.36	0.0056

F: corresponde al estadístico de prueba para el test de AVOVA. H: corresponde al estadístico de prueba para el test de Kruskal-Wallis

Tabla 5: Tabla resumen análisis univariado para comparación de parámetros clínicos de *Rhinella arenarum* colectados en el año 2018 (capítulo 4 – escenario 5).

Parámetro clínico	n	Grados libertad	Estadístico de prueba	Valor del estadístico	p-valor
ICC	37	2	F	5.77	0.0069
IHS	37	2	F	1.89	0.1658
ICG	28	2	H	0.18	0.9095
IGS	37	2	H	0.28	0.8689
Hematocrito	37	2	F	0.11	0.8904
RGR	37	2	H	0.12	0.9409
Hemoglobina	37	2	F	0.16	0.8515
VCM	37	2	F	0.07	0.9321
HCM	37	2	F	0.32	0.7257
CHCM	37	2	F	0.33	0.7148
Neutrófilos	37	2	H	6.87	0.0322
Eosinófilos	37	2	H	9.06	0.0107
Basófilos	37	2	H	24.06	0.000001
Monocitos	37	2	H	9.65	0.008
Linfocitos	37	2	H	5.09	0.0784
N:L	37	2	H	6.76	0.034
RTGB	37	2	F	4.85	0.0139
RTT	37	2	H	2.51	0.2849

F: corresponde al estadístico de prueba para el test de AVOVA. H: corresponde al estadístico de prueba para el test de Kruskal-Wallis

Tabla 6: Tabla resumen análisis univariado para comparación de parámetros clínicos de *Rhinella arenarum* colectados en el año 2019 (capítulo 4 – escenario 6).

Parámetro clínico	n	Grados libertad	Estadístico de prueba	Valor del estadístico	p-valor
ICC	31	2	F	0.88	0.4246
IHS	31	2	F	27.77	0.00000001
IGS	31	2	F	0.09	0.9081
Hematocrito	29	2	H	9.87	0.0072
RGR	31	2	F	4.46	0.0207
VCM	29	2	F	0.65	0.5265
Neutrófilos	31	2	H	9.55	0.0084
Eosinófilos	31	2	F	0.32	0.7258
Basófilos	31	2	H	1.73	0.4202
Monocitos	31	2	H	5.49	0.0642
Linfocitos	31	2	F	4.61	0.0185
N:L	31	2	H	10.44	0.0054
RTGB	31	2	H	1.2	0.547
RTT	31	2	H	0.16	0.9197
LDH	28	2	H	3.45	0.1779
CPK	29	2	H	2.03	0.3618
TGP	28	2	F	0.47	0.6286
TGO	28	2	H	4.81	0.0901
FA	28	2	H	4.11	0.1278
PT	29	2	F	14.36	0.000063
Alb	29	2	F	14.28	0.000065
Glob	29	2	F	8.11	0.0018
A/G	29	2	F	1.88	0.1723
COL	28	2	F	5.03	0.0145
TGC	28	2	H	6.09	0.0474
HDL	29	2	F	1.8	0.1846
LDL	28	2	H	3.45	0.1773
VLDL	26	2	H	5.13	0.0769
Ca	29	2	F	0.47	0.6259
P	26	2	F	0.43	0.6536
Mg	29	2	H	0.78	0.6755
Creat	28	2	H	0.35	0.8383
Urea	29	2	H	12.49	0.0019
Ami	29	2	F	0.32	0.7221

F: corresponde al estadístico de prueba para el test de AVOVA. H: corresponde al estadístico de prueba para el test de Kruskal-Wallis

ANEXO 4: SALIDA DEL PROGRAMA R CON EL DETALLE DE LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS QUE NO SE MUESTRAN EN LOS CAPÍTULOS 3 Y 4.

Datos: *Leptodactylus luctator* – año 2016 (Capítulo 3)

Descripción de los datos

```
## [1] "Descriptores categóricos"
```

##		Level	N	%
## 1	SPP	L1	82	100.0
## 2	AÑO	2016	82	100.0
## 3	SITIO	CFH1	19	23.2
## 4		DC1	11	13.4
## 5		IP1	19	23.2
## 6		SR1	33	40.2
## 7	ES Afectado		45	54.9
## 8		Normal	37	45.1

```
## [1] "Descriptores cuantitativos"
```

	N	Missing	Mean	SD	Min	Q1	Median	Q3	Max
ICC 6	82	0	0.11	0.02	0.06	0.09	0.11	0.12	0.1
IHS 6	82	0	0.02	0.01	0.00	0.02	0.02	0.03	0.0
ICG 3	82	0	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.0
IGS 9	82	0	0.05	0.07	0.00	0.00	0.01	0.06	0.2
Hto 0	77	5	28.65	7.79	14.00	23.50	28.00	34.00	55.0
RGR 9	80	2	1.02	0.34	0.32	0.84	1.02	1.21	2.0
Hb	80	2	8.77	2.61	2.20	6.81	8.32	10.79	16.40
VCM	76	6	302.39	128.67	112.44	218.96	266.90	362.27	714.29
HCM	79	3	92.53	33.11	22.70	69.20	87.60	109.50	197.00
CHCM 8	76	6	32.19	10.86	6.39	26.34	30.94	37.56	71.6
GST H 7	80	2	8.10	3.95	1.50	5.37	7.05	10.10	18.7
CAT H 6	80	2	1271.09	475.32	486.70	921.48	1253.93	1464.36	2895.0
ACHe H 6	80	2	13.79	6.17	4.54	9.30	12.20	17.01	30.0
GST R 1	80	2	2.19	0.81	1.05	1.68	2.02	2.47	6.5
CAT R	77	5	289.65	165.01	53.22	196.96	271.57	333.21	1112.3

3	GST M	81	1	0.03	0.02	0.00	0.02	0.03	0.04	0.0
9	AChE M	81	1	6.22	4.01	1.21	3.13	5.42	8.48	17.7
4	AChE P	69	13	8.81	4.13	1.68	6.20	8.35	10.57	22.
51	GST P	73	9	0.02	0.02	0.00	0.01	0.02	0.03	0.0
9	Neu	82	0	13.90	12.03	1.00	5.41	9.20	18.00	52.8
3	Eos	82	0	4.48	5.41	0.00	0.00	2.07	6.45	20.4
3	Bas	82	0	6.89	6.30	0.00	2.00	5.00	9.71	27.2
7	Mon	81	1	4.08	3.31	0.00	1.00	3.85	6.00	13.0
0	Lin	82	0	70.24	18.74	28.57	55.84	71.71	88.00	96.0
0	N:L	78	4	0.21	0.22	0.01	0.05	0.11	0.29	0.8
8	RTGB	82	0	0.04	0.01	0.01	0.04	0.04	0.05	0.1
0	RTT	82	0	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.02	0.0
5										

Descriptores Cuantitativas

Caracterización de los sitios según los descriptores cuantitativos

CFH1	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
ICG	4.606777	0.01486759	0.00405092	0.010035656	0.008386357	4.09E-06
Hb	4.011583	10.84781579	8.7621563	1.78105925	2.563432773	6.03E-05
Hto	2.694538	32.73684211	28.64935065	6.211975745	7.497586984	7.05E-03
Bas	2.263506	9.75730217	6.8904486	7.623802156	6.259987581	2.36E-02
Lin	-2.01648	62.64197217	70.24155117	17.01991981	18.627072	4.37E-02
GST plasma	-2.087198	0.01614918	0.023739	0.010568986	0.017972844	3.69E-02
IHS	-2.572082	0.01885766	0.02343661	0.004233125	0.008798943	1.01E-02

DC1	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
IHS	6.292	0.039	0.02343	8.75E-03	8.80E-03	3.13E-10
GST hígado	5.6081	14.2337	8.1025	3.5845	3.8728	2.04E-08
RTT	4.6534	0.0299	0.0169	1.28E-02	9.90E-03	3.26E-06
Hto	4.4395	38.0454	28.64	7.9242	7.4975	9.02E-06
VCM	2.9337	404.307	302.392	1.04E+02	123.0596	3.35E-03
Eos	2.4593	8.2159	4.4799	5.9655	5.3815	1.39E-02
GST plasma	2.0235	0.034	0.0237	2.35E-02	1.80E-02	4.30E-02
ICG	2.0188	0.0118	0.007	7.96E-03	8.39E-03	4.35E-02
GST riñón	1.968	2.6327	2.1912	1.0539	7.95E-01	4.91E-02

AChE plasma	-3.263623	5.3386	8.8055	2.002	3.7631	1.10E-03
CHCM	-3.389902	22.2498	32.1879	9.9814	10.38553	6.99E-04

IP1	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
N:l	4.7697	4.15E-01	2.11E-01	2.49E-01	2.12E-01	1.84E-06
CHCM	3.969066	4.05E+01	3.22E+01	1.31E+01	1.04E+01	7.22E-05
Neu	3.487418	2.23E+01	1.39E+01	9.61E+00	1.20E+01	4.88E-04
Hb	2.646039	1.01E+01	8.77E+00	2.37E+00	2.56E+00	8.14E-03
Mon	2.571178	5.78E+00	4.08E+00	3.65E+00	3.26E+00	1.01E-02
RGR	2.369675	1.18E+00	1.02E+00	3.17E-01	3.32E-01	1.78E-02
Bas	2.360961	9.88E+00	6.89E+00	6.25E+00	6.26E+00	1.82E-02
Eos	2.076512	6.74E+00	4.48E+00	5.27E+00	5.38E+00	3.78E-02
IHS	-2.045889	1.98E-02	2.34E-02	5.31E-03	8.80E-03	4.08E-02
Hto	-2.53931	2.48E+01	2.86E+01	5.26E+00	7.50E+00	1.11E-02
ICG	-2.691014	2.48E-03	7.05E-03	3.94E-03	8.39E-03	7.12E-03
CAT hígado	-2.715299	1.01E+03	1.27E+03	3.88E+02	4.67E+02	6.62E-03
CAT riñón	-3.241747	1.85E+02	2.90E+02	5.62E+01	1.59E+02	1.19E-03
VCM	-3.328974	2.20E+02	3.02E+02	5.60E+01	1.23E+02	8.72E-04
GST hígado	-3.767089	5.15E+00	8.10E+00	1.84E+00	3.87E+00	1.65E-04
Lin	-3.976406	5.53E+01	7.02E+01	1.29E+01	1.86E+01	7.00E-05

SR1	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
Lin	6.223758	8.59E+01	7.02E+01	8.12E+00	1.86E+01	4.85E-10
CAT hígado	4.125641	1.53E+03	1.27E+03	4.79E+02	4.67E+02	3.70E-05
CAT riñón	2.349787	3.40E+02	2.90E+02	2.08E+02	1.59E+02	1.88E-02
AChE plasma	2.336374	1.00E+01	8.81E+00	3.87E+00	3.76E+00	1.95E-02
Mon	-2.650688	2.91E+00	4.08E+00	2.40E+00	3.26E+00	8.03E-03
RGR	-2.656433	9.05E-01	1.02E+00	3.12E-01	3.32E-01	7.90E-03
ICG	-3.051312	3.59E-03	7.05E-03	4.47E-03	8.39E-03	2.28E-03
Hto	-3.218921	2.54E+01	2.86E+01	4.73E+00	7.50E+00	1.29E-03
Neu	-4.267758	6.99E+00	1.39E+01	5.98E+00	1.20E+01	1.97E-05
Eos	-4.526503	1.18E+00	4.48E+00	1.62E+00	5.38E+00	6.00E-06
N:L	-4.544325	8.02E-02	2.11E-01	6.41E-02	2.12E-01	5.51E-06
Bas	-4.831021	2.80E+00	6.89E+00	2.12E+00	6.26E+00	1.36E-06
Hb	-4.906638	7.06E+00	8.77E+00	1.48E+00	2.56E+00	9.27E-07

Descriptores Categóricas

Relación entre los sitios y el estado de salud

##	p.value		df			
## ESTADO	2.949444e-10	3				
## \$CFH1						
##	Cla/Mod	Mod/Cla	Global	p.value	v.test	
## ESTADO=Afectado	33.33333	78.94737	54.87805	0.01746617	2.376745	
## ESTADO=Normal	10.81081	21.05263	45.12195	0.01746617	-2.376745	

```

##
## $DC1
##           Cla/Mod  Mod/Cla  Global  p.value  v.test
## ESTADO=Afectado 22.22222 90.909091 54.87805 0.009879487 2.580019
## ESTADO=Normal   2.702703  9.090909 45.12195 0.009879487 -2.580019
##
## $IP1
##           Cla/Mod  Mod/Cla  Global  p.value  v.test
## ESTADO=Afectado 37.777778 89.47368 54.87805 0.0004396139 3.515085
## ESTADO=Normal   5.405405 10.52632 45.12195 0.0004396139 -3.515085
##
## $SR1
##           Cla/Mod  Mod/Cla  Global  p.value  v.test
## ESTADO=Normal  81.081081 90.909091 45.12195 1.67486e-12 7.059182
## ESTADO=Afectado 6.666667  9.090909 54.87805 1.67486e-12 -7.059182

##           p.value df
## SITIO 2.949444e-10 3

## $Afectado
##           Cla/Mod  Mod/Cla  Global  p.value  v.test
## SITIO=IP1  89.473684 37.777778 23.17073 4.396139e-04 3.515085
## SITIO=DC1  90.909091 22.222222 13.41463 9.879487e-03 2.580019
## SITIO=CFH1 78.947368 33.333333 23.17073 1.746617e-02 2.376745
## SITIO=SR1  9.090909  6.666667 40.24390 1.674860e-12 -7.059182
##
## $Normal
##           Cla/Mod  Mod/Cla  Global  p.value  v.test
## SITIO=SR1  90.909091 81.081081 40.24390 1.674860e-12 7.059182
## SITIO=CFH1 21.052632 10.810811 23.17073 1.746617e-02 -2.376745
## SITIO=DC1  9.090909  2.702703 13.41463 9.879487e-03 -2.580019
## SITIO=IP1 10.526316  5.405405 23.17073 4.396139e-04 -3.515085

```

Análisis multivariados

Análisis de Componentes principales

```

## Class: pca dudi
## Call: dudi.pca(df = select_if(data_new, is.numeric), scannf = FALSE
)
##
## Total inertia: 27
##
## Eigenvalues:
##      Ax1      Ax2      Ax3      Ax4      Ax5
##  5.097   3.428   2.931   2.030   1.743
##
## Projected inertia (%):
##      Ax1      Ax2      Ax3      Ax4      Ax5
## 18.877 12.696 10.855  7.517  6.454
##
## Cumulative projected inertia (%):
##      Ax1  Ax1:2  Ax1:3  Ax1:4  Ax1:5
## 18.88  31.57  42.43  49.94  56.40

```

```

##
## (Only 5 dimensions (out of 27) are shown)

## Inertia information:
## Call: inertia.dudi(x = hs3)
##
## Decomposition of total inertia:
##      inertia      cum  cum(%)
## Ax1  5.096859   5.097  18.88
## Ax2  3.427837   8.525  31.57
## Ax3  2.930872  11.456  42.43
## Ax4  2.029546  13.485  49.94
## Ax5  1.742647  15.228  56.40
## Ax6  1.465517  16.693  61.83
## Ax7  1.262620  17.956  66.50
## Ax8  1.249859  19.206  71.13
## Ax9  0.979280  20.185  74.76
## Ax10 0.936832  21.122  78.23
## Ax11 0.841921  21.964  81.35
## Ax12 0.816891  22.781  84.37
## Ax13 0.641810  23.422  86.75
## Ax14 0.602563  24.025  88.98
## Ax15 0.548928  24.574  91.01
## Ax16 0.464978  25.039  92.74
## Ax17 0.390813  25.430  94.18
## Ax18 0.311099  25.741  95.34
## Ax19 0.273962  26.015  96.35
## Ax20 0.249534  26.264  97.28
## Ax21 0.227234  26.492  98.12
## Ax22 0.178480  26.670  98.78
## Ax23 0.124936  26.795  99.24
## Ax24 0.090091  26.885  99.57
## Ax25 0.078860  26.964  99.87
## Ax26 0.030005  26.994  99.98
## Ax27 0.006027  27.000 100.00

```

Homogeneidad de varianzas entre grupos

```

## Analysis of Variance Table
##
## Response: Distances
##      Df  Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## Groups    3  333346  111115  1.4668 0.2301
## Residuals 78 5908608   75751

##
## Permutation test for homogeneity of multivariate dispersions
## Permutation: free
## Number of permutations: 99
##
## Response: Distances
##      Df  Sum Sq Mean Sq      F N.Perm Pr(>F)
## Groups    3  333346  111115  1.4668    99  0.18
## Residuals 78 5908608   75751

##

```

```

## Pairwise comparisons:
## (Observed p-value below diagonal, permuted p-value above diagonal)
##           CFH1      DC1      IP1  SR1
## CFH1           0.69000 0.80000 0.21
## DC1  0.67390           0.93000 0.18
## IP1  0.77910 0.92300           0.12
## SR1  0.19052 0.16729 0.13646

## Tukey multiple comparisons of means
## 95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = distances ~ group, data = df)
##
## $group
##           diff           lwr           upr           p adj
## DC1-CFH1 -31.815348 -305.56929 241.9386 0.9900658
## IP1-CFH1 -23.001846 -257.43071 211.4270 0.9939599
## SR1-CFH1 112.277875 -95.80713 320.3629 0.4929658
## IP1-DC1   8.813502 -264.94044 282.5674 0.9997817
## SR1-DC1 144.093224 -107.46929 395.6557 0.4402041
## SR1-IP1 135.279721 -72.80529 343.3647 0.3271643

```

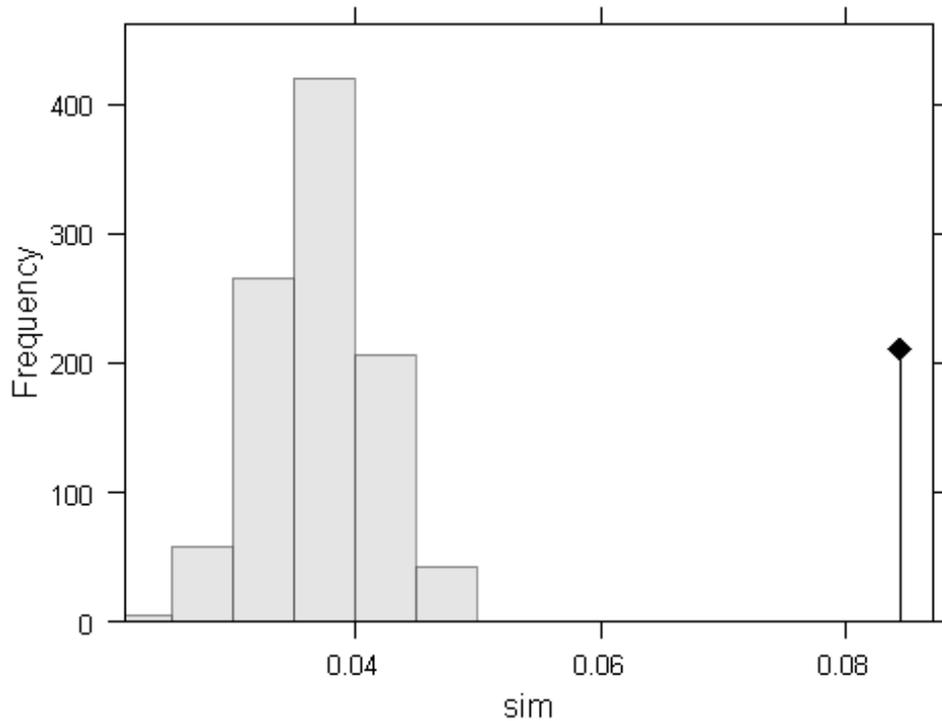
Diferencia entre grupos

```

##
## Call:
## adonis(formula = dist(data_ade4_imp) ~ data_new$SITIO, data = iris, m
##        ethod = "euclidean")
##
## Permutation: free
## Number of permutations: 999
##
## Terms added sequentially (first to last)
##
##           Df SumsOfSqs MeanSqs F.Model      R2 Pr(>F)
## data_new$SITIO 3  4667083 1555694  7.2901 0.21899 0.001 ***
## Residuals    78 16645060  213398           0.78101
## Total        81 21312144
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

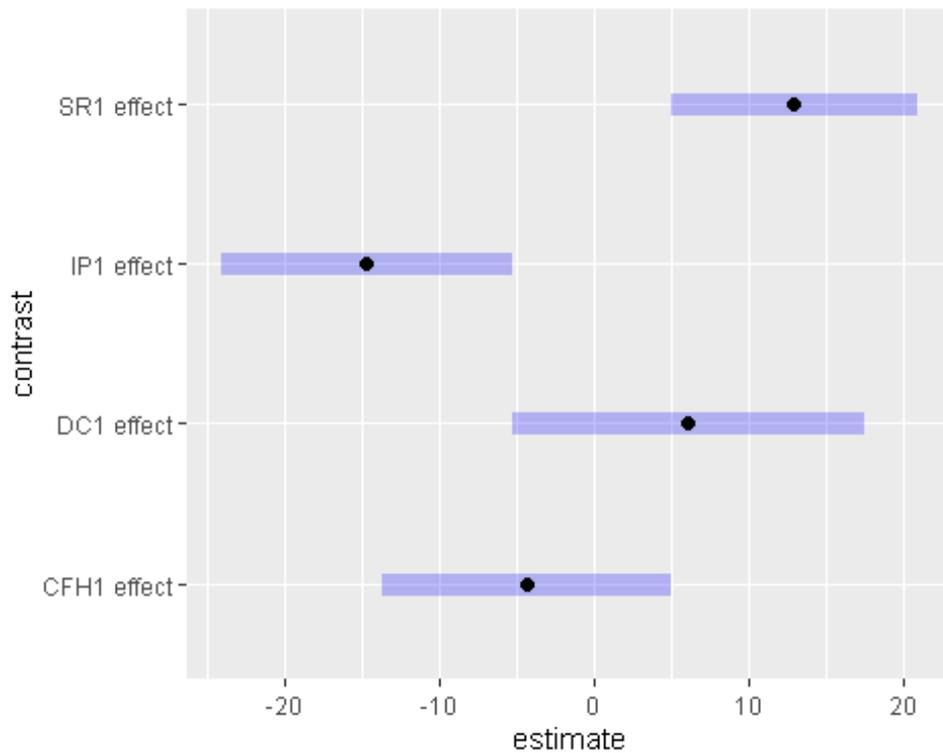
Histogram of sim



```
##           Df   Wilks approx F num Df den Df   Pr(>F)
## data_new$SITIO 3 0.011034  6.7822    81 156.4 < 2.2e-16 ***
## Residuals      78
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

## contrast  estimate  SE df t.ratio p.value
## CFH1 - DC1  -10.44  6.90 78 -1.512  0.4353
## CFH1 - IP1   10.31  5.91 78  1.744  0.3085
## CFH1 - SR1  -17.31  5.25 78 -3.300  0.0078
## DC1 - IP1   20.74  6.90 78  3.005  0.0184
## DC1 - SR1   -6.88  6.34 78 -1.084  0.7002
## IP1 - SR1  -27.62  5.25 78 -5.264 <.0001
##
## Results are averaged over the levels of: rep.meas
## Note: contrasts are still on the as.matrix scale
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates

## contrast  estimate  SE df t.ratio p.value
## CFH1 effect  -4.36  3.67 78 -1.190  0.2377
## DC1 effect    6.08  4.45 78  1.366  0.2345
## IP1 effect   -14.67  3.67 78 -4.002  0.0003
## SR1 effect   12.95  3.12 78  4.153  0.0003
##
## Results are averaged over the levels of: rep.meas
## P value adjustment: fdr method for 4 tests
```



Funciones discriminantes e importancia de la variable

##	DS1	DS2	DS3
## Lin	-0.98569430	-0.743298162	-3.24168255
## Neu	-0.45151656	-0.278596696	-2.24262125
## Hb	0.42288572	0.154947425	0.33782652
## Mon	-0.41715314	-0.113391122	-0.36603312
## ICG	0.35308936	0.244249144	0.39268038
## Eos	-0.35088116	-0.153790409	-1.18446578
## IHS	-0.33875773	0.259376437	-0.44870754
## HCM	-0.32696550	0.038651320	-0.32570341
## RTT	-0.27098545	0.161146016	-0.09224868
## GST M	0.20438036	0.200234951	0.14659082
## CHCM	0.18485527	-0.110772661	0.05096719
## VCM	0.17383093	-0.003106927	0.09009142
## RGR	-0.16725363	-0.049488862	-0.29142261
## N:L	0.16394445	-0.054744646	-0.34558812
## CAT R	-0.16321704	0.122642801	0.19492986
## Bas	-0.16278958	-0.083727670	-1.25893649
## CAT H	-0.15478752	-0.264272612	0.29982105
## GST H	-0.14115180	0.260724484	0.17043666
## GST R	0.13905893	-0.069360725	-0.04285440
## AChE H	0.12378223	0.088216687	-0.29525370
## AChE M	-0.07518421	-0.172586875	-0.01210078
## RTGB	0.07386567	-0.058370257	0.12334261
## Hto	-0.07272665	0.171305071	0.26579729
## GST P	-0.07215458	0.017872972	-0.04874255
## IGS	0.03928735	0.140323040	0.19954193
## AChE P	-0.02454170	-0.188968857	-0.08422882
## ICC	-0.01754901	-0.074067031	0.22889499
##	DS1	DS2	DS3
## Lin	-0.98569430	-0.743298162	-3.24168255
## Neu	-0.45151656	-0.278596696	-2.24262125

## CAT H	-0.15478752	-0.264272612	0.29982105
## GST H	-0.14115180	0.260724484	0.17043666
## IHS	-0.33875773	0.259376437	-0.44870754
## ICG	0.35308936	0.244249144	0.39268038
## GST M	0.20438036	0.200234951	0.14659082
## AChE P	-0.02454170	-0.188968857	-0.08422882
## AChE M	-0.07518421	-0.172586875	-0.01210078
## Hto	-0.07272665	0.171305071	0.26579729
## RTT	-0.27098545	0.161146016	-0.09224868
## Hb	0.42288572	0.154947425	0.33782652
## Eos	-0.35088116	-0.153790409	-1.18446578
## IGS	0.03928735	0.140323040	0.19954193
## CAT R	-0.16321704	0.122642801	0.19492986
## Mon	-0.41715314	-0.113391122	-0.36603312
## CHCM	0.18485527	-0.110772661	0.05096719
## AChE H	0.12378223	0.088216687	-0.29525370
## Bas	-0.16278958	-0.083727670	-1.25893649
## ICC	-0.01754901	-0.074067031	0.22889499
## GST R	0.13905893	-0.069360725	-0.04285440
## RTGB	0.07386567	-0.058370257	0.12334261
## N:L	0.16394445	-0.054744646	-0.34558812
## RGR	-0.16725363	-0.049488862	-0.29142261
## HCM	-0.32696550	0.038651320	-0.32570341
## GST P	-0.07215458	0.017872972	-0.04874255
## VCM	0.17383093	-0.003106927	0.09009142

##	DS1	DS2	DS3
## Lin	-0.98569430	-0.743298162	-3.24168255
## Neu	-0.45151656	-0.278596696	-2.24262125
## Bas	-0.16278958	-0.083727670	-1.25893649
## Eos	-0.35088116	-0.153790409	-1.18446578
## IHS	-0.33875773	0.259376437	-0.44870754
## ICG	0.35308936	0.244249144	0.39268038
## Mon	-0.41715314	-0.113391122	-0.36603312
## N:L	0.16394445	-0.054744646	-0.34558812
## Hb	0.42288572	0.154947425	0.33782652
## HCM	-0.32696550	0.038651320	-0.32570341
## CAT H	-0.15478752	-0.264272612	0.29982105
## AChE H	0.12378223	0.088216687	-0.29525370
## RGR	-0.16725363	-0.049488862	-0.29142261
## Hto	-0.07272665	0.171305071	0.26579729
## ICC	-0.01754901	-0.074067031	0.22889499
## IGS	0.03928735	0.140323040	0.19954193
## CAT R	-0.16321704	0.122642801	0.19492986
## GST H	-0.14115180	0.260724484	0.17043666
## GST M	0.20438036	0.200234951	0.14659082
## RTGB	0.07386567	-0.058370257	0.12334261
## RTT	-0.27098545	0.161146016	-0.09224868
## VCM	0.17383093	-0.003106927	0.09009142
## AChE P	-0.02454170	-0.188968857	-0.08422882
## CHCM	0.18485527	-0.110772661	0.05096719
## GST P	-0.07215458	0.017872972	-0.04874255
## GST R	0.13905893	-0.069360725	-0.04285440
## AChE M	-0.07518421	-0.172586875	-0.01210078

Datos: *Leptodactylus luctator* – año 2017 (capítulo 4 – escenario 2)

Descripción de los datos

[1] "Descriptores categóricos"

##		Level	N	%
## 1	SPP	L1	72	100.0
## 2	AÑO	2017	72	100.0
## 3	SITIO	CFH1	14	19.4
## 4		DC2	17	23.6
## 5		IP2	24	33.3
## 6		SR2	17	23.6
## 7	ES Afectado		41	56.9
## 8		Normal	31	43.1

[1] "Descriptores cuantitativos"

	N	Missing	Mean	SD	Min	Q1	Median	Q3	Max
ICC	72	0	0.11	0.02	0.08	0.10	0.11	0.12	0.15
IHS	72	0	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.04
ICG	49	23	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.03
IGS	72	0	0.05	0.08	0.00	0.00	0.00	0.09	0.23
Hto	72	0	35.72	7.70	20.00	30.75	34.75	40.25	58.00
RGR	72	0	0.89	0.25	0.28	0.75	0.87	1.03	1.86
Hb	71	1	6.00	1.47	2.06	5.03	5.94	6.81	9.49
VCM	72	0	427.20	135.47	259.26	346.63	389.05	480.18	1140.35
HCM	71	1	72.02	22.90	37.10	57.75	68.80	76.95	176.00
CHCM	71	1	17.10	3.33	7.50	15.24	16.56	19.36	28.77
GST H	71	1	5.28	2.36	0.92	3.76	4.95	6.45	14.03
CAT H	70	2	791.20	259.77	274.48	612.87	736.90	983.03	1621.91
ACHe H	71	1	11.82	3.86	5.56	9.05	11.26	14.03	23.56
GST R	68	4	2.99	1.26	0.83	2.12	2.78	3.69	6.32
CAT R	68	4	697.30	239.43	301.27	495.45	659.82	846.22	1333.82
GST M	66	6	0.09	0.02	0.03	0.07	0.09	0.10	0.15
ACHe M	67	5	15.62	5.90	5.37	11.14	15.03	19.47	33.30
ACHe P	58	14	9.60	2.99	1.70	7.97	9.04	10.94	18.82
GST P	63	9	0.02	0.02	0.00	0.01	0.01	0.02	0.09
Neu	71	1	10.58	8.19	1.00	5.00	8.00	14.00	42.00
Eos	70	2	3.81	3.29	0.00	1.00	3.00	5.00	15.00
Bas	71	1	2.51	4.59	0.00	0.00	0.00	4.00	29.00
Mon	69	3	3.36	2.52	0.00	2.00	3.00	5.00	13.00
Lin	71	1	78.38	11.24	41.00	73.50	80.00	85.50	98.00
N:L	69	3	0.13	0.11	0.01	0.06	0.10	0.18	0.55
RTGB	71	1	0.04	0.01	0.02	0.03	0.04	0.04	0.08
RTT	71	1	0.02	0.01	0.00	0.01	0.02	0.03	0.06

Descriptores Cuantitativas

Caracterización de los sitios según los descriptores cuantitativos

CFH1	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
VCM	4.221621	564.389993	427.204933	1.82E+02	1.35E+02	2.4255E-05
ICG	3.211816	0.01611915	0.01038803	9.82E-03	7.39E-03	0.00131899
HCM	2.948245	88.1	72.0169014	3.06E+01	2.26E+01	0.00319583
RTGB	2.689505	0.04578571	0.03809859	1.36E-02	1.18E-02	0.00715581
Eos	2.35081	5.64285714	3.81428571	2.87E+00	3.22E+00	0.01873259

Hto	2.20005	39.7857143	35.7222222	5.31E+00	7.65E+00	0.02780338
RGR	-2.055798	0.76178571	0.88527778	2.05E-01	2.49E-01	0.03980203
GST músculo	-2.475342	0.07324204	0.08624615	1.99E-02	2.17E-02	0.01331088

DC2	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
AChE hígado	2.79079	14.0857097	11.815983	4.80129641	3.80994473	0.00525796
RTT	2.379487	0.02682353	0.02108451	0.01336032	0.01129866	0.01733673
Hb	2.312114	6.71293	5.99757662	1.44713439	1.44938492	0.02077142
RTGB	-2.088475	0.03282353	0.03809859	0.00980537	0.01183234	0.03675505
GST riñón	-2.326017	2.38928341	2.99095259	0.86689142	1.21176158	0.02001765
AChE músculo	-2.411078	12.7099939	15.6180282	4.98218211	5.65015744	0.01590545

IP2	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
RGR	2.818559	1.00291667	0.88527778	0.26756197	0.2486783	0.00482397
GST plasma	2.662848	0.02648536	0.01952387	0.02230215	0.0155765	0.00774823
AChE músculo	1.991122	17.5062116	15.6180282	4.83124329	5.6501574	0.0464675
VCM	-2.449409	371.901277	427.204933	69.948705	134.526176	0.01430911
HCM	-2.753631	61.5798709	72.0169014	9.98493054	22.5831918	0.00589381
AChE hígado	-3.314125	9.69677625	11.815983	2.22657153	3.8099447	0.00091931

SR2	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
GST músculo	2.597874	0.0983068	0.08624615	2.38E-02	0.02174827	0.00938028
CAT riñón	2.522058	821.644879	697.296454	2.24E+02	230.971042	0.01166705
GST riñón	1.976437	3.50219604	2.99095259	1.26E+00	1.21176158	0.04810536
RTT	-2.156894	0.01588235	0.02108451	9.57E-03	0.01129866	0.03101396
Hb	-2.193699	5.31886	5.99757662	1.37E+00	1.44938492	0.02825706
RGR	-2.653632	0.74441176	0.88527778	1.55E-01	0.2486783	0.00796307
Hto	-3.686027	29.7058824	35.7222222	5.22E+00	7.64620861	0.00022778

Análisis multivariados

Análisis de Componentes principales

```
## Class: pca dudi
## Call: dudi.pca(df = select_if(data_new, is.numeric), scannf = FALSE)
##
## Total inertia: 27
##
## Eigenvalues:
##   Ax1   Ax2   Ax3   Ax4   Ax5
## 3.314 3.136 2.474 2.295 2.023
##
## Projected inertia (%):
##   Ax1   Ax2   Ax3   Ax4   Ax5
## 12.275 11.616 9.163 8.500 7.493
```

```

##
## Cumulative projected inertia (%):
##   Ax1   Ax1:2  Ax1:3  Ax1:4  Ax1:5
##  12.27  23.89  33.05  41.55  49.05
##
## (Only 5 dimensions (out of 27) are shown)

## Inertia information:
## Call: inertia.dudi(x = hs3)
##
## Decomposition of total inertia:
##   inertia      cum cum(%)
## Ax1  3.314132   3.314  12.27
## Ax2  3.136420   6.451  23.89
## Ax3  2.474049   8.925  33.05
## Ax4  2.294939  11.220  41.55
## Ax5  2.023191  13.243  49.05
## Ax6  1.606026  14.849  55.00
## Ax7  1.345377  16.194  59.98
## Ax8  1.294266  17.488  64.77
## Ax9  1.188965  18.677  69.18
## Ax10 1.030440  19.708  72.99
## Ax11 0.965179  20.673  76.57
## Ax12 0.901949  21.575  79.91
## Ax13 0.863175  22.438  83.10
## Ax14 0.732886  23.171  85.82
## Ax15 0.698208  23.869  88.40
## Ax16 0.633357  24.503  90.75
## Ax17 0.471633  24.974  92.50
## Ax18 0.446005  25.420  94.15
## Ax19 0.397027  25.817  95.62
## Ax20 0.336399  26.154  96.87
## Ax21 0.309639  26.463  98.01
## Ax22 0.217452  26.681  98.82
## Ax23 0.144449  26.825  99.35
## Ax24 0.079834  26.905  99.65
## Ax25 0.065349  26.970  99.89
## Ax26 0.021701  26.992  99.97
## Ax27 0.007954  27.000 100.00

```

Análisis Discriminante

Homogeneidad de varianzas entre grupos

```

## Analysis of Variance Table
##
## Response: Distances
##      Df  Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## Groups    3  133700   44567  1.5067 0.2206
## Residuals 68 2011382   29579

##
## Permutation test for homogeneity of multivariate dispersions
## Permutation: free
## Number of permutations: 99
##
## Response: Distances
##      Df  Sum Sq Mean Sq      F N.Perm Pr(>F)
## Groups    3  133700   44567  1.5067    99  0.29
## Residuals 68 2011382   29579

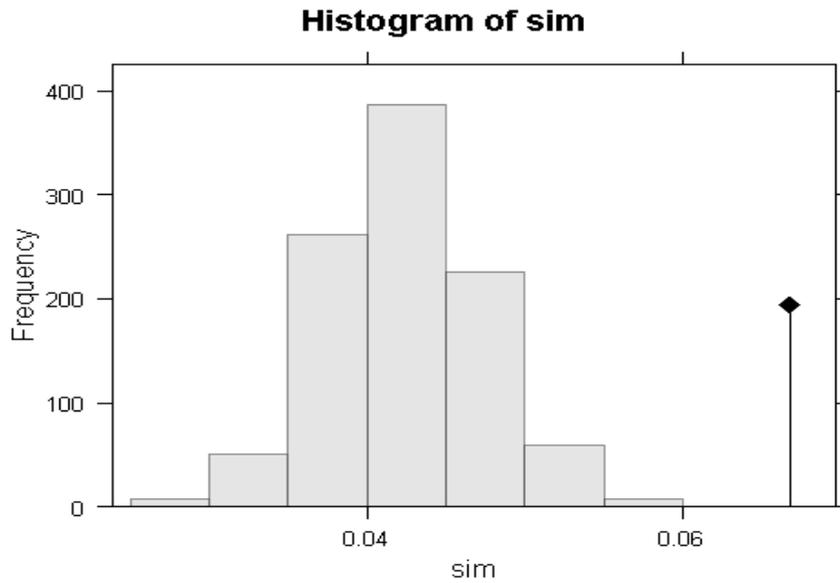
```

```
##
## Pairwise comparisons:
## (Observed p-value below diagonal, permuted p-value above diagonal)
##          CFH1      DC2      IP2  SR2
## CFH1          0.08000 0.27000 0.33
## DC2  0.08336          0.27000 0.53
## IP2  0.25096 0.23405          0.80
## SR2  0.23810 0.38120 0.80838

## Tukey multiple comparisons of means
## 95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = distances ~ group, data = df)
##
## $group
##          diff          lwr          upr      p adj
## DC2-CFH1 -131.29340 -294.76951  32.18271 0.1586382
## IP2-CFH1  -69.81086 -222.14038  82.51867 0.6245778
## SR2-CFH1  -81.02031 -244.49642  82.45580 0.5627949
## IP2-DC2    61.48254  -82.10732 205.07240 0.6738221
## SR2-DC2    50.27309 -105.09165 205.63783 0.8291893
## SR2-IP2   -11.20945 -154.79931 132.38041 0.9968957
```

Diferencia entre grupos

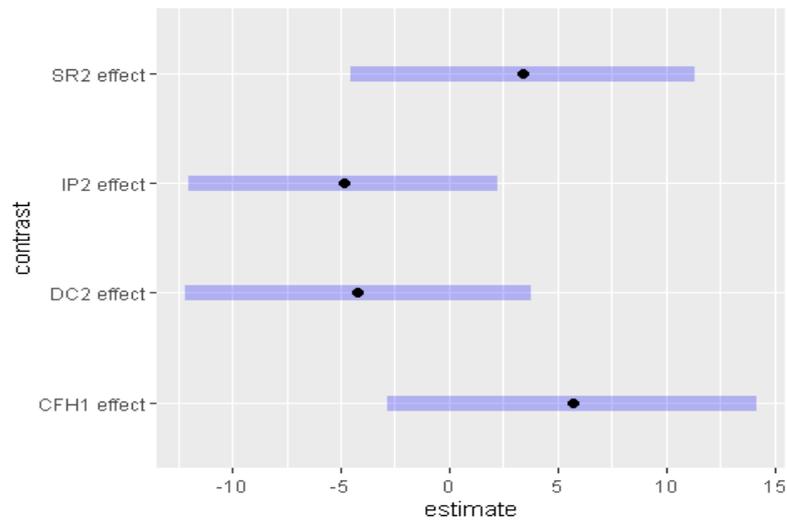
```
##
## Call:
## adonis(formula = dist(data_ade4_imp) ~ data_new$SITIO, data = iris,      m
##   etход = "euclidean")
##
## Permutation: free
## Number of permutations: 999
##
## Terms added sequentially (first to last)
##
##          Df SumsOfSqs MeanSqs F.Model      R2 Pr(>F)
## data_new$SITIO  3  1022933  340978  2.623 0.10372 0.008 **
## Residuals      68  8839684 129995          0.89628
## Total          71  9862616          1.00000
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```



```
##           Df  Wilks approx F num Df den Df  Pr(>F)
## data_new$SITIO 3 0.05901  2.4611      81 126.49 2.646e-06 ***
## Residuals      68
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

## contrast  estimate  SE df t.ratio p.value
## CFH1 - DC2    9.889 5.34 68  1.851 0.2591
## CFH1 - IP2   10.561 4.98 68  2.121 0.1568
## CFH1 - SR2    2.303 5.34 68  0.431 0.9729
## DC2 - IP2     0.672 4.69 68  0.143 0.9989
## DC2 - SR2   -7.586 5.08 68 -1.494 0.4468
## IP2 - SR2   -8.258 4.69 68 -1.759 0.3018
##
## Results are averaged over the levels of: rep.meas
## Note: contrasts are still on the as.matrix scale
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates

## contrast  estimate  SE df t.ratio p.value
## CFH1 effect    5.69 3.32 68  1.716 0.1815
## DC2 effect     -4.20 3.10 68 -1.355 0.2398
## IP2 effect     -4.87 2.78 68 -1.753 0.1815
## SR2 effect      3.39 3.10 68  1.092 0.2787
##
## Results are averaged over the levels of: rep.meas
## P value adjustment: fdr method for 4 tests
```



Funciones discriminantes e importancia de la variable

##	DS1	DS2	DS3
## Hto	0.85690796	0.54326118	-0.38420344
## CHCM	0.64068541	0.14084606	-0.87123980
## RGR	-0.59725898	-0.84387076	-0.22624479
## Neu	-0.56473168	0.37332247	0.02409280
## N:L	0.49488362	-0.66247670	-0.02662681
## GST R	-0.45315012	0.29733520	-0.11764179
## ICC	0.40591465	-0.11254747	-0.01256548
## Mon	0.40454631	0.05842811	-0.12721029
## HCM	-0.39526472	0.42919472	1.24601777
## AChE H	0.34536601	0.11686634	0.27376878
## GST H	0.31995323	-0.04532527	0.25542743
## GST P	-0.30502741	-0.18383194	-0.28877817
## Hb	-0.25073638	-0.49050741	0.39644159
## GST M	-0.21565272	0.07424976	0.18119041
## VCM	0.17790265	-0.38602604	-1.48670398
## Eos	0.17737400	0.13434972	-0.27229501
## RTT	0.16431286	-0.03984160	0.10606888
## RTGB	0.15424922	-0.13746740	-0.24358039
## CAT R	0.10473685	-0.11685371	0.02132298
## IHS	-0.10253236	-0.06721721	-0.01405112
## IGS	0.10205139	-0.35141404	-0.08023937
## AChE M	0.08155178	-0.13451485	-0.35692493
## CAT H	-0.07961962	0.07924004	0.02527435
## Lin	0.07002970	-0.41937736	-0.26811534
## ICG	-0.02872465	0.41502196	-0.23399842
## AChE P	-0.01625549	0.19063576	-0.12105324
## Bas	0.01097532	-0.31367695	-0.22826225
## RGR	-0.59725898	-0.84387076	-0.22624479
## N:L	0.49488362	-0.66247670	-0.02662681
## Hto	0.85690796	0.54326118	-0.38420344
## Hb	-0.25073638	-0.49050741	0.39644159
## HCM	-0.39526472	0.42919472	1.24601777
## Lin	0.07002970	-0.41937736	-0.26811534
## ICG	-0.02872465	0.41502196	-0.23399842
## VCM	0.17790265	-0.38602604	-1.48670398
## Neu	-0.56473168	0.37332247	0.02409280
## IGS	0.10205139	-0.35141404	-0.08023937

```

## Bas      0.01097532 -0.31367695 -0.22826225
## GST R    -0.45315012  0.29733520 -0.11764179
## AChE P   -0.01625549  0.19063576 -0.12105324
## GST P    -0.30502741 -0.18383194 -0.28877817
## CHCM     0.64068541  0.14084606 -0.87123980
## RTGB     0.15424922 -0.13746740 -0.24358039
## AChE M   0.08155178 -0.13451485 -0.35692493
## Eos      0.17737400  0.13434972 -0.27229501
## AChE H   0.34536601  0.11686634  0.27376878
## CAT R    0.10473685 -0.11685371  0.02132298
## ICC      0.40591465 -0.11254747 -0.01256548
## CAT H    -0.07961962  0.07924004  0.02527435
## GST M    -0.21565272  0.07424976  0.18119041
## IHS      -0.10253236 -0.06721721 -0.01405112
## Mon      0.40454631  0.05842811 -0.12721029
## GST H    0.31995323 -0.04532527  0.25542743
## RTT      0.16431286 -0.03984160  0.10606888

##          DS1          DS2          DS3
## VCM      0.17790265 -0.38602604 -1.48670398
## HCM      -0.39526472  0.42919472  1.24601777
## CHCM     0.64068541  0.14084606 -0.87123980
## Hb       -0.25073638 -0.49050741  0.39644159
## Hto      0.85690796  0.54326118 -0.38420344
## AChE M   0.08155178 -0.13451485 -0.35692493
## GST P    -0.30502741 -0.18383194 -0.28877817
## AChE H   0.34536601  0.11686634  0.27376878
## Eos      0.17737400  0.13434972 -0.27229501
## Lin      0.07002970 -0.41937736 -0.26811534
## GST H    0.31995323 -0.04532527  0.25542743
## RTGB     0.15424922 -0.13746740 -0.24358039
## ICG      -0.02872465  0.41502196 -0.23399842
## Bas      0.01097532 -0.31367695 -0.22826225
## RGR      -0.59725898 -0.84387076 -0.22624479
## GST M    -0.21565272  0.07424976  0.18119041
## Mon      0.40454631  0.05842811 -0.12721029
## AChE P   -0.01625549  0.19063576 -0.12105324
## GST R    -0.45315012  0.29733520 -0.11764179
## RTT      0.16431286 -0.03984160  0.10606888
## IGS      0.10205139 -0.35141404 -0.08023937
## N:L      0.49488362 -0.66247670 -0.02662681
## CAT H    -0.07961962  0.07924004  0.02527435
## Neu      -0.56473168  0.37332247  0.02409280
## CAT R    0.10473685 -0.11685371  0.02132298
## IHS      -0.10253236 -0.06721721 -0.01405112
## ICC      0.40591465 -0.11254747 -0.01256548

```

Datos: *Leptodactylus luctator* – año 2019 (capítulo 4 – escenario 3)

Descripción de los datos

```
## [1] "Descriptores categóricos"
```

```

##          Level    N    %
## 1  SPP         L1   39 100.0
## 2  AÑO         2019  39 100.0
## 3  SITIO        DC1   17  43.6
## 4                   SR3   12  30.8

```

```
## 5          SR4    10  25.6
## 6    ES Afectado  25  64.1
## 7          Normal  14  35.9
```

```
## [1] "Descriptores cuantitativos"
```

	N	Missing	Mean	SD	Min	Q1	Median	Q3
ICC 39	39	0	0.10	0.01	0.08	0.09	0.10	0.11
IHS 39	39	0	0.02	0.00	0.01	0.01	0.02	0.02
IGS 39	39	0	0.03	0.05	0.00	0.00	0.01	0.04
Hto 39	39	0	26.54	7.66	9.00	22.00	28.00	31.75
RGR 39	39	0	0.66	0.33	0.12	0.38	0.66	0.90
VCM 38	38	1	450.07	150.33	226.03	356.02	406.78	551.40
Neu 39	39	0	6.36	7.50	1.00	1.50	2.00	10.00
Eos 39	39	0	5.38	5.48	0.00	1.00	3.00	8.00
Bas 39	39	0	1.23	2.99	0.00	0.00	0.00	1.00
Mon 39	39	0	0.51	1.39	0.00	0.00	0.00	0.50
Lin 39	39	0	86.51	7.46	62.00	82.00	88.00	90.00
N:L 38	38	1	0.06	0.06	0.01	0.01	0.02	0.09
RTGB39	39	0	0.04	0.01	0.02	0.03	0.04	0.04
RTT 39	39	0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
LDH 22	22	17	5673.41	3348.90	1003.00	3114.00	4517.00	8574.00
CPK 24	24	15	9336.46	3995.46	883.00	6834.50	9744.50	12049.50
TGP 20	20	19	23.20	14.38	3.00	11.00	23.50	29.00
TGO 25	25	14	1368.32	1234.03	199.00	665.00	1032.00	1369.00
FA 24	24	15	1008.25	300.85	593.00	811.50	891.00	1263.00
PT 25	25	14	2.88	1.04	1.40	2.30	2.60	3.20
Alb 24	24	15	1.45	0.52	0.60	1.15	1.30	1.70
Glob24	24	15	1.45	0.57	0.80	1.15	1.30	1.60
A/G 24	24	15	1.03	0.18	0.67	0.90	1.08	1.17
COL 25	25	14	92.72	40.97	44.00	69.00	82.00	105.00
TGC 23	23	16	22.70	9.80	10.00	15.50	20.00	26.50
HDL 25	25	14	16.69	6.18	5.00	12.00	16.00	20.00
LDL 24	24	15	72.67	39.45	29.00	50.00	61.50	86.00
VLDL24	24	15	4.88	2.59	2.00	3.00	4.00	5.50
Ca 23	23	16	6.40	1.25	2.50	6.00	6.60	7.05
P 23	23	16	5.48	2.15	0.40	4.65	5.20	6.10
Mg 24	24	15	1.50	0.94	0.70	1.05	1.30	1.60
Creat24	24	15	0.24	0.06	0.14	0.19	0.23	0.27
Ur 26	26	13	17.77	12.85	4.00	9.00	15.50	23.00
Ami 24	24	15	730.12	307.10	187.00	493.50	718.50	989.50

Descriptores Cuantitativas

Caracterización de los sitios según los descriptores cuantitativos

DC1	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
Eos	4.096631	9.47E+00	5.38E+00	5.68E+00	5.40E+00	4.19E-05
RGR	3.966594	9.03E-01	6.64E-01	2.84E-01	3.27E-01	7.29E-05
HDL	3.112317	1.95E+01	1.67E+01	4.51E+00	4.85E+00	1.86E-03
Ami	2.79898	8.52E+02	7.30E+02	2.21E+02	2.36E+02	5.13E-03
Hto	2.205501	2.96E+01	2.65E+01	6.35E+00	7.57E+00	2.74E-02
P	-2.06518	4.87E+00	5.48E+00	1.28E+00	1.61E+00	3.89E-02
TGP	-2.153657	1.92E+01	2.32E+01	7.26E+00	1.00E+01	3.13E-02

LDH	-2.242144	4.66E+03	5.67E+03	1.46E+03	2.46E+03	2.50E-02
IGS	-2.972404	5.46E-03	3.35E-02	4.63E-03	5.10E-02	2.95E-03
VCM	-3.247294	3.62E+02	4.50E+02	1.25E+02	1.46E+02	1.17E-03
N:L	-3.330564	1.90E-02	5.78E-02	9.04E-03	6.32E-02	8.67E-04
Neu	-3.44772	1.65E+00	6.36E+00	7.62E-01	7.41E+00	5.65E-04

SR3	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
N:L	3.5104	1.12E-01	5.78E-02	7.01E-02	6.32E-02	0.00044735
Neu	3.130316	1.20E+01	6.36E+00	8.98E+00	7.41E+00	0.00174619
IGS	2.977577	7.04E-02	3.35E-02	6.60E-02	5.10E-02	0.00290537
TGP	2.38213	2.90E+01	2.32E+01	1.17E+01	1.00E+01	0.01721281
LDH	2.221314	7.00E+03	5.67E+03	3.26E+03	2.46E+03	0.02632967
TGO	2.067009	1.86E+03	1.37E+03	1.48E+03	9.68E+02	0.03873332
Ca	-2.102475	5.92E+00	6.40E+00	1.33E+00	9.38E-01	0.03551172
Hto	-2.420066	2.21E+01	2.65E+01	8.41E+00	7.57E+00	0.01551768
Ami	-2.525638	5.85E+02	7.30E+02	1.87E+02	2.36E+02	0.01154883
Eos	-3.017123	1.42E+00	5.38E+00	1.44E+00	5.40E+00	0.00255186
RGR	-3.038075	4.22E-01	6.64E-01	1.62E-01	3.27E-01	0.00238095
HDL	-3.242095	1.29E+01	1.67E+01	4.34E+00	4.85E+00	0.00118654

SR4	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
VCM	2.544223	552.983912	450.071826	1.57E+02	146.421225	0.01095212
Mg	2.480631	1.987917	1.49583333	1.169165	0.7180741	0.01311499
VLDL	2.272455	6.125	4.875	2.596873	1.9911664	0.02305905
RTGB	-2.133015	0.0305	0.03658974	4.65E-03	0.0103347	0.03292351

Análisis multivariados

Análisis de Componentes principales

```
## Class: pca dudi
## Call: dudi.pca(df = select_if(data_new, is.numeric), scannf = FALSE)
##
## Total inertia: 34
##
## Eigenvalues:
##   Ax1   Ax2   Ax3   Ax4   Ax5
## 7.340  4.293  3.723  2.791  2.121
##
## Projected inertia (%):
##   Ax1   Ax2   Ax3   Ax4   Ax5
## 21.589 12.626 10.949  8.210  6.237
##
## Cumulative projected inertia (%):
##   Ax1  Ax1:2  Ax1:3  Ax1:4  Ax1:5
## 21.59  34.21  45.16  53.37  59.61
```

```
##
## (Only 5 dimensions (out of 33) are shown)
```

```
## Inertia information:
## Call: inertia.dudi(x = hs3)
##
## Decomposition of total inertia:
##      inertia      cum cum(%)
## Ax1  7.3402499    7.34  21.59
## Ax2  4.2927471   11.63  34.21
## Ax3  3.7228270   15.36  45.16
## Ax4  2.7912896   18.15  53.37
## Ax5  2.1207234   20.27  59.61
## Ax6  1.8628492   22.13  65.09
## Ax7  1.6976848   23.83  70.08
## Ax8  1.4864351   25.31  74.46
## Ax9  1.3886987   26.70  78.54
## Ax10 1.2338725   27.94  82.17
## Ax11 1.0365851   28.97  85.22
## Ax12 0.9314774   29.91  87.96
## Ax13 0.7413375   30.65  90.14
## Ax14 0.5596611   31.21  91.78
## Ax15 0.4863578   31.69  93.21
## Ax16 0.4438991   32.14  94.52
## Ax17 0.3462405   32.48  95.54
## Ax18 0.2821509   32.77  96.37
## Ax19 0.2645340   33.03  97.15
## Ax20 0.2427160   33.27  97.86
## Ax21 0.2102348   33.48  98.48
## Ax22 0.1195962   33.60  98.83
## Ax23 0.1004498   33.70  99.13
## Ax24 0.0896517   33.79  99.39
## Ax25 0.0596947   33.85  99.56
## Ax26 0.0505407   33.90  99.71
## Ax27 0.0410766   33.94  99.83
## Ax28 0.0249814   33.97  99.91
## Ax29 0.0142001   33.98  99.95
## Ax30 0.0137293   34.00  99.99
## Ax31 0.0026157   34.00 100.00
## Ax32 0.0006391   34.00 100.00
## Ax33 0.0002531   34.00 100.00
```

Análisis Discriminante

Homogeneidad de varianzas entre grupos

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: Distances
##      Df      Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## Groups    2  36382575 18191288  2.2404 0.1211
## Residuals 36 292309990  8119722
##
## Permutation test for homogeneity of multivariate dispersions
## Permutation: free
## Number of permutations: 99
##
```

```

## Response: Distances
##           Df      Sum Sq Mean Sq      F N.Perm Pr(>F)
## Groups      2 36382575 18191288 2.2404   99  0.12
## Residuals 36 292309990 8119722
##
## Pairwise comparisons:
## (Observed p-value below diagonal, permuted p-value above diagonal)
##           DC1      SR3  SR4
## DC1           0.040000 0.58
## SR3 0.044725           0.29
## SR4 0.545742 0.252448

## Tukey multiple comparisons of means
## 95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = distances ~ group, data = df)
##
## $group
##           diff          lwr          upr          p adj
## SR3-DC1 2250.2057 -375.8775 4876.289 0.1052058
## SR4-DC1  610.5825 -2165.1780 3386.343 0.8533534
## SR4-SR3 -1639.6232 -4621.8817 1342.635 0.3807576

```

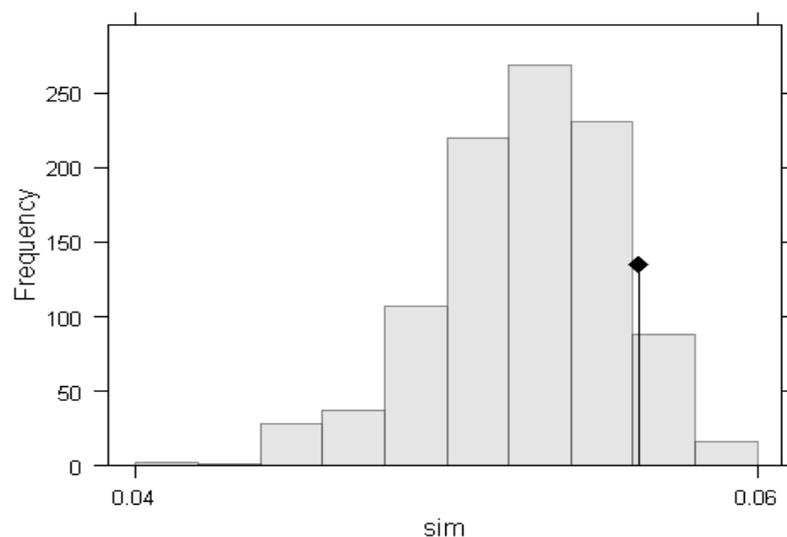
Diferencia entre grupos

```

##
## Call:
## adonis(formula = dist(data_ade4_imp) ~ data_new$SITIO, data = iris,      m
##        etnod = "euclidean")
##
## Permutation: free
## Number of permutations: 999
##
## Terms added sequentially (first to last)
##
##           Df SumsOfSqs MeanSqs F.Model      R2 Pr(>F)
## data_new$SITIO 2 66368110 33184055 2.0667 0.10299 0.125
## Residuals      36 578045039 16056807           0.89701
## Total          38 644413149           1.00000

```

Histogram of sim

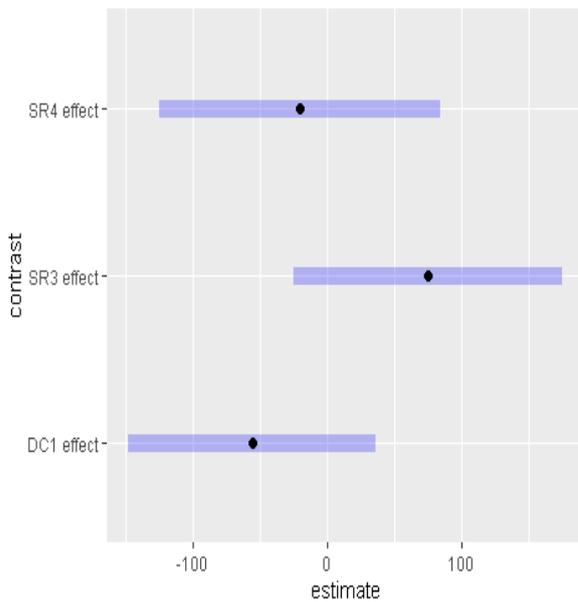


```

## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## DC1 - SR3 -130.6 64.2 36 -2.036 0.1182
## DC1 - SR4 -35.2 67.8 36 -0.519 0.8626
## SR3 - SR4 95.4 72.9 36 1.310 0.3992
##
## Results are averaged over the levels of: rep.meas
## Note: contrasts are still on the as.matrix scale
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates

## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## DC1 effect -55.3 36.7 36 -1.506 0.2112
## SR3 effect 75.3 39.8 36 1.893 0.1991
## SR4 effect -20.1 41.8 36 -0.481 0.6337
##
## Results are averaged over the levels of: rep.meas
## P value adjustment: fdr method for 3 tests

```



Funciones discriminantes e importancia de las variables

##	DS1	DS2	##	DS1	DS2
## Alb	-6.39552943	0.248649960	## COL	0.40477875	-4.332144987
## Glob	4.90571574	0.295680866	## LDL	-0.55347761	4.149530889
## A/G	2.89252479	0.272539028	## Mg	0.60204808	0.722906302
## LDH	2.09212989	-0.008380344	## Hto	0.29053768	0.712133915
## FA	-1.05386801	-0.638670435	## FA	-1.05386801	-0.638670435
## PT	0.84527619	-0.393809372	## VLDL	-0.09437876	0.591792860
## Ca	0.76039784	0.321536489	## CPK	-0.22443802	0.589112156
## Creat	-0.73954524	-0.298226929	## VCM	0.71570670	0.556155735
## VCM	0.71570670	0.556155735	## TGP	-0.36915594	-0.447155172
## Mg	0.60204808	0.722906302	## Ur	0.10888796	0.431064118
## LDL	-0.55347761	4.149530889	## ICC	0.41931428	0.405896650
## IGS	-0.53474395	-0.172884558	## PT	0.84527619	-0.393809372
## Ami	0.49702987	0.035134335	## HDL	0.16465643	0.393105795
## RGR	0.48712633	-0.008323983	## TGC	-0.10161778	-0.338039158

```

## TGO -0.42870310 0.147276073 ## Bas 0.11732958 -0.334073634
## ICC 0.41931428 0.405896650 ## Neu -0.38111771 0.328581909
## COL 0.40477875 -4.332144987 ## Ca 0.76039784 0.321536489
## P -0.38910218 0.025078355 ## Eos 0.30467300 -0.310078198
## Neu -0.38111771 0.328581909 ## Creat -0.73954524 -0.298226929
## TGP -0.36915594 -0.447155172 ## IHS 0.17174872 -0.296886531
## Eos 0.30467300 -0.310078198 ## Glob 4.90571574 0.295680866
## Hto 0.29053768 0.712133915 ## A/G 2.89252479 0.272539028
## RTGB -0.23358272 -0.063583997 ## Alb -6.39552943 0.248649960
## CPK -0.22443802 0.589112156 ## IGS -0.53474395 -0.172884558
## Mon 0.18877306 0.061550385 ## TGO -0.42870310 0.147276073
## IHS 0.17174872 -0.296886531 ## RTT -0.14487222 0.123867087
## HDL 0.16465643 0.393105795 ## RTGB -0.23358272 -0.063583997
## RTT -0.14487222 0.123867087 ## Mon 0.18877306 0.061550385
## N:L -0.12569699 0.007884475 ## Ami 0.49702987 0.035134335
## Bas 0.11732958 -0.334073634 ## P -0.38910218 0.025078355
## Ur 0.10888796 0.431064118 ## Lin 0.07743436 0.019370818
## TGC -0.10161778 -0.338039158 ## LDH 2.09212989 -0.008380344
## VLDL -0.09437876 0.591792860 ## RGR 0.48712633 -0.008323983
## Lin 0.07743436 0.019370818 ## N:L -0.12569699 0.007884475

```

Datos: *Rhinella arenarum* - año 2017 (capítulo 4 – escenario 4)

Descripción de los datos

```
## [1] "Descriptores categóricos"
```

```

##          Level    N    %
## 1  SPP         Ra   33 100.0
## 2  AÑO        2017   33 100.0
## 3  SITIO      CFH1   12  36.4
## 4             DC3   11  33.3
## 5             SR0   10  30.3
## 6  ES Afectado  22  66.7
## 7             Normal 11  33.3

```

```
## [1] "Descriptores cuantitativos"
```

	N	Missing	Mean	SD	Min	Q1	Median	Q3	Max
ICC	33	0	0.10	0.02	0.07	0.09	0.10	0.11	0.12
IHS	33	0	0.03	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.05
ICG	26	7	0.02	0.02	0.00	0.00	0.01	0.02	0.07
IGS	33	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Hto	33	0	34.02	7.46	17.50	29.00	33.00	42.00	45.00
RGR	33	0	0.76	0.37	0.14	0.44	0.76	0.96	1.78
Hb	32	1	7.18	2.10	2.30	5.30	7.58	8.88	10.35
VCM	33	0	578.02	373.17	213.48	329.27	426.14	728.57	1857.14
HCM	32	1	113.37	56.71	48.70	73.75	100.75	138.00	345.00
CHCM	32	1	21.82	7.02	8.84	18.27	22.55	23.85	46.97
Neu	31	2	8.48	6.16	1.00	4.50	8.00	10.50	25.00
Eos	33	0	4.70	3.62	0.00	2.00	4.00	7.00	17.00
Bas	33	0	2.55	4.87	0.00	0.00	1.00	2.02	22.00

Mon	33	0	2.77	2.57	0.00	1.00	2.00	4.00	12.00
Lin	33	0	80.29	8.90	64.71	74.00	80.81	87.00	96.00
N:L	31	2	0.11	0.09	0.01	0.05	0.09	0.14	0.37
RTGB	33	0	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.05
RTT	33	0	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02

Descriptores Cuantitativas

Caracterización de los sitios según los descriptores cuantitativos

CFH1	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
ICG	-2.610803	0.00835983	0.01823897	0.00542188	0.01618083	0.00903299
IGS	-2.85339	0.00213362	0.00252893	0.00041637	0.00059243	0.00432555

DC3	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
VCM	2.942967	848.383358	578.019075	403.599845	3.67E+02	0.00325083
Eos	2.17873	6.63636364	4.69647506	4.5978795	3.56E+00	0.02935176
Mon	2.093187	4.09090909	2.76898119	1.67628081	2.53E+00	0.03633245
Lin	-1.999133	75.9090909	80.2878786	6.45902533	8.76E+00	0.04559396
Hto	-2.013086	30.3181818	34.0151515	8.57128591	7.35E+00	0.0441056
IHS	-2.169612	0.02505669	0.02912302	0.00497804	7.50E-03	0.03003628
RGR	-3.857442	0.41	0.76409091	0.14378014	3.67E-01	0.00011458
Hb	-3.858737	5.21106455	7.17801719	1.6498113	2.04E+00	0.00011397

SR0	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
ICG	3.988802	0.0355424	0.01823897	0.01856421	0.01618083	6.64E-05
IHS	3.738174	0.03663629	0.02912302	0.00790156	0.00749689	1.85E-04
Hto	3.72442	41.35	34.0151515	2.26991189	7.34587583	1.96E-04
RGR	3.305715	1.0895	0.76409091	0.31920566	0.36717689	9.47E-04
Hb	3.1689	8.91024972	7.17801719	0.92307215	2.03896018	1.53E-03

Descriptores Categóricas

Relación entre los sitios y el estado de salud

```
##          p.value df
## ESTADO 0.04714415 2

## $CFH1
## NULL
##
## $DC3
##          Cla/Mod  Mod/Cla  Global  p.value  v.test
## ESTADO=Afectado 45.454545 90.909091 66.66667 0.04404317 2.01368
## ESTADO=Normal   9.090909  9.090909 33.33333 0.04404317 -2.01368
##
## $SR0
```

```

##          Cla/Mod Mod/Cla  Global  p.value  v.test
## ESTADO=Normal  54.54545    60 33.33333 0.04834218  1.974348
## ESTADO=Afectado 18.18182    40 66.66667 0.04834218 -1.974348

##          p.value df
## SITIO 0.04714415  2

## $Afectado
##          Cla/Mod Mod/Cla  Global  p.value  v.test
## SITIO=DC3 90.90909 45.45455 33.33333 0.04404317  2.013680
## SITIO=SR0 40.00000 18.18182 30.30303 0.04834218 -1.974348
##
## $Normal
##          Cla/Mod Mod/Cla  Global  p.value  v.test
## SITIO=SR0 60.000000 54.545455 30.30303 0.04834218  1.974348
## SITIO=DC3  9.090909  9.090909 33.33333 0.04404317 -2.013680

```

Análisis multivariados

Análisis de Componentes principales

```

## Class: pca dudi
## Call: dudi.pca(df = select_if(data_new, is.numeric), scannf = FALSE)
##
## Total inertia: 18
##
## Eigenvalues:
##   Ax1   Ax2   Ax3   Ax4   Ax5
## 4.305  2.671  2.375  1.953  1.354
##
## Projected inertia (%):
##   Ax1   Ax2   Ax3   Ax4   Ax5
## 23.914 14.838 13.196 10.848  7.524
##
## Cumulative projected inertia (%):
##   Ax1  Ax1:2  Ax1:3  Ax1:4  Ax1:5
## 23.91  38.75  51.95  62.80  70.32
##
## (Only 5 dimensions (out of 18) are shown)

## Inertia information:
## Call: inertia.dudi(x = hs3)
##
## Decomposition of total inertia:
##   inertia  cum  cum(%)
## Ax1 4.30454  4.305  23.91
## Ax2 2.67079  6.975  38.75
## Ax3 2.37527  9.351  51.95
## Ax4 1.95267 11.303  62.80
## Ax5 1.35431 12.658  70.32
## Ax6 1.24489 13.902  77.24
## Ax7 0.89550 14.798  82.21
## Ax8 0.76855 15.567  86.48
## Ax9 0.62871 16.195  89.97
## Ax10 0.48864 16.684  92.69
## Ax11 0.42581 17.110  95.05
## Ax12 0.36230 17.472  97.07
## Ax13 0.24814 17.720  98.45
## Ax14 0.13292 17.853  99.18

```

```
## Ax15 0.07855 17.932 99.62
## Ax16 0.04731 17.979 99.88
## Ax17 0.01896 17.998 99.99
## Ax18 0.00213 18.000 100.00
```

Análisis Discriminante

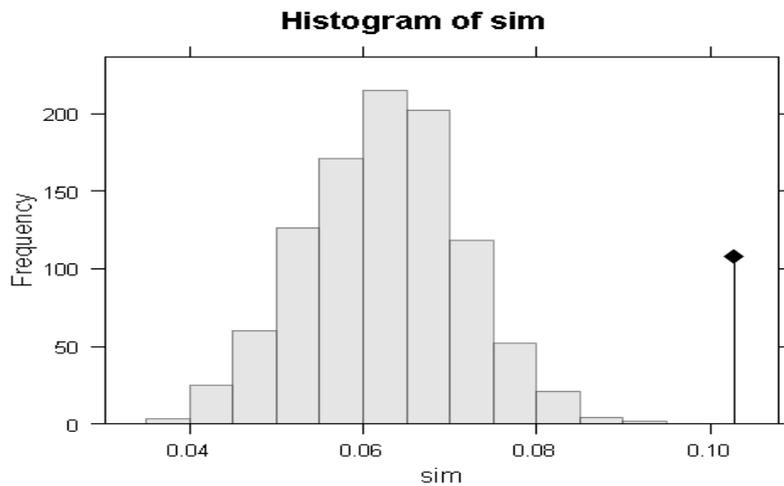
Homogeneidad de varianzas entre grupos

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: Distances
##          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## Groups    2 210353 105176 1.4281 0.2556
## Residuals 30 2209373 73646
##
## Permutation test for homogeneity of multivariate dispersions
## Permutation: free
## Number of permutations: 99
##
## Response: Distances
##          Df Sum Sq Mean Sq      F N.Perm Pr(>F)
## Groups    2 210353 105176 1.4281    99 0.25
## Residuals 30 2209373 73646
##
## Pairwise comparisons:
## (Observed p-value below diagonal, permuted p-value above diagonal)
##          CFH1      DC3  SR0
## CFH1          0.460000 0.45
## DC3  0.425176          0.05
## SR0  0.416587 0.055016
##
## Tukey multiple comparisons of means
## 95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = distances ~ group, data = df)
##
## $group
##          diff          lwr          upr          p adj
## DC3-CFH1 109.08475 -170.1796 388.3491 0.6054714
## SR0-CFH1 -90.59649 -377.0534 195.8604 0.7181845
## SR0-DC3 -199.68124 -491.9968 92.6343 0.2277725
```

Diferencia entre grupos

```
##
## Call:
## adonis(formula = dist(data_ade4_imp) ~ data_new$SITIO, data = iris,      m
##        etnod = "euclidean")
##
## Permutation: free
## Number of permutations: 999
##
## Terms added sequentially (first to last)
##
##          Df SumsOfSqs MeanSqs F.Model      R2 Pr(>F)
## data_new$SITIO 2 1235712 617856 5.5685 0.27073 0.007 **
```

```
## Residuals      30  3328654 110955      0.72927
## Total         32  4564366
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```



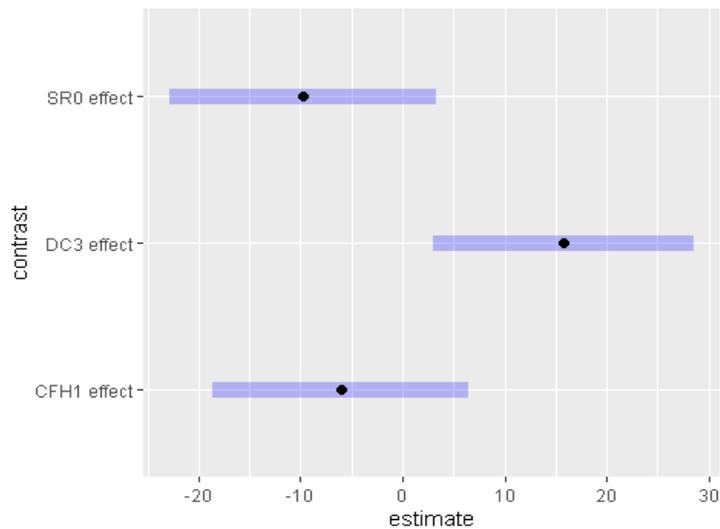
```
##           Df      Wilks approx F num Df den Df      Pr(>F)
## data_new$SITIO  2 0.0050867  9.4041    36    26 4.633e-08 ***
## Residuals      30
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
## contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
## CFH1 - DC3    -21.85  8.53 30 -2.562  0.0404
## CFH1 - SR0     3.65  8.75 30  0.417  0.9090
## DC3 - SR0     25.50  8.93 30  2.856  0.0205
##
```

```
## Results are averaged over the levels of: rep.meas
## Note: contrasts are still on the as.matrix scale
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
```

```
## contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
## CFH1 effect    -6.07  4.93 30 -1.231  0.2281
## DC3 effect     15.78  5.04 30  3.133  0.0115
## SR0 effect     -9.72  5.16 30 -1.882  0.1043
##
```

```
## Results are averaged over the levels of: rep.meas
## P value adjustment: fdr method for 3 tests
```



Funciones discriminantes e importancia de las variables

##	DS1	DS2	##	DS1	DS2
## N:L	0.84360326	-0.17156886	## CHCM	-0.03824396	-1.42164946
## Neu	-0.52729065	-0.01845495	## Hb	0.43326738	0.94961832
## Hb	0.43326738	0.94961832	## Hto	0.10243741	-0.87927133
## ICC	0.36177555	-0.21730570	## RGR	0.32534367	0.71688995
## RGR	0.32534367	0.71688995	## HCM	-0.15501677	0.57568777
## ICG	0.30987243	-0.25778884	## VCM	0.18040220	-0.53348624
## Lin	0.27639636	-0.34465619	## Bas	0.14305903	-0.52069481
## VCM	0.18040220	-0.53348624	## IGS	0.12790720	-0.36246919
## Eos	0.15828049	-0.26205444	## Lin	0.27639636	-0.34465619
## HCM	-0.15501677	0.57568777	## Mon	0.07857889	-0.29241294
## Bas	0.14305903	-0.52069481	## Eos	0.15828049	-0.26205444
## IGS	0.12790720	-0.36246919	## ICG	0.30987243	-0.25778884
## Hto	0.10243741	-0.87927133	## RTGB	-0.01311611	-0.24149781
## Mon	0.07857889	-0.29241294	## ICC	0.36177555	-0.21730570
## IHS	0.06586680	0.02678267	## N:L	0.84360326	-0.17156886
## RTT	-0.06164173	-0.01174997	## IHS	0.06586680	0.02678267
## CHCM	-0.03824396	-1.42164946	## Neu	-0.52729065	-0.01845495
## RTGB	-0.01311611	-0.24149781	## RTT	-0.06164173	-0.01174997

Datos: *Rhinella arenarum* - año 2018 (capítulo 4 – escenario 5)

Descripción de los datos

[1] "Descriptores categóricos"

##	Level	N	%
## 1	SPP Ra	37	100.0
## 2	AÑO 2018	37	100.0
## 3	SITIO DC3	7	18.9
## 4	IP3	15	40.5
## 5	SR0	15	40.5

```
## 6 ES Afectado 17 45.9
## 7 Normal 20 54.1
```

```
## [1] "Descriptores cuantitativos"
```

	N	Missing	Mean	SD	Min	Q1	Median	Q3	Max
ICC	37	0	0.12	0.02	0.08	0.10	0.11	0.13	0.15
IHS	37	0	0.03	0.01	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04
ICG	28	9	0.02	0.03	0.00	0.01	0.01	0.03	0.11
IGS	37	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Hto	36	1	32.12	4.73	24.00	28.25	31.25	35.50	41.00
RGR	37	0	0.54	0.17	0.23	0.42	0.54	0.64	1.22
Hb	37	0	8.13	1.99	4.04	6.77	8.17	9.21	12.40
VCM	36	1	617.49	148.39	262.30	520.41	604.75	683.96	931.51
HCM	37	0	157.12	39.39	64.90	138.00	156.00	176.00	242.00
CHCM	36	1	25.53	5.10	14.43	21.77	25.69	28.97	37.43
Neu	37	0	5.83	5.82	1.00	1.85	3.00	9.00	23.00
Eos	37	0	5.97	4.88	0.00	3.00	4.00	7.00	21.00
Bas	37	0	3.84	4.11	0.00	0.00	3.00	7.00	11.43
Mon	37	0	1.79	2.69	0.00	0.00	1.00	2.00	11.00
Lin	37	0	82.57	6.88	66.00	79.00	82.00	87.00	94.44
N:L	37	0	0.08	0.08	0.01	0.02	0.04	0.11	0.34
RTGB	37	0	0.02	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03
RTT	37	0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01

Descriptores Cuantitativas

Caracterización de los sitios según los descriptores cuantitativos

DC3	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
Mon	2.427084	4.008658	1.785422	2.397784	2.654852	0.01522071
Bas	-2.743477	0	3.841413	0	4.058161	0.00607923

IP3	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
Bas	4.751385	7.73333333	3.84141284	2.35135895	4.05816134	2.02E-06
RTGB	2.811814	0.02226667	0.01972973	0.00256818	0.00447001	4.93E-03
Mon	-2.087758	0.66666667	1.78542179	1.0749677	2.65485227	3.68E-02
Eos	-2.09768	3.93333333	5.97333774	1.56914697	4.81811765	3.59E-02
N:L	-2.704045	0.03102054	0.07566903	0.02526307	0.08180474	6.85E-03
Neu	-2.786454	2.6	5.82664177	1.88332219	5.73699476	5.33E-03

SR0	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
Eos	3.179632	9.065546	5.97333774	6.10557741	4.81811765	0.0014742
Lin	-1.97683	79.86464	82.5731859	7.33866085	6.78885657	0.04806079
RTGB	-2.138816	0.0178	0.01972973	0.00448999	0.00447001	0.00324506
Bas	-2.562847	1.742152	3.84141284	2.94169202	4.05816134	0.01038177

Descriptores Categóricas

Relación entre los sitios y el estado de salud

```
## NULL

## $DC3
##           Cla/Mod  Mod/Cla  Global  p.value  v.test
## ESTADO=Afectado 35.29412 85.71429 45.94595 0.02781961 2.199821
## ESTADO=Normal   5.00000 14.28571 54.05405 0.02781961 -2.199821
##
## $IP3
## NULL
##
## $SR0
## NULL

## NULL

## $Afectado
##           Cla/Mod  Mod/Cla  Global  p.value  v.test
## SITIO=DC3 85.71429 35.29412 18.91892 0.02781961 2.199821
##
## $Normal
##           Cla/Mod  Mod/Cla  Global  p.value  v.test
## SITIO=DC3 14.28571         5 18.91892 0.02781961 -2.199821
```

Análisis multivariados

Análisis de Componentes principales

```
## Class: pca dudi
## Call: dudi.pca(df = select_if(data_new, is.numeric), scannf = FALSE)
##
## Total inertia: 18
##
## Eigenvalues:
##      Ax1    Ax2    Ax3    Ax4    Ax5
##  3.717  2.876  2.357  1.896  1.698
##
## Projected inertia (%):
##      Ax1    Ax2    Ax3    Ax4    Ax5
## 20.649 15.978 13.093 10.536  9.433
##
## Cumulative projected inertia (%):
##      Ax1  Ax1:2  Ax1:3  Ax1:4  Ax1:5
## 20.65  36.63  49.72  60.26  69.69
##
## (Only 5 dimensions (out of 17) are shown)

## Inertia information:
## Call: inertia.dudi(x = hs3)
##
## Decomposition of total inertia:
##      inertia  cum  cum(%)
## Ax1 3.716857  3.717  20.65
## Ax2 2.876085  6.593  36.63
## Ax3 2.356732  8.950  49.72
## Ax4 1.896470 10.846  60.26
## Ax5 1.697895 12.544  69.69
```

```
## Ax6 1.199007 13.743 76.35
## Ax7 0.932958 14.676 81.53
## Ax8 0.809871 15.486 86.03
## Ax9 0.745681 16.232 90.18
## Ax10 0.591963 16.824 93.46
## Ax11 0.408753 17.232 95.73
## Ax12 0.359131 17.591 97.73
## Ax13 0.282671 17.874 99.30
## Ax14 0.073861 17.948 99.71
## Ax15 0.043424 17.991 99.95
## Ax16 0.006683 17.998 99.99
## Ax17 0.001957 18.000 100.00
```

Análisis Discriminante

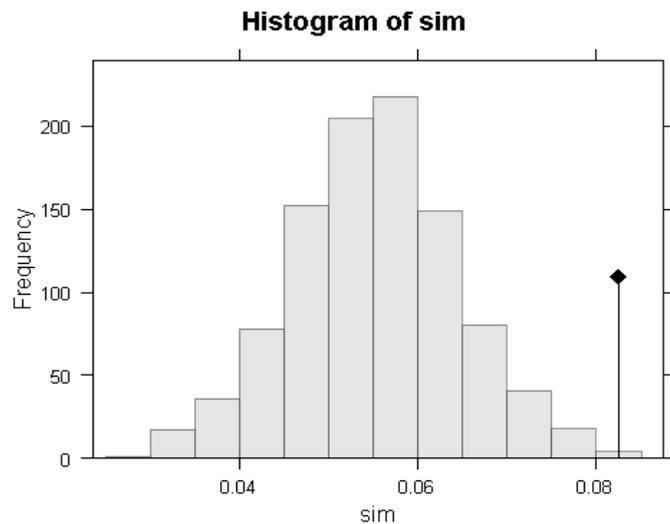
Homogeneidad de varianzas entre grupos

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: Distances
##           Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## Groups      2 15921  7960.6   0.783 0.4651
## Residuals  34 345681 10167.1
##
## Permutation test for homogeneity of multivariate dispersions
## Permutation: free
## Number of permutations: 99
##
## Response: Distances
##           Df Sum Sq Mean Sq      F N.Perm Pr(>F)
## Groups      2 15921  7960.6 0.783    99  0.47
## Residuals  34 345681 10167.1
##
## Pairwise comparisons:
## (Observed p-value below diagonal, permuted p-value above diagonal)
##           DC3      IP3  SR0
## DC3           0.27000 0.36
## IP3 0.27554           0.88
## SR0 0.32860 0.85284
##
## Tukey multiple comparisons of means
## 95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = distances ~ group, data = df)
##
## $group
##           diff          lwr          upr          p adj
## IP3-DC3 -55.554093 -168.65290  57.54471 0.4592133
## SR0-DC3 -49.434921 -162.53373  63.66388 0.5382053
## SR0-IP3   6.119173  -84.10246  96.34081 0.9848944
```

Diferencia entre grupos

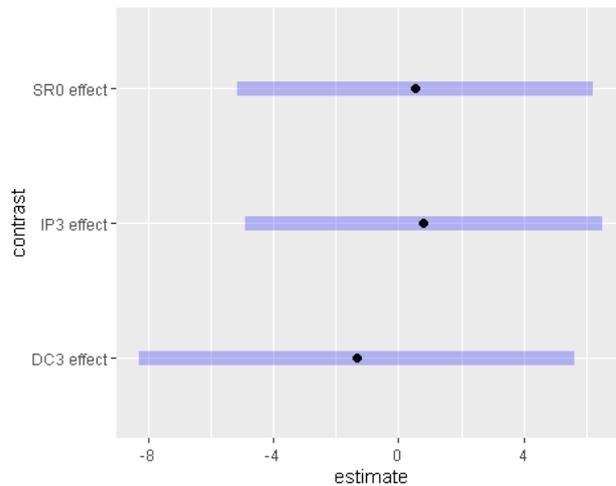
```
##
## Call:
## adonis(formula = dist(data_ade4_imp) ~ data_new$SITIO, data = iris, m
## ethod = "euclidean")
```

```
##
## Permutation: free
## Number of permutations: 999
##
## Terms added sequentially (first to last)
##
##           Df SumsOfSqs MeanSqs F.Model      R2 Pr(>F)
## data_new$SITIO  2      5443  2721.6 0.11181 0.00653 0.926
## Residuals      34     827631 24342.1      0.99347
## Total          36     833074      1.00000
```



```
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## DC3 - IP3 -2.14 4.50 34 -0.474 0.8839
## DC3 - SR0 -1.86 4.50 34 -0.414 0.9101
## IP3 - SR0 0.27 3.59 34 0.075 0.9969
##
## Results are averaged over the levels of: rep.meas
## Note: contrasts are still on the as.matrix scale
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates

## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## DC3 effect -1.333 2.75 34 -0.484 0.8157
## IP3 effect 0.802 2.26 34 0.354 0.8157
## SR0 effect 0.531 2.26 34 0.235 0.8157
##
## Results are averaged over the levels of: rep.meas
## P value adjustment: fdr method for 3 tests
```



Funciones discriminantes e importancia de las variables

##		DS1	DS2	##		DS1	DS2
##	Hb	1.1440705937	0.43381322	##	CHCM	-1.0113106004	-1.54992940
##	CHCM	-1.0113106004	-1.54992940	##	HCM	0.2537478370	1.04522987
##	Bas	-0.6908633502	-0.07169171	##	Hto	-0.6424988899	-0.73082137
##	Hto	-0.6424988899	-0.73082137	##	VCM	-0.6091366987	-0.72619826
##	VCM	-0.6091366987	-0.72619826	##	ICC	0.0404046851	-0.70343928
##	Neu	0.5355356626	0.19818118	##	ICG	-0.0418384418	0.49027669
##	RTGB	-0.3994043296	-0.03223702	##	Hb	1.1440705937	0.43381322
##	N:L	-0.3619670967	-0.32886371	##	Eos	0.0656219742	-0.42525205
##	RGR	-0.2999215178	0.37923638	##	RGR	-0.2999215178	0.37923638
##	HCM	0.2537478370	1.04522987	##	N:L	-0.3619670967	-0.32886371
##	Lin	-0.0863204017	0.08021986	##	RTT	0.0318421338	0.27117083
##	IHS	-0.0744417623	-0.13544062	##	Mon	0.0004188874	0.24795558
##	Eos	0.0656219742	-0.42525205	##	Neu	0.5355356626	0.19818118
##	ICG	-0.0418384418	0.49027669	##	IHS	-0.0744417623	-0.13544062
##	ICC	0.0404046851	-0.70343928	##	Lin	-0.0863204017	0.08021986
##	RTT	0.0318421338	0.27117083	##	Bas	-0.6908633502	-0.07169171
##	IGS	-0.0060051628	0.05119792	##	IGS	-0.0060051628	0.05119792
##	Mon	0.0004188874	0.24795558	##	RTGB	-0.3994043296	-0.03223702

Datos: *Rhinella arenarum* - año 2019 (capítulo 4 – escenario 6)

Descripción de los datos

[1] "Descriptores categóricos"

##		Level	N	%
##	1	SPP	Ra	31 100.0
##	2	AÑO	2019	31 100.0
##	3	SITIO	IP4	14 45.2
##	4		IP5	9 29.0
##	5		SR0	8 25.8

```
## 6 ES Afectado 22 71.0
## 7 Normal 9 29.0
```

```
## [1] "Descriptores cuantitativos"
```

	N	Missing	Mean	SD	Min	Q1	Median	Q3
ICC	31	0	0.10	0.02	0.05	0.10	0.11	0.11
IHS	31	0	0.03	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03
ICG	4	27	0.02	0.02	0.00	0.01	0.01	0.03
IGS	31	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Hto	29	2	36.47	6.98	27.00	30.00	35.00	40.50
RGR	31	0	0.47	0.10	0.27	0.39	0.46	0.52
VCM	29	2	799.41	140.10	566.67	723.21	771.43	857.14
Neu	31	0	4.30	3.80	1.00	1.71	3.00	5.50
Eos	31	0	5.71	3.24	0.00	3.00	6.00	7.50
Bas	31	0	1.97	2.07	0.00	0.00	1.00	4.00
Mon	31	0	0.74	1.34	0.00	0.00	0.00	1.00
Lin	31	0	87.28	4.75	75.00	85.00	88.00	90.00
N:L	31	0	0.05	0.05	0.01	0.02	0.03	0.06
RTGB	31	0	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03
RTT	31	0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
LDH	28	3	3565.93	2333.97	638.00	1072.00	3247.50	5503.00
CPK	29	2	4564.66	3195.40	218.00	2674.00	3416.00	5762.00
TGP	28	3	119.93	65.14	15.00	69.50	125.00	183.50
TGO	28	3	1175.46	954.26	29.00	561.00	877.50	1387.00
FA	28	3	223.71	169.37	80.00	126.00	165.00	235.00
PT	29	2	3.77	0.87	2.10	3.00	3.70	4.30
Alb	29	2	2.40	0.57	1.40	2.00	2.30	2.90
Glob	29	2	1.37	0.38	0.70	1.10	1.30	1.70
A/G	29	2	1.81	0.40	1.05	1.55	1.70	2.00
COL	28	3	52.21	23.14	12.00	37.50	49.00	64.50
TGC	28	3	85.18	75.74	13.00	22.50	51.50	140.50
HDL	29	2	13.24	4.84	5.00	9.00	13.00	16.00
LDL	28	3	25.43	19.36	1.00	12.00	19.50	32.00
VLDL	26	5	15.73	14.89	3.00	4.00	8.50	23.00
Ca	29	2	5.57	1.60	2.90	4.40	5.40	6.50
P	26	5	4.20	2.00	1.60	2.50	3.55	5.70
Mg	29	2	2.23	1.27	0.70	1.40	1.80	2.80
Creat	28	3	0.33	0.13	0.13	0.23	0.30	0.41
Ur	29	2	76.34	36.97	20.00	52.00	74.00	86.00
Ami	29	2	6902.17	4719.55	639.00	2674.00	6494.00	10108.00

Descriptores Cuantitativas

Caracterización de los sitios según los descriptores cuantitativos

IP4	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
Ur	2.45749	93.7142857	76.3448276	38.5142433	35.1313442	0.01399119
Lin	2.112795	89.2653061	87.281106	3.71383716	4.66797303	0.03461833
N:L	-2.061037	0.03120484	0.05077649	0.02414382	0.04719997	0.03929947
Neu	-2.071952	2.74489796	4.30414747	2.02763601	3.74055615	0.03826995
VLDL	-2.182891	9.85714286	15.7307692	7.08980297	13.3744043	0.02904384
TGC	-2.574323	48.5714286	85.1785714	35.146051	70.6810435	0.01004364

IP5	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
Neu	3.253254	7.777777	4.30414747	4.68514859	3.74055615	0.00114092
N:L	3.22236	0.09419204	0.05077649	0.06050336	0.04719997	0.00127139
Mon	2.751109	1.777777	0.74193548	1.93090524	1.31903537	0.00593939
COL	-2.208362	38.6031746	52.2142857	12.1829455	21.5920492	0.02721905
Lin	-2.629196	83.777777	87.281106	4.4416658	4.66797303	0.00855869
RGR	-2.686135	0.395	0.46919355	0.06815016	0.0967629	0.00722839
Alb	-2.733062	1.977777	2.4	0.30832082	0.54120535	0.00627484
Hto	-3.00447	30.777777	36.4655172	2.69887951	6.63194984	0.00266037
Glob	-3.014	1.05977011	1.36896552	0.22113894	0.35930349	0.00257245
IHS	-3.095898	0.02116742	0.02654358	0.00231083	0.00608354	0.00196218
PT	-3.105663	3.03754789	3.76896552	0.49102244	0.82505267	0.00189853

SR0	v test	Mean in category	Overall mean	SD in category	Overall SD	p-value
IHS	4.148823	0.03435697	0.02654358	0.00498058	0.00308354	3.34E-05
Alb	3.432002	2.975	2.4	0.35619517	0.54120535	5.99E-04
PT	3.057949	4.55	3.76896552	0.698212	0.82505267	2.23E-03
VLDL	2.480305	26	15.7307692	19.078784	13.3744043	1.31E-02
COL	2.216033	67.0267857	52.2142857	16.9027054	21.5920492	2.67E-02
TGC	2.07701	130.625	85.1785714	94.9630685	70.6810435	3.78E-02
Ur	-3.043036	43.25	76.3448276	17.4194575	35.1313442	2.34E-03

Descriptores Categóricas

Relación entre los sitios y el estado de salud

```
##          p.value df
## ESTADO 0.04906224 2

## $IP4
## NULL
##
## $IP5
## NULL
##
## $SR0
##          Cla/Mod Mod/Cla  Global  p.value  v.test
## ESTADO=Normal  55.55556   62.5 29.03226 0.02971963 2.173807
## ESTADO=Afectado 13.63636   37.5 70.96774 0.02971963 -2.173807

##          p.value df
## SITIO 0.04906224 2

## $Afectado
##          Cla/Mod Mod/Cla  Global  p.value  v.test
## SITIO=SR0   37.5 13.63636 25.80645 0.02971963 -2.173807
##
## $Normal
```

```
##          Cla/Mod  Mod/Cla  Global  p.value  v.test
## SITIO=SR0    62.5 55.55556 25.80645 0.02971963 2.173807
```

Análisis multivariados

Análisis de Componentes principales

```
## Class: pca dudi
## Call: dudi.pca(df = select_if(data_new, is.numeric), scannf = FALSE)
##
## Total inertia: 35
##
## Eigenvalues:
##      Ax1      Ax2      Ax3      Ax4      Ax5
##  7.262   4.600   3.128   2.985   2.455
##
## Projected inertia (%):
##      Ax1      Ax2      Ax3      Ax4      Ax5
## 20.747 13.144  8.938  8.528  7.015
##
## Cumulative projected inertia (%):
##      Ax1  Ax1:2  Ax1:3  Ax1:4  Ax1:5
## 20.75  33.89  42.83  51.36  58.37
##
## (Only 5 dimensions (out of 30) are shown)

## Inertia information:
## Call: inertia.dudi(x = hs3)
##
## Decomposition of total inertia:
##      inertia      cum  cum(%)
## Ax1  7.261500   7.262  20.75
## Ax2  4.600294  11.862  33.89
## Ax3  3.128188  14.990  42.83
## Ax4  2.984796  17.975  51.36
## Ax5  2.455389  20.430  58.37
## Ax6  2.076512  22.507  64.30
## Ax7  1.701214  24.208  69.17
## Ax8  1.427105  25.635  73.24
## Ax9  1.350428  26.985  77.10
## Ax10 1.119425  28.105  80.30
## Ax11 1.011277  29.116  83.19
## Ax12 0.934334  30.050  85.86
## Ax13 0.853567  30.904  88.30
## Ax14 0.821190  31.725  90.64
## Ax15 0.687373  32.413  92.61
## Ax16 0.549159  32.962  94.18
## Ax17 0.401811  33.364  95.32
## Ax18 0.377356  33.741  96.40
## Ax19 0.326955  34.068  97.34
## Ax20 0.262786  34.331  98.09
## Ax21 0.199010  34.530  98.66
## Ax22 0.132588  34.662  99.04
## Ax23 0.126098  34.788  99.40
## Ax24 0.086872  34.875  99.64
## Ax25 0.062579  34.938  99.82
## Ax26 0.026491  34.964  99.90
## Ax27 0.020318  34.985  99.96
## Ax28 0.010306  34.995  99.99
```

```
## Ax29 0.003229 34.998 99.99
## Ax30 0.001850 35.000 100.00
```

Análisis Discriminante

Homogeneidad de varianzas entre grupos

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: Distances
##      Df      Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## Groups  2  7693425 3846713  0.458 0.6372
## Residuals 28 235153023 8398322

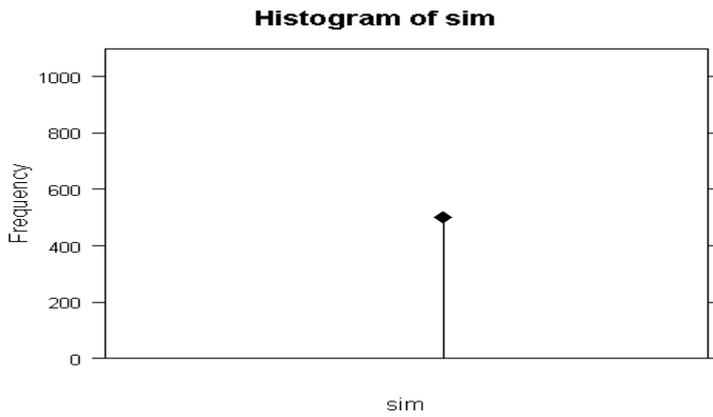
##
## Permutation test for homogeneity of multivariate dispersions
## Permutation: free
## Number of permutations: 99
##
## Response: Distances
##      Df      Sum Sq Mean Sq      F N.Perm Pr(>F)
## Groups  2  7693425 3846713 0.458    99  0.58
## Residuals 28 235153023 8398322

##
## Pairwise comparisons:
## (Observed p-value below diagonal, permuted p-value above diagonal)
##      IP4      IP5 SR0
## IP4      0.64000 0.46
## IP5 0.70985      0.26
## SR0 0.52080 0.31255

## Tukey multiple comparisons of means
## 95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = distances ~ group, data = df)
##
## $group
##      diff      lwr      upr      p adj
## IP5-IP4 -494.7814 -3558.410 2568.847 0.9160041
## SR0-IP4  840.9064 -2337.137 4018.949 0.7912577
## SR0-IP5 1335.6878 -2148.613 4819.989 0.6147633
```

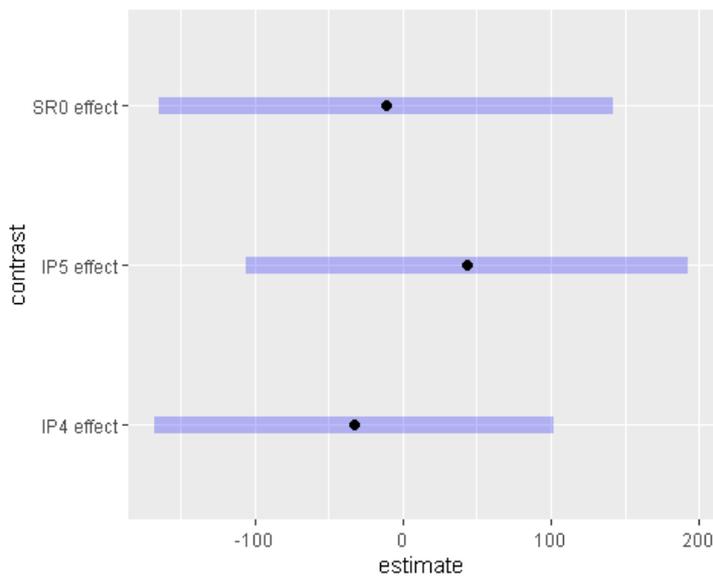
Diferencia entre grupos

```
##
## Call:
## adonis(formula = dist(data_ade4_imp) ~ data_new$SITIO, data = iris,      m
##      method = "euclidean")
##
## Permutation: free
## Number of permutations: 999
##
## Terms added sequentially (first to last)
##
##      Df SumsOfSqs MeanSqs F.Model      R2 Pr(>F)
## data_new$SITIO  2  64919226 32459613 0.89281 0.05995 0.476
## Residuals      28 1017985404 36356622      0.94005
## Total          30 1082904630      1.00000
```



```
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## IP4 - IP5 -76.1 93.6 28 -0.813 0.6982
## IP4 - SR0 -21.7 97.1 28 -0.224 0.9728
## IP5 - SR0 54.4 106.4 28 0.511 0.8667
##
## Results are averaged over the levels of: rep.meas
## Note: contrasts are still on the as.matrix scale
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates

## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## IP4 effect -32.6 52.7 28 -0.618 0.8123
## IP5 effect 43.5 58.5 28 0.744 0.8123
## SR0 effect -10.9 60.3 28 -0.181 0.8580
##
## Results are averaged over the levels of: rep.meas
## P value adjustment: fdr method for 3 tests
```



Funciones discriminantes e importancia de las variables

##	DS1	DS2	##	DS1	DS2
## Alb	-1.34004893	-0.73381286	## VLDL	0.78589028	1.00551747
## IHS	1.18327269	-0.22057036	## TGC	-1.10422872	-0.96146742
## Glob	1.12421189	0.86267039	## Ur	-0.01498089	0.94014836
## TGC	-1.10422872	-0.96146742	## Glob	1.12421189	0.86267039
## FA	-1.07328088	-0.06374511	## Alb	-1.34004893	-0.73381286

## LDH	1.07053515	-0.34598132	## Hto	0.18962079	0.67474269
## A/G	0.96569280	0.44218622	## TGO	0.65846654	-0.55199620
## VLDL	0.78589028	1.00551747	## ICC	0.34041131	0.47398477
## Creat	0.70887906	-0.34339227	## ICG	0.10217561	-0.45984668
## TGO	0.65846654	-0.55199620	## VCM	0.36011147	-0.45260726
## CPK	0.63468146	0.03941497	## A/G	0.96569280	0.44218622
## TGP	-0.62405402	0.37431499	## TGP	-0.62405402	0.37431499
## Ami	-0.57112178	-0.09739975	## LDH	1.07053515	-0.34598132
## Neu	-0.39805083	-0.02367421	## Creat	0.70887906	-0.34339227
## PT	-0.38943985	-0.10566957	## LDL	-0.10869481	0.33996036
## Ca	0.38721572	-0.24167161	## Mon	0.30553608	-0.26660851
## P	-0.37725988	-0.25591017	## P	-0.37725988	-0.25591017
## VCM	0.36011147	-0.45260726	## Ca	0.38721572	-0.24167161
## ICC	0.34041131	0.47398477	## RGR	0.21129562	-0.22440620
## Mon	0.30553608	-0.26660851	## IHS	1.18327269	-0.22057036
## N:L	-0.30369777	-0.12066209	## COL	0.01294007	-0.19320057
## RTT	0.29238272	-0.05779805	## Bas	0.01474187	0.14844242
## Lin	0.24268663	0.04766367	## N:L	-0.30369777	-0.12066209
## RGR	0.21129562	-0.22440620	## RTGB	-0.15720710	0.11305776
## Hto	0.18962079	0.67474269	## PT	-0.38943985	-0.10566957
## RTGB	-0.15720710	0.11305776	## Ami	-0.57112178	-0.09739975
## HDL	-0.13598269	-0.04053635	## FA	-1.07328088	-0.06374511
## IGS	0.11212154	-0.02636381	## RTT	0.29238272	-0.05779805
## LDL	-0.10869481	0.33996036	## Mg	-0.05386021	-0.05382267
## ICG	0.10217561	-0.45984668	## Lin	0.24268663	0.04766367
## Mg	-0.05386021	-0.05382267	## HDL	-0.13598269	-0.04053635
## Eos	-0.02415002	-0.02667175	## CPK	0.63468146	0.03941497
## Ur	-0.01498089	0.94014836	## Eos	-0.02415002	-0.02667175
## Bas	0.01474187	0.14844242	## IGS	0.11212154	-0.02636381
## COL	0.01294007	-0.19320057	## Neu	-0.39805083	-0.02367421

ANEXO 5. PROTOCOLO DE PROCESAMIENTO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE ANUROS ADULTOS

Búsqueda de anuros adultos: se recorrerán los sitios de estudio seleccionados en su totalidad, y se buscarán y capturarán los ejemplares de anuros adultos mediante búsqueda intensiva.

Captura: Cada ejemplar será tomado manualmente y puesto en una bolsa de plástico con agua, la cual será cerrada al momento de movernos en el vehículo hacia otro sitio.

Ó se utilizarán bolsas de tela humedecidas para el traslado de los ejemplares.

Mantenimiento hasta su procesamiento: Los ejemplares serán trasladados al laboratorio en el menor tiempo posible, sin superar los 60-120 minutos de permanencia en el vehículo. Serán ubicados en bateas, con agua y en oscuridad EN CONDICIONES CONTROLADAS.

Antes de proceder a la disección del animal, preparar los rótulos y soluciones (ANEXO I)

1- ANESTESIA: mediante inmersión de cada individuo en una solución de 2 g MS-222/L con 2 g de bicarbonato de sodio para neutralizar el ácido del MS 222 durante 15-20 min

2- MEDICIÓN DE VARIABLES MORFOMETRICAS: pesar al animal en balanza digital y medir la longitud hocico cloaca con calibre, luego tomar fotografía dorsal y ventral sobre gradilla milimetrada para realizar mediciones con posterior uso de programa ImageJ. La fotografía también servirá para completar el punto 5 para el registro de la coloración, presencia de patologías, etc.

3- DETERMINACIÓN DE MADUREZ SEXUAL EXTERNA: observar el animal en búsqueda de caracteres sexuales secundarios como saco vocal, presencia de parches, dimorfismo, otros.

4- REVISION EXTERNA DEL ANIMAL: chequear la superficie del animal, en busca de lesiones cutáneas (úlceras, nódulos, edemas, quistes, secreciones, inflamación), anomalías macroscópicas y presencia de parásitos externos (guardar en alcohol 70%) y tomar fotografías de las lesiones encontradas.

5- DISECCION Y PROSPECCIÓN INTERNA DEL ANIMAL:

Sacar fotografías del aspecto general interno, para conocer la ubicación, forma, coloración y tamaño de los órganos, para realizar posteriormente análisis morfométricos. Observar en búsqueda de parásitos de la cavidad interna (guardar en alcohol 70%). Posteriormente, inspeccionar cada órgano en búsqueda de parásitos propios de cada uno.

6-DETERMINACIÓN DEL SEXO: Mediante la observación de la presencia de testículos u ovarios confirmar el sexo de cada individuo y su madurez relativa y además registrar AMBAS gónadas con la intención de detectar INTERSEXOS.

A- TOMA DE MUESTRA DE SANGRE: mediante punción cardíaca, o por vena femoral o vena abdominal o vena lingual con jeringa heparinizada (ANEXO II).

Luego realizar la extracción de los distintos órganos:

B- VESICULA BILIAR: guardar en un eppendorf con 1 ml de agua destilada en freezer.

C- HIGADO. Pesar en balanza digital para posterior cálculo de índice hepatosomático, extraer 1/3 para fijar en Karnovsky para histología (1 eppendorf) y guardar 2/3 en freezer para determinar posteriormente la actividad enzimática y para análisis de residuos de plaguicidas (1 eppendorf para enzimas, 1 bolsita para residuos). Eventualmente tomar una pequeña muestra de un individuo y guardar en alcohol 96% para estudios de ADN (1 eppendorf).

D- ESTÓMAGO, INTESTINO Y CONTENIDO ESTOMACAL: pesar y guardar en formol, para luego inspeccionar en búsqueda de parásitos y tener una aproximación del consumo de alimento del animal en las últimas horas (en frascos de 250ml o bolsas plásticas, colocadas agujereadas en un tarro de vidrio común con formol 10%).

E- CUERPOS GRASOS: pesar en balanza digital, para posterior cálculo de índice de grasa corporal. Guardar en freezer para análisis de residuos de plaguicidas (1 bolsita).

F- GÓNADAS: pesar en balanza digital para posterior cálculo de índice gonadosomático. Fijar en Karnovsky para histología (1 eppendorf), guardar una muestra en formol para

calcular el complemento ovárico (hembras) y guardar el resto en freezer para determinar posteriormente la actividad enzimática y para análisis de residuos de plaguicidas (1 eppendorf para enzimas, 1 bolsita para residuos). En el caso de ser de pequeño tamaño se le puede agregar PBS para facilitar la conservación. En caso de los testículos, no se guardarán para residuos; se guardará la mitad de un testículo para histología y el resto (1 y medio) para enzimas. Los oviductos (hembras) serán pesados y luego descartados.

G- NERVIOS: guardar en freezer con PBS en 1 eppendorf para facilitar la conservación.

H- MÚSCULO: Guardar en freezer para determinar posteriormente la actividad enzimática y para el análisis de residuos de plaguicidas (1 eppendorf para enzimas, 1 bolsita para residuos). Eventualmente tomar una pequeña muestra de un individuo y guardar en alcohol puro para estudios de ADN. (1 eppendorf). Si pesa menos de 2 gr no se guardará para residuos.

I- PIEL: Guardar aproximadamente 1cm² en formol 10% para posteriores análisis de presencia de hongo quitridio y otros patógenos (1 eppendorf). Tomar la muestra del muslo ventral del miembro posterior.

J- DEDO: Guardar dedo mayor de miembro posterior para osteocronología en 1 eppendorf con formol.

Anexo I: Insumos necesarios con rótulos y soluciones a preparar:

INSUMOS

SANGRE

2 eppendorf de 2 ml con Drabkin para hemoglobina
1 eppendorf de 1,5 ml heparinizado para GRC
1 eppendorf de 1,5 ml para plasma
2 eppendorf con 2 ml de Natt Harrick para recuento celular
1 eppendorf de 1,5 ml con 1 ml de PBS para cometa
4 portaobjetos para frotis (se pone una gota de sangre en cada portaobjetos)

ÓRGANOS

Vesícula biliar: 1 eppendorf de 1,5 ml con 1 ml de agua destilada
Hígado: 2 eppendorf de 1,5 ml para enzimas e histología (con 1 ml de Karnovsky) y una bolsita para residuos
Digestivo: 1 bolsita con agujeros
Gónadas: 2 eppendorf de 1,5 ml para enzimas e histología (con 1 ml de Karnovsky) y una bolsita para residuos
Riñones: 1 eppendorf de 1,5 ml para enzimas
Cuerpos grasos: una bolsita para residuos
Músculo: 1 eppendorf de 1,5 ml para enzimas y una bolsita para residuos
Nervios: 1 eppendorf de 1,5 ml para enzimas
Piel: 1 eppendorf de 1,5 ml con formol 10%

Dedo: 1 eppendorf de 1,5 ml con formol 10%

Total de insumos por individuo:

3 eppendorf de 2 ml
13 eppendorf de 1,5 ml
5 bolsitas de plástico
4 portaobjetos

OTROS INSUMOS:

Caja de disección (tijeras, pinzas)
Capilares heparinizados
Jeringas con agujas heparinizadas
Masa para sellar capilares
Papel tissue
Caja Telgopor para muestras
Hielo

SOLUCIONES:

MS-222: diluir 1 gramo de MS-222 en 500 ml de agua de bioensayo y agregarle 1 gr de bicarbonato de sodio para neutralizar el pH porque al agregar MS-222 el pH es entre 3 y 4.

Heparina: diluir 80 μ l en 1 ml de agua destilada de heparina de 50000 UI cada 10 ml

Karnovsky: partes iguales de paraformol (PFA) 4% y glutaraldeído (GL). [Paraformol= 0,4 gr paraformaldeído + 10 ml agua destilada ---- Glutaraldeído= 10 ml tampón fosfato (PBS) + 1,6 ml glutaraldeído]

Agua destilada

PBS: 13.60 g fosfato monopotásico 0.1 M (PM: 136.09) + 17.42 g fosfato di potásico 0.1 M (PM: 174.18) en 1000 ml de agua destilada. Llevar a pH 7.

PBS para cometa: 2 g NaCl, 0,08 g KCl, 0,035 g KH₂PO₄, 0,227 Na₂HPO₄ y 250 ml H₂O destilada.

Alcohol 70% mezclar 700 ml de alcohol puro con 300 ml de agua

Alcohol 80% mezclar 800 ml de alcohol puro con 200 ml de agua

Alcohol 96%

Formol 10% mezclar 100 ml de formaldeído puro con 900 ml de agua

Reactivo de Drabkin 10% (para hemoglobina) mezclar 100 ml de solución Drabkin concentrada (Biopur) con 900 ml de agua destilada en frasco ámbar. Guardar en heladera. NO CONGELAR. Estable 6 meses

Natt & Harrick (tinción para recuento celular) para 1000 ml: 3,88 g de NaCl + 2,5 g de Na₂SO₄ + 2,91 g de Na₂HPO₄ 12 H₂O + 0,25 g de KH₂PO₄ + 7,5 ml de Formaldehido 40% + 0,1 g de Methyl violet 2B, enrasar a 1000 ml con agua destilada. **Nota:** Dejar la solución reposar por la noche. Filtrar antes de usar. *Disolver en el orden indicado y disolver en agua destilada hasta un volumen total de 1000 ml. Se deja 12 horas en reposo y posteriormente se filtra (paperWhatman n° 2). El pH final ha de ser de 7.3*

Metanol puro (para fijar frotis)

Solución salina fría 0,7% NaCl: Pesar 0,7 g de NaCl y mezclar con 100 ml de agua destilada.

EQUIPAMIENTO:

Balanza (dos: una para los individuos, y otra para los tejidos)
Calibre
Cámara de fotos con trípode
Micropipeta (10 μ l, 1000 μ l)
Centrífuga de hematocrito
Centrífuga para eppendorf

ANEXO II: MUESTRA DE SANGRE

Extracción:

La extracción puede realizarse a través de la vena abdominal, vena femoral, vena sublingual, o por punción cardíaca. Se utiliza jeringa heparinizada de 20g. Colocar el bisel hacia arriba y la jeringa alineada con la vena, no hacer presión con la mano sobre la vena. En caso de no poseer aguja o por decisión de la persona que realiza el procesamiento, puede realizarse la toma de sangre con un corte directo al corazón y tomando la sangre mediante capilares heparinizados. En caso de realizarse la extracción sin sacrificar al animal, la toma mínima segura variará según el peso del animal y el estado. El volumen de sangre de los anfibios varía entre el 7 y 10% del peso de anfibios terrestres y entre 13 y 25% en anfibios acuáticos. (TBV (Total Blood Volume) = peso en gramos*porcentaje en decimales). La extracción de sangre mínima segura es igual al 5 o 10% de TBV (SBV=TBV*0.05), y en un animal sano puede ser el doble (TBV*0,1). Por ej: un animal que pesa 35 gr y está enfermo, la toma mínima segura va a ser SBV= 35g*0.07*0.05= 0.12 ml) (Heatley, 2009).

Parámetros a medir:

Hematocrito (Pack Cell Volume-PCV): Llenar dos capilares por muestra (cada capilar tiene una capacidad de 80 μ l) y centrifugar en centrífuga para hematocrito. Medir mediante ábaco o tabla para hematocrito el porcentaje de Glóbulos Rojos (Relación de células con relación al plasma).

Hemoglobina: poner 10 μ l de muestra de sangre en 2 ml de solución Drabkin 10% y guardar en heladera en la oscuridad (estable 6 meses).

Recuento celular (Red Cell Blood-RCB): Poner 10 μ l de muestra de sangre en 2 ml de solución Natt Harrick. Se puede realizar el conteo al otro día (guardar en heladera hasta este momento).

Cometa: Poner 10 μ l de muestra de sangre en 1 ml de PBS. Guardar en heladera.

Conteo de leucocitos y eritrocitos: Realizar 3-4 frotis para posterior conteo de leucocitos, eritrocitos, y micronúcleos. Una vez terminado el procesamiento de los individuos y asegurándose que la sangre está seca, fijar con metanol. Dejar hasta el otro día y guardar. La tinción utilizada fue Wright Giemsa (1-colocar 30 gotas de solución

sobre todo el portaobjeto y dejar actuar durante un minuto; 2-agregar 30 gotas de agua destilada, y dejar actuar por 12-15 minutos; 3-enjuagar con agua de grifo y dejar secar).

La sangre restante se centrifuga durante 5 minutos en un eppendorf heparinizado y se separa el plasma y va directamente a freezer (2 eppendorf: **plasma** y **Glóbulos rojos** que es el original). Previo a llevar a freezer, los glóbulos rojos son sometidos a un lavado con solución salina 0,7% (0,7 gr en 100 ml de agua destilada). Se pone solución salina, se suspende el precipitado con vórtex, y se centrifuga durante 3-5 minutos y se quita el excedente de solución salina. Este procedimiento se repite 3 veces.