

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DE MÚLTIPLES FACTORES ESTRESANTES SOBRE LA
RESPUESTA INMUNE Y FISIOLÓGICA EN RENACUAJOS DE
LITHOBATES TAYLORI (ANURA: RANIDAE) EN COSTA RICA

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Biología para optar al grado y título de Maestría Académica en
Biología

ERICK BALLESTERO RODRÍGUEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2016

Dedicatoria

Dedico este trabajo a la memoria de mi padre Manuel Balletero, a 17 años de su partida sigue estando en la inspiración de cada cosa que realizo. También dedico esta tesis a la persona más fuerte que conozco, mi madre Xinia Rodríguez por todo el aprendizaje que me ha dado y que me ha inspirado a salir adelante a pesar de todas las dificultades que hemos afrontado. A mi bella esposa Karina Sánchez por su gran apoyo durante cada etapa de esta tesis, por su incansable paciencia e insistencia para culminar esta etapa de mi vida. A mis hermanos, Marcela, Jose y Mauricio, mi gran apoyo y una fuente de energía y amistad inagotable. A mi tutor y mentor de vida, Mahmood Sasa por todos los buenos y malos momentos que han llevado a un aprendizaje invaluable pudiendo lograr con éxito este gran paso de mi vida académica y personal.

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado gracias al esfuerzo de muchas personas e instituciones que me brindaron una mano para poder llevarlo a cabo. Agradezco a mi familia por el apoyo brindado durante todo este proyecto. A mi comité de tesis, Mahmood Sasa, Federico Bolaños y Clemens Ruepert, por su intenso apoyo y colaboración en el avance de esta tesis. Un especial agradecimiento a las personas que me ayudaron durante el trabajo de campo de esta investigación: Pablo Muñoz, Mauricio Rodríguez, Fabián Bonilla, Michael Méndez, Josimar Estrella, Andrea Corrales, Esteban Calderón y Grettel González.

También es importante agradecer al Dr. Bruno Lomonte, Dr. Jose María Gutierrez y a la Dra. Marietta Flores por todo el apoyo brindado durante el trabajo de laboratorio. A Randall Jiménez por su paciencia y ayuda en los análisis estadísticos. A la Dra. María Forzan y al M.Sc. Gilbert Alvarado por todo el asesoramiento en los diferentes procesos de los análisis ecoinmunológicos.

Agradezco al Sistema de Estudios de Posgrado (SEP) de la Universidad de Costa Rica por el apoyo económico brindado. A la empresa Florida Bebidas Ice & Farm por la donación de los bidones plásticos usados como mesocosmos. Un especial agradecimiento a la Universidad Withworth, especialmente a Priscilla Lara, Luz Merkel y a todo el staff de seguridad por todo el apoyo y facilidades brindadas durante el trabajo de campo de esta investigación. Agradezco al Dr. Jaques Robert del Instituto *Xenopus laevis* de la Universidad de Rochester, Nueva York, por el envío de las inmunoglobulinas de anfibio utilizadas en esta tesis.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Maestría Académica en Biología.”

Ph.D. Teresa Escalante

**Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado**

Ph.D. Mahmood Sasa Marín

Director de Tesis

M.Sc. Clemens Ruepert

Asesor

M.Sc. Federico Bolaños Vives

Asesor

Ph.D. Adarli Romero

**Representante del Director
Programa de Posgrado en Biología**

Erick Alonso Ballesterero Rodríguez

Candidato

Tabla de contenidos

Contenido	Página
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Tabla de contenidos.....	v
Resumen.....	viii
Lista de cuadros.....	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de anexos.....	xiii
CAPÍTULO 1: MÚLTIPLES FACTORES ESTRESANTES Y SU POSIBLE EFECTO EN LA RESPUESTA INMUNE DE POBLACIONES DE ANFIBIOS EN DECLINE: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
Decline de anfibios.....	1
Efecto de plaguicidas sobre poblaciones de anfibios a nivel mundial.....	7
Plaguicidas y su interacción con otros factores de estrés.....	12
Problemática de plaguicidas en Costa Rica y su posible relación con los declines de anfibios.....	13
Ecoinmunología.....	17
Sistema Inmunológico y Defensas contra patógenos en anfibios.....	20
Inmunidad innato.....	21
Inmunidad adaptativa.....	24

CAPÍTULO 2: EFECTO DE MÚLTIPLES FACTORES ESTRESANTES SOBRE LA RESPUESTA INMUNE Y FISIOLÓGICA EN RENACUAJOS DE <i>LITHOBATES TAYLORI</i> (ANURA: RANIDAE) EN COSTA RICA.....	29
Resumen.....	29
Palabras clave.....	30
Introducción.....	30
Materiales y Métodos.....	36
Sitio de Estudio.....	36
Colecta y Cuido de Animales.....	36
Diseño Experimental.....	38
Prueba de Persistencia de Plaguicidas.....	38
Experimento de Interacción de Plaguicidas y Riesgo de Depredación.....	40
Protocolo de Dopajes.....	43
Medición de Parámetros Físico-Químicos.....	43
Variables respuestas.....	44
Mediciones de Variables de Desarrollo.....	44
Mediciones de Variables Inmunológicas.....	45
Análisis Estadísticos.....	49
Resultados.....	50
Resultados de parámetros físico-químicos.....	50
Variables de desarrollo.....	51
Variables inmunológicas.....	52
Otras observaciones.....	54
Discusión.....	55

Conclusiones.....	60
Cuadros.....	62
Figuras.....	66
Referencias Bibliográficas.....	88
Anexos.....	101

Resumen

Costa Rica es uno de los principales sitios en el mundo donde se han reportado declines enigmáticos de anfibios. Uno de los principales factores que podrían estar afectando a las poblaciones de anfibios es la presencia de plaguicidas en sus hábitats, incluso también en ambientes protegidos. Un ejemplo de esto es la presencia de concentraciones altas de ciertos plaguicidas en bosques nubosos, transportados por medio de viento y lluvia desde los sitios de aplicación en las zonas bajas. Por otro lado, la presencia de plaguicidas en los ecosistemas puede interactuar con otros estresores naturales lo que podría generar mayor impacto en las poblaciones de anfibios. La presencia de estresores en el ambiente podría afectar el mecanismo de liberación y regulación de hormonas de estrés en anfibios, ocasionando una disminución en la respuesta inmune. *Lithobates taylori* es una especie de anuro que habita las zonas medias altas de la Cordillera Volcánica Central de Costa Rica, las poblaciones de esta especie en zonas altas han presentado disminuciones considerables en las últimas tres décadas. El objetivo de esta investigación es determinar y cuantificar el efecto de factores de estrés bióticos (depredación) y antrópicos (presencia de plaguicidas clorotalonil y endosulfán beta) sobre la respuesta inmune y fisiológica de los renacuajos de la especie *Lithobates taylori* de las partes altas del Valle Central de Costa Rica. Se utilizaron mesocosmos para realizar experimentos de exposición crónica a factores de estrés. Se escogieron 3 concentraciones de clorotalonil (0 µg/L, 1.5 µg/L y 15 µg/L), 3 concentraciones de endosulfán beta (0 µg/L, 0.2 µg/L y 2 µg/L) y la presencia o ausencia de una larva de odonato como depredador. El tamaño corporal y peso de renacuajos expuestos al plaguicida endosulfán beta disminuyeron significativamente, esto cuando se presentaba individual así como cuando estaba combinado con otros estresores. El grado de desarrollo larval fue acelerado por concentraciones altas de clorotalonil y desacelerado por concentraciones bajas de endosulfán beta. En cuanto a las variables inmunológicas, se encontraron aumentos en el número de neutrófilos ocasionados por el endosulfán beta. El clorotalonil en sus dos concentraciones aumentó el número de monocitos, eosinófilos y eritrocitos en sangre. Por último se encontró que el endosulfán beta aumenta la concentración de corticosteroides en sangre, esto como respuesta al estrés ocasionado por la exposición a este químico. A partir de estos resultados se concluye que la presencia de endosulfán beta y clorotalonil en las zonas altas de Costa Rica podría estar afectando considerablemente a las poblaciones de anfibios de que habitan estos lugares. Además mencionamos que la presencia de corticosteroides podría ser el enlace bioquímico entre el efecto ocasionado por factores estresantes y el decline de poblaciones de anfibios.

Lista de cuadros

- Cuadro 1.** Resumen del análisis de Manova realizado para el crecimiento de los renacuajos de *L. taylori* expuestos a factores de estrés.....p.61
- Cuadro 2.** Resumen del análisis de Manova realizado para los pesos de los renacuajos de *L. taylori* expuestos a factores de estrés.....p.61
- Cuadro 3.** Resumen del análisis de Manova realizado para los perfiles de leucocitos obtenido de los renacuajos de *L. taylori* expuestos a factores de estrés.....p.62
- Cuadro 4.** Resumen del análisis de Anova factorial realizado para los linfocitos en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a factores de estrés.....p.63
- Cuadro 5.** Efectos adversos ocasionados por los factores de estrés en los diferentes tratamientos analizados (C = clorotalonil, D = depredador, E = endosulfán beta, A = concentración alta, B = concentración baja).....p.63

Lista de figuras

- Fig. 1.** Hipótesis de factores estresantes y su posible impacto en la respuesta inmune y los declines enigmáticos poblacionales de anfibios.....p.65
- Fig. 2.** Imagen satelital de la las lagunas utilizadas en esta investigación, ubicadas en el Campus de la Universidad Withworth, Costa Rica.p.66
- Fig. 3.** Diseño experimental del efecto individual y sinérgico de diferentes factores estresantes sobre renacuajos de *L. taylori*. Efecto de dos plaguicidas (clorotalonil y endosulfán beta) con dos concentraciones diferentes y efecto de la presencia de depredadores en la respuesta inmune de larvas de anfibios.....p.67
- Fig. 4.** Curva de degradación del fungicida clorotalonil y del insecticida endosulfán beta, obtenida a partir de dopajes controlados en un mesocosmo experimental.....p.67
- Fig. 5.** Promedio de temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) tomadas semanalmente del agua de los mesocosmos utilizados en los experimentos de exposición a factores estresantes.....p.68
- Fig. 6.** Promedios de valores de pH tomados semanalmente del agua de los mesocosmos utilizados en los experimentos de exposición a factores estresantes.....p.69
- Fig. 7.** Promedio de valores de conductividad (dS/m) obtenidos semanalmente del agua de los mesocosmos experimentales.....p.69
- Fig. 8.** Promedios de crecimiento finales de los renacuajos de *L. taylori* expuestos de manera crónica a diferentes concentraciones del insecticida endosulfán beta.p.70

Fig. 9. Coeficientes de variación de los tamaños de los renacuajos de *L. taylori* expuestos a los diferentes factores de estrés.....p.71

Fig. 10. Promedios de pesos finales de los renacuajos de *L. taylori* expuestos de manera crónica a diferentes concentraciones del insecticida endosulfán beta.....p.72

Fig. 11. Coeficientes de variación de los pesos de los renacuajos de *L. taylori* expuestos a los diferentes factores de estrés.....p.73

Fig. 12. p. Probabilidad de que renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones del plaguicida clorotalonil puedan desarrollar estadios Gosner tempranos o avanzadosp.74

Fig. 13. Probabilidad de que renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones del plaguicida endosulfán beta puedan desarrollar estadios Gosner tempranos o avanzados.....p.75

Fig. 14. Proporción de renacuajos de *L. taylori* muertos luego de ser expuestos a factores estresantesp.76

Fig. 15. Promedios de neutrófilos totales en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones de endosulfán beta.....p.77

Fig. 16. Promedios de monocitos totales en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones de clorotalonil.....p.78

Fig. 17. Promedios de eosinófilos totales en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones de clorotalonil.....p.79

Fig. 18. Efectos sinérgicos observados en promedios de linfocitos totales en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones del plaguicida clorotalonil y la presencia o ausencia de depredador.....p.80

Fig.19. Efectos sinérgicos observados en promedios de linfocitos totales en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones de los plaguicidas endosulfán beta y clorotalonilp.81

Fig. 20. Promedio de eritrocitos totales en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones de clorotalonil.....p.82

Fig. 21. Promedio de leucocitos totales en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones de clorotalonil.....p.83

Fig. 22. Promedio de corticosteroides (pg/mL) en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones del insecticida endosulfán beta.....p.84

Fig. 23. Malformaciones en la cola encontradas en renacuajos de *L. taylori* expuestos al insecticida endosulfán beta.....p.85

Fig. 24. Exposición de intestinos encontrada en algunos renacuajos de *L. taylori* expuestos a factores de estrés.....p.86

Lista de anexos

Anexo 1. Masas de huevos de <i>L. taylori</i> colectadas en el área de estudio.....	p.99
Anexo 2. Larva de odonato (<i>Anax sp.</i>) utilizado como depredador en los experimentos de exposición a factores de estrés.....	p.100
Anexo 3. Sitio en donde se desarrollaron los experimentos de exposición de estrés utilizando mesocosmos.....	p.101
Anexo 4. Mesocosmos utilizados para realizar los experimentos de exposición a factores estresantes.....	p.102
Anexo 5. Protocolo de extracción y concentración de plaguicidas utilizados en microcosmos.....	p.102
Anexo 6. Jaula que contenía a los depredadores de los tratamientos de exposición a riesgo de depredación.....	p.104
Anexo 7. Protocolo de ELISA para corticosteroides utilizando volúmenes pequeños de suero/plasma.....	p.104
Anexo 8. Protocolo de cuantificación de corticosteroides en suero sanguíneo de anfibios.....	p.105
Anexo 9. Protocolo ELISAS para detección de inmunoglobulinas IgM e IgY.....	p.106
Anexo 10. Clasificación de leucocitos encontrados en sangre de renacuajos de <i>L. taylori</i> expuestos a factores estresantes.....	p.108

Anexo 11. Protocolo técnica Dot-Blotting para evaluar la efectividad de las inmunoglobulinas
IgM e IgY.....p.111

CAPÍTULO 1: MÚLTIPLES FACTORES ESTRESANTES Y SU POSIBLE EFECTO EN LA RESPUESTA INMUNE DE POBLACIONES DE ANFIBIOS: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Decline de anfibios

Se conocen más de 7500 especies de anfibios en el mundo (Frost 2015) cerca del 48 % presentan disminuciones en la abundancia de sus poblaciones y por ende están amenazadas con la extinción tanto a nivel local como global (Stuart *et al.* 2004, Hoffman *et al.* 2010). Este decline de especies de anfibios es uno de los fenómenos ecológicos más importantes que se han presentado a nivel mundial en las últimas décadas (Blaustein & Dobson 2006). La magnitud de esta crisis es tan grande que se teme que una de cada tres especies podría desaparecer en las próximas décadas (Young *et al.* 2004). Por esta razón ha sido catalogada por algunos autores como la sexta extinción masiva de especies ocurrida en la historia del planeta (Wake & Vredenburg 2008).

Los declines de anfibios se empezaron a registrar a mediados de los años 80s. A pesar de que algunas de ellas se detectaron en zonas altamente perturbadas resaltaban los declines en zonas protegidas, en donde no parecían ocurrir afectaciones antrópicas obvias (Wake 1991, Pounds & Crump 1994, Lips 1998, Gardner 2001). La gran mayoría de especies afectadas por este fenómeno habitan las elevaciones medias y altas de ambientes tropicales (Puschendorf *et al.* 2006). Pese a esto también se ha podido comprobar que algunas especies que habitan zonas bajas pueden ser afectadas por este decline (Whitfield *et al.* 2007). Este fenómeno de extinciones y declines poblacionales han ocurrido en muchos casos de manera súbita sin ninguna razón

aparente, por lo que se les ha llamado extinciones enigmáticas (Wake 1991). Esto ha motivado a la comunidad científica a trabajar intensamente para determinar cuáles son las causas del decline y cómo responder ante ellas para detener los declines poblacionales de anfibios (Pounds *et al.* 1997, Berger *et al.* 1998, Pounds *et al.* 1999).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar las extinciones enigmáticas. Entre ellas están la desaparición de la capa de ozono y su impacto directo en la exposición a radiación ultravioleta (Blaustein *et al.* 1996); la alta proliferación en el uso de plaguicidas en diferentes agroecosistemas que afectan de manera directa e indirecta a múltiples especies (Davidson 2004); la presencia de especies foráneas que compiten y/o depredan a las especies nativas (Knapp *et al.* 2007). Específicamente para explicar los declines en áreas tropicales se han elaborado dos hipótesis más. Una de ellas atribuye los declines al cambio climático que ha involucrado un calentamiento global afectando a todos los ecosistemas naturales (Pounds & Crump 1994). La otra hipótesis identifica como causa es la aparición de diferentes patógenos que causan enfermedades emergentes en regiones con decline (Carey 2000). Es claro que algunos de estos factores pueden actuar mediante sinergias, amplificando el efecto de cada factor por separado. Esto ha llevado a generar una hipótesis que atribuye que los declines enigmáticos se deben a los sinergismos de los factores antes mencionados (Root *et al.* 2003).

La hipótesis de la aparición de enfermedades emergentes plantea que una serie de patógenos altamente infecciosos, principalmente el hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), son los causantes de la extinción de especies. El *Bd* es un hongo no hifal que se caracteriza por infectar la piel de vertebrados, especialmente a salamandras y anuros. Una vez que infecta

la piel de un animal, perfora el estrato córneo y se alimenta del citoplasma de los queratocitos (Longcore *et al.* 1999). Este hongo produce lesiones cutáneas en los anfibios que tiene como resultado un desbalance hídrico debido a la respiración cutánea que se da en este tipo de organismos. Por otro lado como consecuencia de las lesiones producidas, se dan afectaciones a nivel cardíaco en el animal, así como infecciones bacterianas que a la postre ocasionan la muerte del individuo afectado (Ramsey *et al.* 2010). Debido a estas características se ha determinado que este hongo es una de las enfermedades más devastadoras y virulentas conocida para los anfibios (Lips *et al.* 2008). Una de las características más importantes y relevantes en cuanto a los declines, específicamente a los ocurridos en sitios con elevaciones intermedias, es que este patógeno se ve favorecido por las temperaturas y humedad que dominan en estos lugares; lo que podría relacionar al *Bd* con la gran desaparición de cerca del 40% de las especies de anfibios que habitan estos sitios (Collins & Storfer 2003, Kilpatrick *et al.* 2010).

Pese a que el patógeno antes descrito es el que mayormente podría explicar las desapariciones enigmáticas de anfibios, cabe destacar que hay otros patógenos que podrían estar involucrados y que podrían ser igualmente importantes para entender dichos declines. En las zonas templadas los patógenos más importantes son el hongo *Ichthyophonus* sp., el trematodo *Ribeiroia ondatrae* y el hongo *Saprolegnia ferax* (Daszak *et al.* 1999). Pero entre ellos los patógenos más virulentos se encuentran el *Ranavirus* sp. Este virus pertenece al grupo altamente letal llamado Iridovirus. Los *Ranavirus* pueden infectar una gran cantidad de invertebrados y vertebrados ectotérmicos (De Voe *et al.* 2004). Los patrones de infección producidos por estos patógenos difieren considerablemente a los ocasionados por infecciones de *Bd*. Esto se debe a que las mortalidades están usualmente relacionadas a áreas geográficas pequeñas, como lo

pueden ser inclusive pequeñas charcas. En estos lugares infectados con *Ranavirus*, las larvas y/o metamorfos tienden a presentar graves lesiones cutáneas y daños en órganos internos que producen en la mayoría de ocasiones, una rápida muerte de los individuos afectados (Carey 2000, Hussain & Pandit 2012). Las infecciones por *Ranavirus* en las zonas templadas suelen presentarse en la mayoría de ocasiones en sitios perturbados por el ser humano y con altas densidades de individuos (Carey 2000). Además este tipo de infecciones resultan usualmente en altas morbilidades y mortalidades en las especies susceptibles a este patógeno. Por otra parte se ha descubierto que estos patógenos son responsables por fenómenos epizooticos que han infectado a peces, reptiles y anfibios en cautiverio (Brunner *et al.* 2004, De Voe *et al.* 2004, Brunner *et al.* 2005). Una característica importante que poseen algunos de los *Ranavirus* es que afecta a poblaciones de algunos anfibios y no permanece viable en el ambiente como lo hacen otros virus, por lo que se descubrió que poseen otros hospederos que permiten que la enfermedad continúe presente en el ambiente por mucho tiempo (Brunner *et al.* 2004). Cabe destacar que la presencia de *Bd* y *Ranavirus* se pueden presentar en el mismo individuo, aumentando así el efecto sistémico de los anfibios infectados (Whitfield *et al.* 2013).

Recientemente, se describió la presencia de un nuevo patógeno que produce chitridiomycosis en salamandras, denominado *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*). Este patógeno ha afectado una serie de especies de salamandras en Europa, produciendo sintomatologías similares a las causadas por *Bd* en anuros (Martel *et al.* 2013, 2014). El posible impacto que puede generar este hongo en las poblaciones de salamandras mundiales es preocupante, especialmente porque puede esparcirse rápidamente debido al tráfico ilegal de

especies, pudiendo generar declines poblacionales y extinciones de especies como las ocasionadas por el *Bd* (Martel *et al.* 2014).

Pese a que se han llevado a cabo intensas investigaciones para determinar el efecto de los patógenos mencionados anteriormente (Carey *et al.* 2003, Brunner *et al.* 2005, Lips *et al.* 2008, Buck *et al.* 2012), no se ha podido llegar a una conclusión en concreto de cuáles son los factores ambientales o antrópicos que ocasionan que estas enfermedades afectan a los anfibios. Esto tiene especial interés si se toma en cuenta que todas las enfermedades mencionadas anteriormente especialmente el *Bd* y *Ranavirus* sp. pertenecen a grupos de patógenos oportunistas, los cuales se caracterizan por atacar a sus hospederos cuando estos se encuentran vulnerables por diferentes situaciones.

Actualmente se reconoce la presencia de *Bd* en especímenes de museo colectados antes de que sucedieran los declines (Puschendorf *et al.* 2006). Por otra parte, se han encontrado variaciones en el grado de infección entre diferentes especies de anfibios. Además se ha podido corroborar la presencia de diferentes factores de resistencia ante patógenos, como lo son la producción de péptidos antimicrobianos en la piel, lo que indica que algunas especies de anfibios pueden sobrevivir a la presencia de este patógeno y otras enfermedades emergentes (Rollins-Smith *et al.* 2005, 2011). Debido a las variaciones en infecciones y susceptibilidad ante el *Bd* de diferentes especies de anfibios, se ha formulado una hipótesis que intenta explicar los declines enigmáticos desde el punto de vista del efecto del estrés sobre los anfibios (Carey *et al.* 2003, Collins & Storfer 2003, Davidson 2004, Pounds *et al.* 2006). Esta hipótesis plantea que una serie de factores presentes en el ambiente, tanto bióticos como abióticos, producen un descenso en

la inmunocompetencia de los organismos, ocasionando que sean susceptibles ante la infección de diferentes patógenos (Lips *et al.* 2008).

La hipótesis de los factores estresantes supone que los estresores externos como el riesgo de desecación, alta densidad de depredadores, plaguicidas en el agua y/o en el aire, poca disponibilidad alimenticia, alta densidad de competidores conspecíficos y/o heteroespecíficos (Thiemann 2000, Koprivnikar *et al.* 2006) pueden afectar la corteza suprarrenal de los anfibios. La corteza suprarrenal es la encargada de modular la liberación de hormonas de estrés (glucocorticosteroides), conocidas por ocasionar un efecto de inmunosupresión en animales. Esta reducción de la respuesta inmune puede ocurrir cuando estas hormonas están presentes en altas cantidades. Como resultado, el individuo redestina la energía y recursos originalmente destinados a procesos no indispensables a corto plazo (sistema inmune, reproducción, alimentación, etc.) con el fin de obtener toda la energía disponible para responder ante los factores de estrés y llevar a cabo las funciones necesarias para sobrevivir (McMahon *et al.* 2011, Martin *et al.* 2010).

El proceso definido anteriormente se ejemplifica en la Fig. 1. Los corticosteroides son las hormonas que se liberan por medio de la corteza suprarrenal en respuesta a algún tipo de situación de estrés en la que se encuentre el animal. Dicho proceso ocurre cuando algún estímulo físico, social y/o ambiental es detectado por el hipotálamo el cuál en respuesta a esto libera el factor liberador de corticotropina. Este último es un péptido que regula la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) desde el interior de la pituitaria. La ACTH actúa sobre la corteza adrenal para la liberación de glucocosteroides; que en el caso de los anfibios es

representado por los corticosteroides (Wingfield & Sapolsky 2003). Estas hormonas también cumplen un importante papel en otras actividades fisiológicas dentro de los anfibios ya que participan activamente en los procesos de metamorfosis accionando el sinergismo de las hormonas de la tiroides durante la morfogénesis en el estado clímax de la metamorfosis (Belden & Kiesecker 2005).

Entre los diferentes factores de estrés cabe destacar el amplio uso de plaguicidas sintéticos en cultivos agrícolas (Davidson 2004, Linder *et al.* 2010). Los residuos de plaguicidas generados se pueden dispersar a escala local o global, afectando a los organismos bajo distintos tipos y concentraciones de estos contaminantes (Sparling *et al.* 2001, Hussain & Panduit 2012). Es por estas razones que se han sugerido a los plaguicidas como un factor determinante en los declives de anfibios (Sparling 2010).

Efecto de plaguicidas sobre poblaciones de anfibios a nivel mundial

El uso de plaguicidas ha ido en aumento en los cultivos agrícolas (Ramírez *et al.* 2009), especialmente en los países en vías de desarrollo (Castillo *et al.* 1997). A pesar de las ventajas a nivel productivo que ofrecen estas sustancias, el mal uso de los agroquímicos así como la dispersión de los mismos fuera de las áreas de cultivos genera una alta contaminación en los ecosistemas acuáticos que se encuentran cercanos a los puntos de aplicación (Carter 2000, Muir *et al.* 2004, Daly *et al.* 2007a). Esta situación permite el desplazamiento de estos compuestos hasta distancias considerables respecto de la zona de aplicación. Además, ocasiona diferentes niveles de exposición de una gran variedad de sustancias con distinta capacidad de persistencia y

acumulación generando efectos adversos en la salud de muchos grupos de animales (McMahon *et al.* 2011).

Los efectos nocivos producidos por diferentes tipos de plaguicidas influyen directamente en la salud de estos animales y de sus poblaciones (Hansen & Johnson 1999). Estos efectos nocivos afectan especialmente a los anfibios (Bridges & Boone 2002, 2004, Hayes *et al.* 2006) debido a que estos organismos son altamente vulnerables por la alta permeabilidad de su piel, lo que ocasiona que los contaminantes sean absorbidos rápidamente por su cuerpo (Rohr & Palmer 2005). Además para muchas especies de anfibios la exposición a plaguicidas es mayor durante sus estadios de desarrollo embrionario y larval, momento en que están confinados a los cuerpos de agua donde la mayoría de contaminantes se acumulan y concentran (Lehman & Williams 2010).

Generalmente, la exposición de plaguicidas en la naturaleza no suele presentarse en concentraciones ambientales que ocasionen efectos letales en los anfibios. Sin embargo, la exposición aguda o crónica de estas sustancias puede estar teniendo una mayor relevancia en las muertes masivas de anfibios (Bridges 1997). Por último cabe destacar que los plaguicidas no solo afectan la salud corporal del animal sino también en su ecología. Esto ocurre mediante la interferencia en la productividad del zooplancton y fitoplancton de los cuales muchos se alimentan (Gagnetén 2002, Rohr & Crumrine 2005, Buck *et al.* 2012).

El efecto de los factores de estrés mencionados anteriormente en los anfibios ha sido ampliamente documentado en la afectación de diferentes procesos fisiológicos (Lehman & Williams 2010). Tal es el caso de la especie *Rana temporaria*, en donde concentraciones subletales

de endosulfán producen comportamientos anormales en sus renacuajos (Denoel *et al.* 2012), mientras que este mismo plaguicida inhibe el deseo de alimentarse de los adultos de *Litoria freycineti*, lo que retarda su crecimiento y los hace más propensos a depredadores (Broomhall & Shine 2003).

Se ha encontrado que la interacción de dos plaguicidas produce mayores efectos adversos que cada uno por separado. Combinaciones de los siguientes plaguicidas a una concentración de 1 mg/L: el herbicida glifosato, los insecticidas carbaril, malatión y diazinón, disminuyen significativamente la sobrevivencia y crecimiento en renacuajos de cinco especies de anuros (*Lithobates pipiens*, *L. clamitans*, *L. catesbeianus*, *Anaxyrus americanus* e *Hyla versicolor*). (Relyea 2004). Adicionalmente, Hayes *et al.* (2006) demostraron que una mezcla de nueve plaguicidas (cuatro herbicidas, dos fungicidas y tres insecticidas) que se utilizan conjuntamente en los campos de maíz en Estados Unidos y a una concentración ecológica relativamente baja (0.1 µg/L) ocasionó efectos dramáticos en el crecimiento y desarrollo de renacuajos de *Lithobates pipiens* por exposición crónica. En ese estudio, también se observó en los renacuajos expuestos un retraso para iniciar la metamorfosis y un menor tamaño que renacuajos sin exposición. Relyea *et al.* (2005) encontró que los plaguicidas Roundup (Glifosato) y Malatión, tienen efectos positivos y negativos que afectan directa o indirectamente a los renacuajos expuestos. Particularmente estos plaguicidas aumentan la mortalidad afectando negativamente la supervivencia de los mismos, mientras que la biomasa de las larvas de las especies de ranas *Hyla versicolor*, *Bufo americanus* y *L. pipiens* aumenta debido a la proliferación en la abundancia de algas.

Además de los efectos toxicológicos expuestos arriba, llama la atención los efectos de los plaguicidas a nivel endocrino e inmune. Dentro de los estudios que se han realizado sobre este tema destaca el llevado a cabo por Gendron *et al.* (2003). En este estudio se encontró que algunos plaguicidas, específicamente una combinación de dos herbicidas (atrazina y metribuzina) y cuatro insecticidas (endosulfán, lindan, aldicarb y dieldrin), no influyen en el porcentaje de infección producido por nemátodos en su hospedero la Rana leopardo (*L. pipiens*). Sin embargo se encontró que los individuos expuestos a la mezcla de plaguicidas presentaban un mayor crecimiento y maduración de los gusanos. De aquí los autores concluyen que los plaguicidas influyen en la respuesta inmune de los mismos, reduciendo así su capacidad de respuesta de eliminación y control de la infección de parásitos. Bridges & Boone (2002) encontraron que en anfibios expuestos al plaguicida carbaril combinado con diferentes intensidades de rayos UV, pueden ocasionar la proliferación de parásitos debido a la disminución en las defensas corporales de los animales afectados. Además de esto también se comprobó que el estrés adicional provocado por la presencia de plaguicidas afecta la homeostasis del animal y en algunos casos produce heridas corporales afectando el valor adaptativo de estos individuos.

Uno de los plaguicidas más estudiados que podría provocar efectos dañinos en los anfibios y en otros vertebrados ectotérmicos es la Atrazina. Este herbicida no está directamente relacionado a altas mortalidades en individuos expuestos, sin embargo posee efectos subletales que afectan el desarrollo de los renacuajos (Rohr *et al.* 2006, Rohr & McCoy 2010). Entre ellos destaca la afectación en el tiempo de desarrollo de los renacuajos, ya que en algunas ocasiones puede adelantar el proceso de metamorfosis, mientras que en otros atrasa dicho proceso (Larson *et al.* 1998, Freeman *et al.* 2005). Por otro lado también se reporta afectación en la actividad de

los renacuajos expuestos al plaguicida así como disminución en los comportamientos antidepredatorios (Rohr & McCoy 2010). La Atrazina es reconocida como un plaguicida con capacidad de provocar disrupción endocrina, exposiciones a concentraciones subletales de este químico ocasionan castración y feminización en larvas de anfibios machos. Este efecto tiene consecuencias a nivel poblacional ya que tiene la capacidad de afectar la reproducción de anfibios expuestos a este herbicida (Hayes *et al.* 2006). Además de esto, la atrazina disminuye la capacidad inmunológica de larvas de anfibios en un 77 %, lo que ocasiona que sean más propensos a focos de infección por parásitos, virus y bacterias (Kiesecker 2002, Forson & Storfer 2006, Rohr *et al.* 2008, Langerveld *et al.* 2009). Cabe destacar que recientemente se encontró que el fungicida clorotalonil está relacionado en la inmunosupresión de algunas especies de anfibios. Se determinó que este fungicida tiene una incidencia entre el 87 al 100 % en la mortalidad de los renacuajos de las especies *Osteopilus septentrionalis* y *Rana sphenoccephala* expuestos a diferentes concentraciones de dicho compuesto. En la misma investigación se encontró que mediante experimentos llevados a cabo en el laboratorio, las concentraciones altas (82 µg/L) y bajas (0,0164 µg/L) producen mortalidades de hasta el 100 % de los individuos expuestos de las especies *Osteophilus septentrionales*, *Hyla squirella* e *Hyla cinerea* (McMahon *et al.* 2011).

El efecto de plaguicidas sobre poblaciones de anfibios de zonas medias-altas ha sido reportado principalmente en zonas templadas por Davidson (2004), el cuál encontró una fuerte correlación entre el traslado aéreo del plaguicida carbaril hacia las zonas altas y el decline de las poblaciones de varias especies del género *Rana* que habitan estas zonas. Teniendo uno de los mayores impactos sobre la especie *Rana cascades*, reconocida por el estado crítico de sus poblaciones (Buck *et al.* 2012). En otro caso, Davidson & Knapp (2007) encontraron que existe

un efecto directo de plaguicidas transportados por viento en las montañas de Sierra Nevada, California sobre las poblaciones de *Rana muscosa* que habitan zonas prístinas de esta zona montañosa.

Plaguicidas y su interacción con otros factores de estrés

En los últimos años se ha incrementado el número de investigaciones que se enfocan en los efectos producidos por la exposición a tóxicos en anfibios e interacción con otros factores estresantes (Boone & Semlitsch 2002, Boone & James 2003, Rohr *et al.* 2004, Lehman & Williams 2010, Buck *et al.* 2012). Uno de estos factores ambientales que influyen en el desarrollo de los anfibios en los ecosistemas, es el efecto producido por la presencia de depredadores en los sitios de desarrollo de los renacuajos. Seiter (2009) mostró que la presencia de depredadores reduce la respuesta inmune en las larvas de la especie *Rana sylvatica*. Esto ocasiona un descenso en la inmunocompetencia durante la metamorfosis. Este efecto puede provocar que la exposición ante depredadores reduzca la respuesta inmune y las poblaciones de anuros sean vulnerables no solo a depredadores sino también a parásitos. Bajo estas circunstancias los parásitos oportunistas se pueden aprovechar de la baja cantidad de defensas contra ellos por parte de los hospederos (Seiter 2009). Además de esto, se ha demostrado que los depredadores acuáticos de larvas de anfibios son capaces de emitir señales químicas de depredación. Estas señales son capaces de generar estrés reduciendo la actividad y crecimiento de los renacuajos. Las señales químicas pueden interactuar con plaguicidas, incentivando respuestas. Así por ejemplo, el insecticida inhibidor de colinesterasa carbaril causa altos niveles de mortalidad en renacuajos de *Hyla*

versicolor (Relyea & Mills 2001). El carbaril cuando se encontró solo y a concentraciones bajas produjo pequeños impactos en la sobrevivencia de los renacuajos. Sin embargo cuando estuvo en combinación con señales químicas de depredación, la mortalidad de los renacuajos incrementó entre 2 a 4 veces (Relyea & Mills 2001). Con el fin de examinar si este fenómeno se presenta en más especies con este mismo plaguicida, Relyea (2003) examinó la supervivencia en seis especies más de anuros. Se encontró en dos de las seis especies que el carbaril es hasta 46 veces más letal cuando se combina con las señales químicas que cuando se presenta solo y a bajas concentraciones. Johnson *et al.* (2013) no observaron un efecto sinérgico en la supervivencia y biomasa de renacuajos de *A. callidryas* ante el riesgo de depredación con clorotalonil y endosulfán durante una exposición aguda.

Problemática de plaguicidas en Costa Rica y su posible relación con los declines de anfibios

En Costa Rica, la problemática en el uso de plaguicidas tiende al aumento, debido a los cultivos intensivos de banano, café, piña y melón entre otros. Actualmente el país está entre los países con mayores índices de importación de plaguicidas por habitante y área agrícola a nivel mundial (Ramírez *et al.* 2009); de hecho el país pasó de importar 2,648 toneladas métricas de ingrediente activo en 1977 a 11,636 toneladas en el 2006, lo que representa un aumento del 340% en un periodo de 30 años. Cabe destacar que de las toneladas de producto activo importado, el 20 % es reformulado en nuestro país y exportado (Ramírez *et al.* 2009). Durante este tiempo en donde se dio un incremento en el consumo y utilización de sustancias químicas, también

comenzaron a suceder los declines poblacionales de anfibios, por lo que estos dos fenómenos podrían estar relacionados entre sí.

Son pocos los estudios que se han realizado en cuanto al efecto de plaguicidas sobre poblaciones de anfibios en Costa Rica, pese a que el uso de los mismos es sumamente preocupante (Sasa *et al.* 2010). Uno de los pocos esfuerzos que se han llevado a cabo es el de Klemens *et al.* (2003). En este estudio se encontró la presencia de plaguicidas organoclorados en varias especies de anfibios, tortugas y ratones en el Parque Nacional Santa Rosa. Las especies de anfibios en donde se encontró estos químicos fueron *Rhinophrynus dorsalis*, *Lithobates forreri* y *Rhinella marina*. Estos datos muestran que especies que son muy poco frecuentes de observar como lo es *R. dorsalis* (los individuos solamente salen a la superficie pocos días al año para reproducirse), son afectados también por plaguicidas. Por otro lado, Ghose *et al.* (2014) recientemente analizó el efecto de los diez plaguicidas más usados en las actividades agrícolas de nuestro país. El propósito del estudio fue determinar las concentraciones letales y subletales que tienen efectos sobre la fisiología de la especie *Agalychnis callidryas*. Se encontró que los mayores efectos los producen los nematicidas terbufos, etofos y especialmente el fungicida clorotalonil, el cual presentó la toxicidad más alta de todos los plaguicidas analizados.

En las últimas décadas, se ha reportado la aparición de principios activos de plaguicidas condensados en las nubes de varias zonas protegidas de Monteverde, Volcán Poas y Volcán Barva (Castillo *et al.* 2006, Daly *et al.* 2007a). Estos sitios han sido históricamente los principales focos de extinción de especies de anuros en nuestro país (Pounds & Crump 1994, Bolaños 2009). Por lo que el efecto de los plaguicidas que se trasladan por aire hacia las zonas montañosas toma

especial interés si se toma en cuenta la gran utilización de plaguicidas en el sector agrícola de zonas bajas como lo son el Caribe y la zona Norte de Costa Rica.

En muestras de suelo de bosques nubosos de zonas medias-altas de Costa Rica se han encontrado las concentraciones más altas de ciertos plaguicidas comparadas con el resto del país. Esto se debe a que los suelos de estos lugares tienen mayor retención de plaguicidas debido a las bajas temperaturas y a la alta cantidad de materia orgánica que disminuyen la volatilización y degradación de los mismos (Daly *et al.* 2007a). Por otro lado, Shunthirasingham *et al.* (2011) confirman la presencia de dacthal, clorotalonil, endosulfán y sus metabolitos; en zonas montañosas de Costa Rica, debido al transporte atmosférico y posterior deposición tanto en suelo como en agua de lagos, ríos y bromelias de bosques de estos sitios.

Dos de los plaguicidas mencionados anteriormente son tomados con especial interés debido a su amplio uso en Costa Rica, así como su reconocida toxicidad para los anfibios. El clorotalonil es un fungicida que es muy utilizado para el control de infestaciones de hongos y bacterias en cultivos (Chaves *et al.* 2007). En Costa Rica es el tercer plaguicida más utilizado (i.e. plantaciones de banano, café, melón y piña) y existen reportes que el clorotalonil en algunas plantaciones de banano ha sido aplicado en el mismo sitio entre 45 a 60 veces por año (Castillo *et al.* 2000) y en cantidades mayores a 1.4 litros por hectárea (Chaves *et al.* 2007). La presencia de este compuesto se ha reportado en sistemas acuáticos de la zona Atlántica de Costa Rica con concentraciones entre 8 y 11 $\mu\text{g/L}$ (Castillo *et al.* 1997).

Por otro lado, el endosulfán es un acaricida perteneciente al grupo de los plaguicidas organoclorados. Este grupo de plaguicidas se caracteriza por acumularse en el tejido de los

animales así como por persistir mucho tiempo en el ambiente (Wieland *et al.* 2000). El endosulfán puede ocasionar mortalidad de organismos así como importantes efectos subletales que afectan tanto la fisiología de los animales así como otros procesos nerviosos y de comportamiento (Denoel *et al.* 2012). En el año 2007 se importaron 42 475 kilogramos de ingrediente activo endosulfán en Costa Rica. El endosulfán se compone de dos isómeros, el endosulfán alfa y el endosulfán beta, ambos presentan alta persistencia en el ambiente (Ernst *et al.* 1991). En las aguas superficiales del país se han encontrado concentraciones de endosulfan alfa y endosulfan beta entre 0.02 – 9.3 µg/L y 0.04 – 8.9 µg/L respectivamente (Bejarano *et al.* 2009).

La carencia de investigación en los trópicos sobre el efecto de plaguicidas sobre las poblaciones de anfibios de bosques de altura es preocupante, debido a que los plaguicidas se comportan de diferente manera en estos sitios (Burkhart *et al.* 2003). Dichas variaciones se deben entre otros a las diferencias de temperatura, pH, dureza y carbono orgánico disuelto en el agua; esto influye en los mecanismos asociados con la degradación, movilización y metabolismo de los plaguicidas influyendo en la toxicidad de los mismos (Heugens *et al.* 2001, Boone *et al.* 2003). Otro aspecto importante importante puede ser que en los trópicos se siguen aplicando plaguicidas que por su alta toxicidad han sido eliminado en países desarrollados (Burkhart *et al.* 2003).

En los trópicos, específicamente en Latinoamérica es donde habitan la mitad de las especies de anfibios del mundo (Duellman 1999), muchas de las cuales se encuentran amenazadas (Young *et al.* 2001). Por estas razones es urgente elaborar investigaciones experimentales que brinden información que permita identificar y conocer la sensibilidad que

presentan los anfibios ante la exposición a plaguicidas e inclusive interacciones entre múltiples estresores (i.e plaguicidas y competencia, riesgo de depredación, enfermedades). Para esto es importante no solo tomar en cuenta factores estresantes antrópicos sino también analizar cómo interactúan los mismos con otros factores de estrés naturales, como es el caso de la presencia de depredadores, competencia intra e interespecífica, riesgo de desecación, estrés alimenticio y pérdida de hábitats (Buck *et al.* 2012).

Con respecto al estado poblacional de anfibios en el país, Costa Rica posee 203 especies de anfibios (Bolaños *et al.* 2011), de las cuales un 32.3 % se encuentra en peligro crítico o extintas según las categorías de la UICN (Bolaños 2009). Dichas extinciones y declines de poblaciones han sido documentadas en su mayoría en las zonas montañosas de nuestro país, siendo algunos lugares como Monteverde (Pounds & Crump 1994) y Las Tablas (Lips 1998) un ejemplo claro de la problemática que están viviendo los anfibios. Sin embargo, también en sitios de bajura se han reportado declines importantes, tal es el caso de lo documentado por Whitfield *et al.* (2007) en la Estación Biológica La Selva. Pese a la problemática antes descrita, el panorama en general del estado de las poblaciones de anfibios en Costa Rica podría no tener un futuro tan negativo, ya que muchas de las especies que declinaron en la década de los 80 y 90 han empezado a recuperar sus poblaciones, situación que está siendo analizada para determinar cuáles son las razones de este fenómeno (Bolaños 2009).

Ecoimmunología

La ecoinmunología es una disciplina emergente desarrollada por ecólogos y biólogos evolucionistas que busca entender desde el punto de vista fisiológico, ecológico y evolutivo, como los cambios y variaciones en la respuesta inmune de los hospederos contribuyen con el desarrollo de enfermedades (Demas *et al.* 2011, Downs *et al.* 2014). Este campo se basa en comprender el estado de salud del animal y su correlación con el ambiente en donde habita (Martin *et al.* 2014). La ecoinmunología también se encarga de desarrollar técnicas inmunológicas para evaluar las funciones inmunes en animales de vida silvestre en el campo y no en laboratorios especializados (Martin *et al.* 2010, Demas *et al.* 2011), tanto técnicas inmunológicas básicas como fundamentos conceptuales de diferentes áreas de la salud de animales (Brock *et al.* 2014).

Las técnicas de ecoinmunología permiten determinar si hay un efecto negativo en los sistemas innato y adaptativo, midiendo el efecto producido por diferentes sustancias. El efecto desarrollado por hormonas de estrés como los corticosteroides es de especial interés ya que son liberadas como respuesta ante diferentes situaciones en donde el animal redestina sus fuerzas para superar los factores de estrés a los que está expuesto (Davis *et al.* 2008). Una vez que se liberan estas hormonas, se da una inmunosupresión por parte del animal, reduciendo su respuesta ante procesos de respuesta inmune como lo son procesos inflamatorios, fiebre, liberación de anticuerpos, etc (Warne *et al.* 2015).

Con el fin de medir el estado del sistema inmune se utilizan técnicas que evalúan diferentes partes del sistema inmunitario. Tal es el caso de mediciones del sistema inmune innato como es la efectividad de los péptidos antimicrobianos que poseen los anfibios en su piel, los cuáles se encargan de destruir cualquier antígeno que quiera ingresar por vía cutánea (Kindt *et al.*

2007, Demas *et al.* 2011). También se utiliza la medición de la efectividad del complejo del complemento, el cual se encarga de dañar las membranas de microorganismos patógenos que ingresan al organismo (Pastoret *et al.* 1998, Demas *et al.* 2011). Otras técnicas inmunológicas utilizadas en vida silvestre son las medidas hematológicas como los conteos de glóbulos rojos y blancos totales, así como conteos diferenciales de leucocitos o perfiles leucocitarios (Martin *et al.* 2010). Estas medidas dan información del estado de salud del animal. Otro ejemplo es la proporción de neutrófilos y linfocitos, la cual es utilizada para establecer estrés en los animales (Davis *et al.* 2008). Para evaluar el estado de la inmunidad innata se puede utilizar los desafíos de eliminación de bacterias, con esta técnica se mide la habilidad que tiene una muestra de sangre fresca de matar bacterias *ex vivo* (Millet *et al.* 2007). Otras técnicas incluyen el análisis del tamaño de tejidos linfoides, citometría de flujo, análisis de citotoxicidad de células NK y análisis de la habilidad fagocitaria de macrófagos (Demas *et al.* 2011).

En cuanto a la evaluación del sistema inmune adaptativo, es necesario la utilización de inmunoensayos utilizando diferentes variaciones de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), con el fin de cuantificar anticuerpos circundantes (Lomonte 2007, Demas *et al.* 2011). También se utilizan esquemas de infección con diferentes patógenos para establecer la resistencia de los animales expuestos y la efectividad de todos los componentes del sistema inmunitario (Demas *et al.* 2011).

La utilización de dichas técnicas permite una mejor visión del estado de salud de muchos animales *in situ*, con lo que podemos establecer directamente cuáles son los efectos nocivos que

pueden ocasionar daños fisiológicos en los individuos, y que a posteriori pueden influir en el estado de las poblaciones silvestres (Martin *et al.* 2010, Warne *et al.* 2015).

En los últimos años se ha evaluado el papel que cumplen una diversidad de péptidos antimicrobianos que se encuentran en la piel de los anfibios y como estos varían entre especies. Esta variación es uno de los enfoques más importantes para entender como algunos patógenos afectan con mayor intensidad a algunas especies mientras que otras pueden sobrevivir y convivir con los patógenos (Young *et al.* 2014, Rumschlag & Boone 2015).

Sistema inmunológico y defensas contra patógenos en anfibios

Para entender el mecanismo por el cual se produce inmunosupresión en los renacuajos se debe conocer el funcionamiento básico del sistema inmunológico. La respuesta inmune de un organismo consiste en todos los mecanismos llevados a cabo por el cuerpo en defensa de este ante organismos o agentes extraños a él. Kindt *et al.* (2007) indican que hay tres funciones fundamentales del sistema inmune:

- Defensa: reconocimiento y eliminación de agentes infecciosos intra y extracelulares.
- Homeostasia: reconocimiento y eliminación de células del organismo envejecidas, mutadas o dañadas; funciones de regeneración y reparación de tejidos dañados.
- Vigilancia: reconocimiento y eliminación de células que expresan mutaciones.

El sistema inmune de anfibios es muy similar al encontrado en otros grupos de vertebrados (Pastoret *et al.* 1998), por lo tanto uno de los principales modelos no mamíferos utilizado en investigaciones inmunológicas es la especie *Xenopus laevis* (Robert & Ohta 2009). Esto ha podido generar información sobre el desarrollo evolutivo del sistema inmune hasta su desarrollo máximo en mamíferos.

El sistema inmunológico de los anfibios esta categorizado en dos tipos interconectados de respuestas inmunes, conocidos como: sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo (Carey *et al.* 1999).

Sistema inmune innato

La inmunidad innata es un componente menos específico que actúa como primera respuesta de defensa ante infecciones; este tipo de inmunidad está compuesto por un grupo de mecanismos que no son específicos a patógenos en particular, sino que incluyen una gran variedad de componentes celulares y moleculares con la finalidad de prevenir o eliminar los focos de infección en los primeros momentos de infección (Pastoret *et al.* 1998). En la mayoría de fenómenos de infección que ocurren en un organismo, la inmunidad innata se encarga de impedir de manera altamente eficaz la mayoría de infecciones desde su inicio o en las primeras horas después de su primer contacto con este tipo de inmunoreacción (Kindt *et al.* 2007).

Dentro de los procesos de la inmunidad innata en anfibios destacan las barreras físicas que forman un obstáculo para los patógenos. Las principales barreras físicas son la piel, las membranas mucosas, la acidez estomacal y los péptidos antimicrobianos (Carey *et al.* 1999,

Ramsey *et al.* 2010). Para los anfibios estas barreras son muy importantes ya que al poseer una piel permeable es la principal arma que poseen para enfrentarse a patógenos y contaminantes externos (Richmond *et al.* 2009). Algunas especies poseen péptidos antimicrobianos que tienen la habilidad de generar resistencia ante la presencia del Bd al inhibir el crecimiento de sus zoosporas, lo que hace a estas especies resistentes a este patógeno vinculado con los declines (Rollins-Smith *et al.* 2005, Richmond *et al.* 2009, Rollins-Smith *et al.* 2011).

Otros procesos de defensa que tiene la inmunidad innata son la presencia de células con la habilidad de fagocitosis que se encargan de la digestión de material particulado extracelular (Pastoret *et al.* 1998, Kindt *et al.* 2007). En la inmunidad innata participan algunas moléculas solubles que se encargan de degradar algunos antígenos, un ejemplo de esto es la enzima lisosima que se encuentra en secreciones mucosas y lágrimas y que tiene la capacidad de romper la pared de peptidoglicanos presente en las bacterias. Otra de estas moléculas solubles es el interferón el cuál es un grupo de proteínas secretadas por células infectadas por virus y que tiene la capacidad de unirse a células cercanas e inducir un estado generalizado antivírico (Kindt *et al.* 2007). El complemento, es otro agente de la inmunidad innata conformado por un grupo de proteínas séricas que circulan en el cuerpo en estado inactivo, y que una vez que por diferentes estímulos son activadas, tienen la capacidad de dañar las membranas de microorganismos patógenos que actúan en conjunto con los anticuerpos de la inmunidad adaptativa (Carey *et al.* 1999). Otro importante agente de este tipo de respuesta inmunológicas son las células asesinas naturales (NK), este tipo de células generan una respuesta inmediata de tipo citotóxica contra infecciones causadas por virus o contra tumores marcados por antígenos (Pastoret *et al.* 1998). Las células

NK se encuentran en el bazo de los anfibios adultos, sin embargo hasta el momento no han sido encontradas en el bazo de renacuajos (Carey *et al.* 1999).

Los leucocitos son otro tipo de células del sistema inmune innato. La hematopoyesis es el proceso mediante el cual se diferencian los diferentes tipos de leucocitos, esto se da en anfibios a diferencia de los mamíferos (médula ósea) en el hígado de renacuajos, mientras que en los adultos se da en el hígado y en el bazo (Robert & Ohta 2009). El primer tipo de leucocitos presentan un núcleo no segmentado, son llamadas monocitos cuando se encuentran en la sangre circulante, mientras que cuando llegan a los diferentes órganos su estructura cambia por lo que se llaman macrófagos. Dentro de las principales funciones llevadas a cabo por estas células es fagocitar antígenos y aumentar la actividad microbiana en el cuerpo, además procesan y presentan antígenos a los linfocitos (Pastoret *et al.* 1998). Otra célula importante del sistema inmune innato son los neutrófilos, que son los primeros en llegar a los sitios de infección ya que son atraídos mediante quimiotaxis, estos tienen funciones de fagocitosis y actividad microbiana eliminando así a los antígenos especialmente a las bacterias y hongos. Los basófilos son otro tipo de células que son muy poco abundantes en la sangre, cuando se encuentran en mucosas reciben el nombre de mastocitos; son importantes agentes que ayudan ante procesos alérgicos ya que liberan sustancias vasoactivas potentes que aumentan la permeabilidad capilar y de contracción del músculo liso. Por último, los eosinófilos regulan la actividad de los basófilos y mastocitos, además en mamíferos estas células tienen capacidad fagocítica y microbicida, además liberan sustancias tóxicas a nivel extracelular que ayudan ante el ataque de helmintos (Kindt *et al.* 2007, Davis *et al.* 2008, Arıkan & Cıcek 2014).

Inmunidad Adaptativa

La inmunidad adaptativa (específica) como parte del sistema inmunológico de vertebrados trabaja de forma conjunta con la inmunidad innata y comienza sus funciones luego de algunos días después de ocurrida la infección. De manera general, la inmunidad adaptativa se encarga de reconocer, eliminar y luego recordar a los diferentes patógenos invasores que logran evadir las reacciones innatas y persistir en el cuerpo del organismo (Kindt *et al.* 2007). En el caso de los anfibios la inmunidad adaptativa es menos caracterizada cuando se compara con la de los mamíferos, además suele presentar menor afinidad contra patógenos sin embargo el éxito de este tipo de respuesta inmune es altamente eficaz (Robert & Ohta 2009).

La inmunidad adaptativa se caracteriza por la presencia de una serie de células inmunológicas encargadas de responder de manera altamente específica ante el ataque de diferentes tipos de antígenos (Carey *et al.* 1999). Hay 4 características importantes:

- Especificidad antigénica: capacidad de reconocer diferencias sutiles que se dan de un antígeno a otro
- Diversidad: capacidad de reconocer miles de millones de estructuras diferentes encontradas en antígenos extraños
- Memoria inmunitaria: respuesta ante una segunda infección es mucho más rápida y eficaz.
- Reconocimiento: capacidad de reaccionar solo ante antígenos extraños.

Las células especializadas que pertenecen al sistema inmune adaptativo son llamados linfocitos T y B que son un tipo específico de glóbulos blancos. Los linfocitos B se producen y maduran dentro de la médula ósea en mamíferos, sin embargo en anfibios la médula ósea no es un órgano linfoide, por lo tanto la producción y diferenciación de estas células se da en hígado y en el bazo (Robert & Ohta 2009).

Tanto las células B como las T, poseen un receptor de unión para un antígeno específico. Cuando este receptor se encuentra por primera vez con un antígeno que corresponde al anticuerpo que posee en su membrana, esta se divide con rapidez produciendo una gran cantidad de células clones, las cuales se diferencian en células B de memoria y células B efectoras (células plasmáticas). Las primeras son exactamente iguales a las células madre, mientras que las células plasmáticas tienen poco o nada de anticuerpo unido a su membrana y su función es la de secretar cantidades grandes de anticuerpos que sirven como fuente principal de moléculas efectoras de la inmunidad humoral (Kindt *et al.* 2007).

Los anticuerpos secretados por las células plasmáticas son glicoproteínas que cumplen una importante función ya tienen la capacidad de unirse de modo específico a un epítopo del antígeno en cuestión (Murphy *et al.* 2009). Los anticuerpos pueden presentarse de dos maneras, como constituyentes unidos a membranas de los linfocitos B o como moléculas solubles secretadas por las células plasmáticas. Hay 5 diferentes clases de anticuerpos o inmunoglobulinas presentes en anfibios; las cuales al igual que en los demás mamíferos se distinguen por las secuencias de aminoácidos presentes en la cadena pesada que conforma el complejo de unión del antígeno (Demas *et al.* 2011). La primera clase de inmunoglobulinas es llamada IgY, es la

segunda más abundante, se pueden encontrar en el plasma sanguíneo, bazo y en el hígado (Robert & Ohta 2009). Tienen la capacidad de activar el sistema de complemento para lisar las membranas de los antígenos. Esta inmunoglobulina posee las mismas funciones que la IgG de los vertebrados superiores (Mussmann *et al.* 1996). La segunda clase de anticuerpo en anfibios son los IgX, este tipo de anticuerpo son las menos abundantes, se pueden encontrar en las mucosas del epitelio del intestino. Las IgX tienen una estructura similar al IgM de vertebrados superiores sin embargo posee las funciones de las IgA de dichos taxos (Robert & Ohta 2009). Las IgX se encuentran principalmente en secreciones ya que protege diferentes mucosas en el cuerpo, encontrándose en grandes cantidades en las mucosas de la piel de anfibios (Rollins-Smith *et al.* 2011). Los anticuerpos de tipo IgM al igual que en vertebrados mayores, son los más grandes de todos ya que poseen 10 sitios activos de unión para antígenos; son los más abundantes y se encuentran en todos los tejidos, principalmente en el torrente sanguíneo (Robert & Ohta 2009). Las IgM tienen la capacidad de activar el sistema de complemento, además son los primeros en responder ante la presencia de un antígeno. Este tipo de inmunoglobulinas es la primera en producirse en los renacuajos de *X. laevis*, esto poco tiempo después de producirse la fertilización de los huevos (12 días) (Hsu & Pasquier 1984). Dos inmunoglobulinas fueron descubiertas mediante el análisis del genoma de la especie *Silurana tropicalis* (Zhao *et al.* 2006, Robert & Ohta 2009). La primera de ellas es la IgD, al igual que en vertebrados mayores no se conoce mucho de esta inmunoglobulina, ya que es muy poco abundante en la sangre y su función biológica aún no ha sido descubierta (Zhao *et al.* 2006, Kindt *et al.* 2007). El último tipo de anticuerpo es el IgF, esta inmunoglobulina es la más pequeña de todas y se cree que proviene evolutivamente de una IgY duplicada que perdió un dominio constante interno de su estructura (Zhao *et al.* 2006).

Los linfocitos T se producen en el hígado de los adultos de *X. laevis*, luego migran hacia el Timo para madurar y diferenciarse, una vez realizado este proceso se acumulan junto con una gran cantidad de linfocitos B en el bazo, específicamente en la pulpa blanca (Robert & Ohta 2009). Los linfocitos T en maduración presentan una molécula única de unión a antígenos llamada receptor de célula T (TCR). De este tipo de células se conoce la existencia de dos subpoblaciones llamadas células T colaboradoras (T_H) y células citotóxicas (T_C) (Kindt *et al.* 2007). Estas se diferencian por la presencia de glucoproteínas de membrana llamadas CD4 y CD8 respectivamente (Pastoret *et al.* 1998). Recientemente se caracterizó una tercera subpoblación de linfocitos T llamados reguladores (T_{reg}), estos se diferencian de los dos tipos anteriores porque poseen CD4 en su membrana sin embargo también posee marcadores de superficie asociados a su fase de activación (Kindt *et al.* 2007). La diferencia principal que caracteriza a los linfocitos T y los diferencia de los B, es que únicamente pueden identificar antígenos unidos a ciertas proteínas de membrana celular llamadas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Kindt *et al.* 2007). Las MHC están presentes en células dendríticas, macrófagos y linfocitos B; por esta razón se dice que los linfocitos T son la fuente principal de la inmunidad adaptativa mediada por células (Pastoret *et al.* 1998).

En renacuajos, se da una variación importante en cuanto al sistema inmune adaptativo. Luego de suceder la fertilización de los huevos, la larva tarda 2 días para ser inmunocompetente. El primer órgano inmune en trabajar es el hígado, en él se produce la linfopoyesis, mientras que la reorganización de los genes que expresan los Ig se da en el bazo. Es importante mencionar que los renacuajos no poseen médula ósea. El bazo es el principal órgano del sistema inmune, este crece en medida en que crece la longitud del renacuajo. En cuanto a la producción de

anticuerpos, la larva tarda de 8 a 10 días para tener anticuerpos maduros luego de ser fertilizados los huevos. En los renacuajos no se da la presencia de IgM y IgX en el mucus del epitelio del intestino. Las larvas de anfibios no poseen tanta heterogeneidad en el repertorio de anticuerpos comparado con adultos, además la especificidad de los mismos no es tan alta hasta después de que sucede la metamorfosis. Por último, presentan una limitada superficie de expresión de MHC I, esto se debe a la poca educación que se da en las células inmunes de larvas debido a que el sistema inmune no se encuentra totalmente desarrollado (Robert & Ohta 2009).

CAPÍTULO 2: EFECTO DE MÚLTIPLES FACTORES ESTRESANTES SOBRE LA RESPUESTA INMUNE Y FISIOLÓGICA EN RENACUAJOS DE *LITHOBATES TAYLORI* (ANURA: RANIDAE) EN COSTA RICA

Erick Ballesterro Rodríguez^{1,2},

¹Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica

²Sistema de Estudios de Posgrado, Universidad de Costa Rica

Resumen

Costa Rica es uno de los principales sitios en el mundo donde se han reportado declines enigmáticos de anfibios. Uno de los principales factores que podrían estar afectando a las poblaciones de anfibios es la presencia de plaguicidas en sus hábitats, incluso también en ambientes protegidos. Un ejemplo de esto es la presencia de concentraciones altas de ciertos plaguicidas en bosques nubosos, transportados por medio de viento y lluvia desde los sitios de aplicación en las zonas bajas. La presencia de plaguicidas en los ecosistemas puede interactuar con otros estresores naturales lo que podría generar mayor impacto en las poblaciones de anfibios. La presencia de estresores en el ambiente podría afectar el mecanismo de liberación y regulación de hormonas de estrés en anfibios, ocasionando una disminución en la respuesta inmune. *Lithobates taylori* es una especie de anuro que habita las zonas medias altas de la Cordillera Volcánica Central de Costa Rica, las poblaciones de esta especie en zonas altas han presentado disminuciones considerables en las últimas tres décadas. El objetivo de esta investigación es determinar y cuantificar el efecto de factores de estrés bióticos (depredación) y antrópicos (presencia de plaguicidas clorotalonil y endosulfán beta) sobre la respuesta inmune y fisiológica de los renacuajos de la especie *Lithobates taylori* de las partes altas del Valle Central de Costa Rica. Se utilizaron mesocosmos para realizar experimentos de exposición crónica a factores de estrés. Se escogieron 3 concentraciones de cada plaguicida y la presencia o ausencia de una larva de odonato como depredador. El tamaño corporal y peso de renacuajos expuestos al plaguicida endosulfán beta disminuyeron significativamente cuando se presentaba individualmente así como cuando se encontraba combinado con otros estresores. El grado de desarrollo larval fue acelerado por concentraciones altas de clorotalonil y desacelerado por concentraciones bajas de endosulfán beta. En cuanto a las variables inmunológicas, se encontraron aumentos en el

número de neutrófilos ocasionados por el endosulfán beta. El clorotalonil en sus dos concentraciones aumentó el número de monocitos, eosinófilos y eritrocitos en sangre. Por último se encontró que el endosulfán beta aumenta la concentración de corticosteroides en sangre, esto como respuesta al estrés ocasionado por la exposición a este químico. A partir de estos resultados se concluye que la presencia de endosulfán beta y clorotalonil en las zonas altas de Costa Rica está ocasionando estrés y afectaciones en la respuesta inmune y fisiológica en las poblaciones de *L. taylori* que habitan estos lugares. Por lo tanto, el aumento en la concentración de corticosteroides en los renacuajos podría ser el enlace bioquímico entre el efecto ocasionado por factores estresantes y el decline de poblaciones de anfibios.

Palabras clave: inmunosupresión, estrés, depredación, plaguicidas, decline de anfibios, endosulfán beta, clorotalonil, mesocosmos.

Introducción

El decline sufrido por cerca del 48 % de especies de anfibios en el mundo, representa uno de los problemas ambientales más importantes de las últimas décadas a nivel mundial (Stuart *et al.* 2004, Blaustein & Dobson 2006, Hoffman *et al.* 2010). Los declines de anfibios así como la extinción de muchas especies de organismos en las últimas décadas, es considerada por algunos autores como la sexta extinción masiva de especies ocurrida en la historia de nuestro planeta (Wake & Vredenburg 2008). Este fenómeno toma especial interés ya que algunos estimados sugieren que las tasas de extinción actuales en este grupo de animales son hasta 211 veces mayores a las tasas de extinción históricas registradas para este taxa (McCallum 2007). La gran mayoría de especies afectadas por estos fenómenos habitan las elevaciones medias y altas de ambientes tropicales (Puschendorf *et al.* 2006).

Una serie de factores causales han sido asociados con el decline de algunas poblaciones de anfibios en el mundo. Tal es el caso de la pérdida de hábitat (Heenar 1997), el cambio

climático que ha involucrado un calentamiento global (Pounds & Crump 1994), la alta proliferación en el uso de plaguicidas en diferentes agroecosistemas (Davidson 2004) y la aparición de diferentes enfermedades emergentes, principalmente la quitridiomycosis y las infecciones causadas por el *Ranavirus* sp. (Carey 2000). Por otro lado, existen declines poblacionales y extinciones de especies de anfibios catalogadas como enigmáticas, esto debido a que se han dado en zonas protegidas en donde no se reportaban afectaciones antrópicas cuando estos sucedieron (Wake 1991, Pounds & Crump 1994, Lips 1998, Gardner 2001). Algunas de las hipótesis para explicar este tipo de declines se basan en la presencia y afectación por enfermedades emergentes, especialmente del hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), y el efecto del cambio climático; sin embargo todavía no es del todo claro cuáles son los factores ambientales o antrópicos que ocasionan que estas enfermedades afecten a los anfibios.

El *Bd* como el *Ranavirus* sp. y otros agentes de enfermedades encontradas en anfibios pertenecen a grupos de patógenos oportunistas que se caracterizan por atacar a sus hospederos cuando estos se encuentran vulnerables por diferentes situaciones de estrés (James *et al.* 2015). Además se reconoce la presencia de *Bd* en especímenes de mucho antes de que sucedieran los declines (Puschendorf *et al.* 2006, James *et al.* 2015). Se han encontrado variaciones en el grado de infección entre diferentes especies relacionadas a factores de resistencia ante patógenos, como lo son la producción de péptidos antimicrobianos en la piel. Todo este tipo de evidencias indican que algunas especies pueden sobrevivir a la presencia de este patógeno (Rollins-Smith *et al.* 2005, 2011). Debido a las razones antes mencionadas, se ha formulado una hipótesis que pretende relacionar a los declines enigmáticos con la interacción entre una serie de factores estresantes que confluyen en los hábitats de anfibios (Carey *et al.* 2003, Collins & Storfer 2003, Davidson

2004, Pounds *et al.* 2006). Esta hipótesis plantea entonces que es la presencia de múltiples factores estresantes en el ambiente, tanto naturales como de origen antrópico, quienes influyen en la respuesta inmune de los animales lo que provoca que sean susceptibles a la infección de diferentes patógenos (Lips *et al.* 2008).

El efecto a nivel fisiológico provocado por la exposición a factores de estrés es mediado por la liberación de corticosteroides, las hormonas de estrés, son liberadas por medio de la corteza suprarrenal en respuesta a algún estímulo estresante sea este físico y/o ambiental. Los estímulos son detectados por el hipotálamo y en respuesta a esto libera el factor liberador de corticotropina, un péptido que regula la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) desde el interior de la pituitaria. La ACTH actúa sobre la corteza adrenal para la liberación de glucocorticosteroides; que en el caso de los anfibios es representado por los corticosteroides (Wingfield & Sapolsky 2003). La presencia de corticosteroides en grandes cantidades producen inmunosupresión, cuyo mecanismo se ha sugerido provocar que el individuo rededique las energías y recursos originalmente enfocados a procesos no indispensables a corto plazo (sistema inmune, reproducción, alimentación, etc) con el fin de obtener toda la energía disponible para responder ante los factores de estrés (McMahon *et al.* 2011, Martin *et al.* 2010).

Entre los diferentes factores de estrés que afectan a anfibios se encuentra la exposición a plaguicidas (Sparling *et al.* 2001, Davidson 2004, Linder *et al.* 2010, Hussain & Panduit 2012). Costa Rica es uno de los países con mayores índices de importación de plaguicidas por habitante y área agrícola a nivel mundial (Ramírez *et al.* 2009) y cuenta con uso alto en cultivos intensivos como banano, café y piña. Residuos de plaguicidas en muestras ambientales han sido reportado

en zonas boscosas, incluso en en áreas protegidas como Monteverde, Volcán Poas y Volcán Barva (Castillo *et al.* 2006, Daly *et al.* 2007a). Estos sitios han sido históricamente los principales focos de decline de especies de anuros (Pounds & Crump 1994, Bolaños 2009), lo que sugiere que podría haber una relación causal directa entre los declines enigmáticos ocurrido y el posible efecto inmunosupresor que pueden generar la exposición a plaguicidas y su interacción con otros factores de estrés ambientales.

La carencia de investigación en los trópicos sobre el efecto de plaguicidas sobre las poblaciones de anfibios de bosques de altura es preocupante, debido a que los plaguicidas se comportan de diferente manera en estos sitios (Burkhart *et al.* 2003). Dichas variaciones se deben entre otros a las diferencias de temperatura, pH, dureza y carbono orgánico disuelto en el agua; esto influye en los mecanismos asociados con la degradación, movilización y metabolismo de los plaguicidas influyendo en la toxicidad de los mismos (Heugens *et al.* 2001, Boone *et al.* 2003). Otro aspecto importante importante puede ser que en los trópicos se siguen aplicando plaguicidas que por su alta toxicidad han sido eliminado en países desarrollados (Burkhart *et al.* 2003).

Existen varios plaguicidas que se utilizan en Costa Rica que poseen efectos dañinos sobre anfibios (Ghose *et al.* 2014). El clorotalonil es el tercer plaguicida más utilizado en Costa Rica y es aplicado para controlar infestaciones de hongos en plantaciones de banano, piña y melón (Castillo *et al.* 2000). Es conocido por afectar el sistema inmune de camarones, ostras e insectos (Shelley *et al.* 2009), además también es tóxico para algunos vertebrados como es el caso de peces y anfibios (MacMahon *et al.* 2011). El efecto de este plaguicida sobre anfibios es poco estudiado,

sin embargo se conoce que tiene efectos inmunosupresores en diferentes especies de Norteamérica, ya que aumenta la producción de corticosteroides en renacuajos expuestos a concentraciones subletales de este plaguicida (MacMahon *et al.* 2011). En Costa Rica Ghose *et al.* (2014) encontraron que el clorotalonil es el plaguicida con mayor toxicidad para renacuajos de la especie *A. callidryas*, esto comparando los diez plaguicidas más utilizados en zonas agrícolas.

El endosulfán es un acaricida organoclorado que también se ha relacionado con declines de anfibios (Brunnelli *et al.* 2009, Sparling & Fellers 2009). Este plaguicida es ampliamente utilizado en países tropicales y en Costa Rica su uso tuvo un amplio incremento en las plantaciones de piña, café, arroz y plantas ornamentales (Castillo *et al.* 2000). Este plaguicida fue agregado a la lista de Contaminantes Orgánicos Persistentes del Convenio de Estocolmo en el año 2011 (UN 2011) y recientemente se ha prohibido su uso en Costa Rica (La Gaceta 2015). En concentraciones presentes en hábitats acuáticos, se ha observado que puede ocasionar mortalidad de organismos y efectos subletales entre ellos inhibición de la neurotransmisión colinérgica, y alteración del comportamiento (i.e. alimentación, nado y respiración) (Denoel *et al.* 2012).

Clorotalonil y endosulfán fueron escogidos para llevar a cabo esta investigación debido a su amplio uso y presencia en ecosistemas acuáticos, además de la aparición de los mismos en zonas montañosas (Castillo *et al.* 2000, Daly *et al.* 2007b, Shunthirasingham *et al.* 2011).

El efecto producido por los plaguicidas sobre las poblaciones de anfibios se une al estrés que podrían generar otros factores naturales como lo son el riesgo de desecación, poca disponibilidad alimenticia, alta densidad de competidores, presencia de enfermedades y la

depredación (Thiemann 2000, Koprivnikar *et al.* 2006). Esta interacción puede aumentar o disminuir el impacto en la salud de los anfibios, dependiendo de una gran gama de factores (Buck *et al.* 2015). Seiter (2009) demuestra que la presencia de depredadores reduce la respuesta inmune en las larvas de la especie *Rana sylvatica*. Relyea & Mills (2001) encontraron que las señales químicas liberadas por los depredadores y renacuajos antes de darse la depredación, pueden interactuar con el insecticida inhibidor de colinesterasa carbaril, causando altos niveles de mortalidad en renacuajos de *Hyla versicolor*.

La especie de estudio de esta investigación es *Lithobates taylori*, pertenece a la familia Ranidae y se encuentra distribuida en las tierras medias y altas de la costa Caribe de Nicaragua y Costa Rica. En Costa Rica se puede encontrar principalmente en las tierras altas de la Cordillera Volcánica Central, Meseta Oriental y Occidental, en los bosques húmedos premontanos y montano bajos. Su distribución en estos sitios va desde los 1000 hasta los 1862 m.s.n.m. Raramente se puede encontrar esta especie en los bosques húmedos de las tierras bajas del Atlántico (60-1000 m.s.n.m) (Savage 2002).

Esta especie está ampliamente relacionada a cuerpos de agua especialmente lagunas, lagos y pantanos. Es de hábitos nocturnos y diurnos. La época reproductiva ocurre durante la época lluviosa de Mayo a Noviembre (Savage 2002), sin embargo se pueden encontrar adultos reproduciéndose durante todo el año si hay presencia de lluvia (Ballesteros obs. pers.). Los renacuajos de esta especie son de gran tamaño llegando a medir hasta 82 mm de largo antes de realizar la metamorfosis (Savage 2002).

La especie *L. taylori* se encuentra catalogada como una especie de preocupación baja (UICN 2013). Sin embargo las poblaciones de esta especie han declinado en las últimas décadas al igual que otras especies que habitan zonas de altura, esto presumiblemente debido a la pérdida de hábitat, contaminación provocada por el uso de plaguicidas en las zonas bajas del país así como su vulnerabilidad ante infecciones por *Bd* (UICN 2013).

El objetivo de esta investigación es determinar y cuantificar el efecto de factores de estrés bióticos (depredación) y antrópicos (presencia de plaguicidas clorotalonil y endosulfán beta) sobre la respuesta inmune y fisiológica de los renacuajos de la especie *Lithobates taylori* de las partes altas del Valle Central de Costa Rica.

Materiales y Métodos

Sitio de Estudio

La presente investigación se llevó a cabo en la Sede de la Universidad Whitworth, ubicada en la parte alta de las montañas de Heredia, específicamente en el Tirol, San Rafael de Heredia (Fig. 2). La precipitación anual promedio de este sitio es de 3218 mm, y la temperatura ambiental oscila entre los 15 a 18 °C (MINAE 2005). Por otro lado, el sitio de estudio pertenece a la zona de vida de Bosque Tropical Pluvial Montano Bajo y posee una elevación media de 1800 m.s.n.m (Holdridge 1979). Dicho lugar fue escogido debido a que este sitio posee lagunas naturales y artificiales en las cuáles habita y se reproduce la especie estudiada, *L. taylori*.

Colecta y cuidado de animales

Se colectaron 15 masas de huevos de *L. taylori* de las lagunas ubicadas en el sitio de estudio luego de una noche de lluvias constantes (**Anexo 1**). A partir de ellas se obtuvieron todos los renacuajos empleados en esta investigación, además de los individuos utilizados para la alimentación continua de los depredadores. Los renacuajos de las diferentes masas de huevos fueron mezclados para tener representación genética en cada muestra. Posteriormente los individuos fueron asignados al azar a los tratamientos respectivos de cada experimento.

Para la obtención de los depredadores se capturaron 50 ninfas de libélula (*Anax* sp.) en las mismas lagunas en que se colectaron las masas de huevos (**Anexo 2**). Las ninfas que murieron durante el ensayo fueron reemplazadas.

Todos los animales se mantuvieron en agua proveniente del acueducto del Tirol, San Rafael de Heredia, previamente tratada para la eliminación del cloro. La alimentación de los renacuajos se realizó utilizando alimento para peces marca Tetra Veggie® en hojuelas, el cuál esta hecho en base a espirulina. Durante el inicio de los experimentos la cantidad de alimento utilizada para la alimentación de los renacuajos fue obtenida usando como base un promedio del 20 % del peso corporal de todos los individuos localizados en un mismo tratamiento. Por lo tanto se inició con 0.1 g de espirulina dos veces por semana para cada contenedor. Conforme se desarrolló el experimento, se fue aumentando la cantidad de comida paulatinamente, llegando a proporcionar por cada contenedor 0.85 g al final del experimento.

Con respecto a la alimentación de los depredadores, se les proporcionó un renacuajo por semana, el cual se introdujo dentro de la jaula del depredador. Se utilizaron renacuajos de tamaño similar para la alimentación de los depredadores.

Diseño Experimental

Se utilizó sistemas artificiales conocidos como mesocosmos, puesto que tienen la capacidad de proporcionar las condiciones para una mejor comprensión de los efectos ambientales relevantes de los productos químicos (Caquet *et al.* 2000). Este tipo de metodología es utilizada para evaluar riesgos ecotoxicológicos, ya que se pueden utilizar condiciones ambientales controladas que permiten proporcionar una mejor comprensión de lo que sucede en la hábitats naturales (Semlitsch & Boone 2010). La utilización de mesocosmos también permite replicar tratamientos lo que ayuda a implementar rigurosos diseños experimentales y análisis estadísticos (Lacher *et al.* 2010).

Los mesocosmos fueron ubicados dentro de una estructura de concreto tipo bodega, techada y abierta lateralmente contando solo con 2 paredes; dicha estructura se encuentra a unos 25 m de las lagunas (**Anexo 3**). Las estructuras usadas como mesocosmos fueron bidones plásticos de policarbonato de 18.9 L, normalmente son utilizados para contener agua potable. Se cortó la parte superior de los contenedores para poder manipular las condiciones dentro de los mismos (**Anexo 4**). Todos los mesocosmos utilizados en esta investigación contenían 15 g de hojarasca y 15 L de agua.

Prueba de persistencia de plaguicidas

Se llevó a cabo un experimento piloto antes del inicio de la investigación para determinar el tiempo de la degradación de los dos plaguicidas que utilizamos, además de observar el posible papel en la degradación y asimilación de las sustancias químicas por parte de la materia orgánica

presente en los microcosmos. El dopaje inicial en los mesocosmos al día 0 fue de 30 $\mu\text{g/L}$ de endosulfán beta y clorotalonil. Para el análisis de las concentraciones en el agua de los plaguicidas se tomaron muestras diarias durante un lapso de 15 días. Para cada muestra se realizó una extracción líquida-líquida con hexáno, después se llevó a cabo una prueba de eficiencia y extracción inyectando cada muestra en un cromatógrafo de gases para cuantificar la presencia de cada sustancia. Todas las muestras fueron analizadas en el laboratorio del Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET) de la Universidad Nacional utilizando el protocolo de extracción de plaguicidas descrito en el **Anexo 5**.

Los resultados de esta prueba mostraron que los dos plaguicidas utilizados en esta investigación presentan una disminución importante de sus concentraciones luego de transcurrir 24 horas después de realizados los dopajes en los mesocosmos. En el caso del endosulfán beta, la disminución luego del primer día es de 73.57%, mientras que para el clorotalonil la disminución en la concentración fue de 74.3%. Para el segundo día, la disminución del endosulfán beta con respecto a la concentración inicial fue de 88.28% y para el clorotalonil fue de 88.31%. La disminución en la concentración de los plaguicidas en el tercer día fue de 92.86% para endosulfán beta y 94.28% para el clorotalonil. Luego del tercer día las concentraciones de ambos plaguicidas se mantuvieron relativamente constantes hasta la finalización de esta prueba (Fig. 4). No se determinó en cuanto tiempo dejan de aparecer trazas de los plaguicidas en el agua de los mesocosmos.

Según los resultados obtenidos en esta prueba se tomó la decisión de realizar los dopajes a los mesocosmos cada 7 días, esto con el fin de que los renacuajos estuvieran expuestos a

pulsos de aplicaciones de plaguicidas, intentando recrear lo que sucede en condiciones reales en las partes altas del Valle Central.

Experimento de interacción de plaguicidas y riesgo de depredación

Con el fin de cuantificar los efectos de la interacción de dos plaguicidas y un factor de estrés ecológico en la historia de vida y la respuesta inmune en renacuajos de *L. taylori*, se llevó a cabo un experimento de exposición estática crónica. Para esto realizamos un diseño factorial cruzado de tres factores: riesgo de depredación (presencia/ausencia), concentración de endosulfán (ausente, baja, alta) y concentración de clorotalonil (ausente, baja, alta); además se adicionó un control para el solvente, para un total del 19 tratamientos ($2 \times 3 \times 3 + 1$) (Fig. 3). Cuatro réplicas fueron empleadas para cada tratamiento, por lo que 76 mesocosmos fueron utilizados en el ensayo.

Las concentraciones de endosulfán beta utilizadas en esta investigación se escogieron tomando en cuenta los datos de la concentración mínima que presenta efectos observables (LOEC, por sus siglas en inglés) encontrada en la literatura para la especie *L. pipiens*, especie hermana de *L. taylori*. Dicha concentración es de 7 µg/L para el plaguicida endosulfán beta (Harris *et al.* 2000, Jones *et al.* 2009). En el caso del clorotalonil, no se cuenta con este tipo de datos para esta especie, por lo tanto las concentraciones utilizadas se escogieron utilizando como base los datos de LOEC reportado para algunas especies de anfibios, dichas concentraciones van de 12.5 µg/L a 82 µg/L (Weltje *et al.* 2013, Ghose *et al.* 2014).

Las concentraciones escogidas para clorotalonil fueron de 0 $\mu\text{g/L}$, 1.5 $\mu\text{g/L}$ y 15 $\mu\text{g/L}$. Las concentraciones para el endosulfán beta fueron 0 $\mu\text{g/L}$, 0.2 $\mu\text{g/L}$ y 2 $\mu\text{g/L}$. Las concentraciones siguientes son las reportadas en ecosistemas acuáticos de Costa Rica, en el caso del clorotalonil se ha encontrado en sistemas acuáticos de la zona atlántica en concentraciones entre 8 y 11 $\mu\text{g/L}$ (Von Duszeln 1991, Abarca & Ruepert 1992), mientras que el endosulfán beta en concentraciones entre 0.04 y 8.9 $\mu\text{g/L}$ (Bejarano *et al.* 2009).

Los mesocosmos se prepararon con 15 L de agua y 15 g de hojarasca húmeda; los cuales se llenaron con agua de cañería (previamente analizada para presencia de plaguicidas y de otros contaminantes) y se dejaron reposar durante 24 h para que se disipara el cloro. Los tanques se cubrieron con una malla para evitar que ingresaran depredadores u otros animales. A cada tanque se le colocó una pequeña jaula de 9 x 8 cm, donde se colocó (o no) el depredador, dependiendo del tratamiento (**Anexo 6**). En cada mesocosmo se colocaron 15 renacuajos al iniciar los experimentos. Los mesocosmos fueron colocados al azar en el sitio en donde se llevaban a cabo los experimentos, esto con el fin de evitar que el efecto de borde interfiriera en los resultados de la investigación.

Se llevaron a cabo dos tipos de tratamiento control. En el primero de ellos se utilizó la misma cantidad de agua de todos los tratamientos pero no se añadió ningún factor de estrés. En el segundo caso se añadió acetona, el solvente utilizado para diluir ambos plaguicidas empleados en el estudio; de esta manera se determinó el efecto que el solvente podría tener sobre las variables respuesta analizadas. Se añadieron 30 μL de acetona para obtener una concentración

de 2 µg/L por contenedor. Para ambos tratamientos control también se utilizaron cuatro réplicas para cada uno.

Los renacuajos focales de las diferentes masas de huevos después de ser eclosionados en el laboratorio fueron mezclados en un tanque de 60 L para generar variabilidad genética entre los cohortes. Se hicieron grupos de 15 renacuajos los cuales fueron colocados en envases pequeños para ser asignados al azar en cada tratamiento. Seguidamente, se procedió a una aclimatación de 24 h (mesocosmos sin plaguicidas y señales químicas de depredación). Al día siguiente, se adicionaron los depredadores en las jaulas y las diferentes concentraciones de plaguicidas en los tratamientos respectivos.

En relación a los tratamientos asignados con riesgo de depredación, los depredadores se alimentaron una vez por semana con un renacuajo para generar señales químicas de depredación. Para asegurar que los renacuajos expuestos al riesgo de depredación pudieran recibir las señales tanto químicas como visuales del depredador, las jaulas consistían en un contenedor transparente cubierto en un extremo con cedazo de nylon, esto para mantener el flujo de agua continuo (Relyea & Mills 2001).

Por último, al utilizar en esta investigación mesocosmos expuestos a factores de estrés de manera crónica, algunos de ellos presentaron una producción alta de algas y materia orgánica en las últimas semanas del experimento. Por lo que se procedió a realizar un cambio de agua y de hojarasca en los contenedores con estas condiciones, esto con el fin de evitar la influencia de las mismas en los resultados de esta investigación. Dichos recambios se realizaron horas antes de que se procedieran a dopar los mesocosmos con los plaguicidas.

Protocolo de dopajes

Los dopajes de plaguicidas de los tratamientos correspondientes se realizaron cada 7 días durante todo el experimento. Se utilizaron jeringas de 250 a 10 μL (HamiltonTM) para realizar los dopajes correspondientes para cada tratamiento. Inmediatamente después de realizar los dopajes de todos los contenedores, se procedió a homogenizar el agua revolviendo la misma con un palo de madera durante 20 seg. Se utilizó solamente un palo de madera por tratamiento con el fin de no realizar contaminación cruzada de plaguicidas.

Medición de parámetros físico-químicos y de plaguicidas

Se tomaron medidas de diferentes parámetros físico-químicos con el fin monitorear continuamente los mesocosmos utilizados. Entre estos parámetros, se tomaron medidas de la temperatura del agua con el fin de poder detectar variaciones que puedan influir en procesos fisiológicos normales en los renacuajos. También se tomaron mediciones del pH del agua, ya que cambios variaciones en los valores normales de esta variable, pueden tener efectos negativos en la salud de los renacuajos. Los valores de temperatura y pH del agua fueron tomados utilizando un phmetro (Hanna® Instruments, Modelo HI 98129).

Por último, se tomaron medidas de la conductividad del agua, esto ya que cambios en esta variable pueden provocar graves daños en la salud de los renacuajos, así como alteraciones en la toxicidad de los plaguicidas analizados (Heugens *et al.* 2001). Esto es importante ya que la conductividad es una medida indirecta de la cantidad de iones disueltos en el agua y aumentos o

disminuciones drásticas pueden afectar procesos fisiológicos en los organismos (Goyenola 2007). Para la medición de esta variable utilizamos un medidor de conductividad (WTW Cond 315i).

Todas las mediciones de las variables mencionadas anteriormente se llevaron a cabo durante los días viernes a la misma hora, además se realizaron antes de los dopajes en los mesocosmos con el fin de evitar alteraciones provocadas por los plaguicidas.

Variables respuesta

Variables de desarrollo

Con el fin de determinar cuál fue el efecto de los factores estresantes sobre la respuesta fisiológica de los renacuajos de *Lithobates taylori*, se tomaron datos de diferentes variables detalladas a continuación:

- a) Crecimiento: las medidas de tamaño se realizaron antes de empezar los experimentos de exposición a estrés y en el día final de los mismos (día 120). Para realizar dichas medidas se colocaron individualmente a los renacuajos de cada tratamiento en una caja petri de plástico, en la cual se le tomaron las medidas de tamaño en milímetros utilizando un caliper digital (Control Company Traceable®, Modelo 3415) (0.1 mm).
- b) Peso: se pesaron todos los individuos utilizando una balanza digital (0.1 g). El pesaje de cada individuo se realizó luego de ser colocado en una toalla de papel para evitar la interferencia del agua en la piel del animal.

- c) Grado de desarrollo larval: se llevaron a cabo medidas del grado de desarrollo larval debido a que los corticosteroides participan en la determinación del tiempo de metamorfosis (Rollins-Smith *et al.* 1997). Se utilizó la tabla de desarrollo larval de Gosner (1960) para determinar el grado de desarrollo de cada individuo.
- d) Mortalidad: se realizaron conteos de la mortalidad ocurrida en los tratamientos una vez finalizaron los experimentos de exposición de estrés. Los individuos que se encontraron muertos fueron preservados en formalina al 10%, con el fin de realizar un análisis del animal a posteriori.
- e) Otros efectos: se realizaron observaciones en cambios de comportamiento, nado y diseño corporal durante el transcurso y el final de los experimentos, esto con el fin de determinar efectos varios causados por la exposición a estrés.

Variables inmunológicas

Para establecer el efecto producido por los factores de estrés utilizados sobre la respuesta inmune innata y adaptativa en los renacuajos de *L. taylori*, se utilizaron diferentes variables inmunológicas. Cada una de ellas se midió luego de concluir el tiempo de exposición, con excepción del desafío antigénico. Para esto se eutanasiaron a los renacuajos utilizando lidocaína en spray al 2%. Luego de que el individuo no presentara signos de vida, se realizaron lavados con agua de tubo para eliminar remanentes de lidocaína. Después de esto procedimos a realizar un corte de la cola del animal para extraer sangre con un capilar heparinizado de la vena caudal;

luego se hizo un corte abdominal con el objetivo de exponer el corazón y extraer sangre directamente del mismo para ser analizada en las siguientes mediciones inmunológicas:

- a) Perfil de leucocitos: para esta prueba se escogieron 2 individuos de cada mesocosmo. Se colocó una gota de sangre de cada individuo sobre un portaobjetos para realizar el frotis. Luego de que el portaobjetos estuviera seco, se fijó la muestra utilizando metanol al 10 % para luego teñir las muestras con colorante Diff-Quick. Todos los frotis fueron revisadas utilizando un microscopio de luz con un objetivo de 100 X. Para cada frotis se contaron 100 células blancas clasificando las mismas en neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos. Para la identificación de las mismas se utilizaron las imágenes de cada tipo de leucocito mostradas por Arikan & Cicek (2014). Una vez realizados los conteos diferenciales de cada mesocosmo, se calcularon los porcentajes obtenidos para cada tipo de leucocitos. Este cálculo se realizó utilizando el promedio de leucocitos totales de cada tratamiento y extrapolando los datos a cada perfil leucocitario de cada individuo por tratamiento. Por último, se calculó la proporción de Neutrófilos/Linfocitos, esta proporción es ampliamente utilizada en ecoinmunología para determinar la presencia de estrés en animales (Davis *et al.* 2008).

- b) Conteo total de células blancas (hematología): Dos individuos de cada mesocosmo fueron analizados mediante esta prueba. Para estas mediciones se colocaron 10 μ L de sangre en un eppendorf al cuál se le añadió 1 mL del reactivo Natt-Herrick para obtener una dilución final de 1:100. Las muestras fueron guardadas a temperatura ambiente hasta ser analizadas con un hemocitómetro en un microscopio de luz con un objetivo de 40

X. Estimamos la cantidad total de glóbulos rojos y blancos utilizando la cuadrícula del hemocitómetro. Además de esto utilizamos los valores obtenidos para cada tratamiento para calcular los valores absolutos de cada tipo de leucocito utilizando los datos obtenidos de los conteos diferenciales.

c) Mediciones directas de corticosteroides: se realizaron mediciones directas de la concentración de corticosteroides en la sangre de los renacuajos, para esto utilizamos un Kit ELISA para corticosteroides (Enzo Life Sciences Inc, ADI 900-097). Este kit está destinado a la cuantificación de la hormona corticosteroides, la cual se produce en respuesta a la estimulación de la corteza suprarrenal por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (Enzo Life Sciences Inc, ADI 900-097). Escogimos este kit debido a que ya ha sido utilizado para evaluar estrés en otras especies de anfibios (MacMahon *et al.* 2011), posee una baja reactividad cruzada con esteroides relacionados, así como su capacidad de adaptación para poder utilizar pequeños volúmenes de muestras.

Para realizar estas mediciones se escogieron de 3 a 4 individuos de cada mesocosmo. Se extrajo la sangre inmediatamente después de haber sido eutanasiados, esto para evitar interferencias en las concentraciones de corticosteroides. Luego de obtener la sangre del animal esta fue centrifugada utilizando una centrifuga para hematocrito, con el propósito de obtener el plasma de la sangre. Una vez separado el plasma se colocó en un eppendorf de 0.5 mL y se congeló a una temperatura de -4°C . Antes de analizar las muestras utilizando el Kit de corticosteroides se realizó un

procedimiento adaptado para la utilización de muestras pequeñas de suero sanguíneo, dicho procedimiento está descrito en el **Anexo 7**. El protocolo utilizado para analizar las concentraciones de corticosteroides en las muestras se detalla en el **Anexo 8**.

- d) ELISA para cuantificación total de anticuerpos IgY e IgM: para establecer si los factores de estrés tienen impacto en la cantidad de anticuerpos circulantes en el cuerpo de los renacuajos, se procedió a realizar un esquema de inmunización con el fin de inducir la respuesta inmune adaptativa de los renacuajos. Estas inmunizaciones se realizaron mediante la inyección de 4 μ L del antígeno albúmina bovina (BSA) con dinitrofenol (DNP) en la cavidad abdominal de los renacuajos escogidos para esta prueba. Para el esquema de inmunización escogimos 4 individuos para mantenerlos expuestos a plaguicidas y depredadores durante 45 días más luego de haber concluido la exposición de estrés inicial. Durante este tiempo los mesocosmos se mantuvieron en las mismas condiciones utilizadas inicialmente manteniendo la exposición a estrés descrita en los protocolos de dopaje y manutención.

El esquema de inmunización consistió en la inyección del antígeno escogido en el día 0, 15 y 30 luego de la finalización de los experimentos iniciales. En el día 45, todos los renacuajos fueron sacrificados para su posterior sangrado. Se utilizó una centrifuga para capilares para separar el plasma sanguíneo, el cuál fue congelado después de su separación. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio para determinar la cantidad de inmunoglobulinas presentes en los renacuajos luego de ser inmunizados.

Para esta prueba utilizamos anticuerpos monoclonales 10A9 (anti-IgM), 6.16 (anti-IgM) y (11D5 (anti-IgY). Todos obtenidos a partir de peroxidasa de rábano conjugada con anticuerpos de cabra anti-ratón (Ramsey *et al.* 2010). El protocolo utilizado para este ELISA se encuentra en el **Anexo 9**.

Todos los ensayos histológicos e inmunológicos fueron realizados en el laboratorio del Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica.

Análisis Estadístico

Las variables fisiológicas “peso” y “crecimiento” no se ajustaron a la normalidad debido a la gran variación existente entre los individuos de cada tratamiento. Para estas dos variables se llevó a cabo un Anova Factorial. Luego de esto, para corroborar los resultados del Anova, se procedió a realizar un Modelo Lineal Generalizado utilizando distribución Gamma para cada variable. Además se realizó un análisis de Bootstrap para evaluar la variación en la dispersión del peso y crecimiento en cada tratamiento a partir de los coeficientes de variación (Boirojú & Reddy 2012).

Con respecto a la variable “desarrollo larval” se procedió a realizar dos categorías de desarrollo, la primera de ellas se denominó desarrollo bajo y englobaba a todos los individuos con estadios Gosner de 26 hasta 30. La segunda categoría se denominó desarrollo alto y contenía a los individuos con estadios del 31 al 40. Para esta variable se llevó a cabo una regresión logística binaria multivariada. Para el caso de la variable fisiológica “mortalidad” se obtuvieron las proporciones de mortalidad para cada tratamiento y se realizó un Modelo Lineal Generalizado con distribución binomial.

Se llevó a cabo un análisis de Manova para los perfiles de leucocitos así como para los conteos totales de eritrocitos y leucocitos con el fin de determinar la existencia de diferencias ocasionadas por el efecto de los factores de estrés de los tratamientos utilizados. Se calcularon los valores absolutos para cada muestra de frotis utilizando los valores totales de linfocitos por tratamiento, para el análisis de estos datos también se llevó a cabo un Manova. En los análisis de Manova que mostraban diferencias significativas se procedió a realizar Anovas factoriales como una prueba a posteriori, esto con el fin de determinar en donde se encontraban diferencias reportadas (Boone *et al.* 2004, Buck *et al.* 2012). Para analizar si existían diferencias en los valores de las proporciones de neutrófilos/linfocitos se utilizó un Modelo lineal con distribución binomial.

Para el caso de la concentración de corticosteroides, obtuvimos algunas muestras con valores detectables por el kit sin embargo se encontraban por debajo de los valores obtenidos por la curva de estándares (20 pg/L), por lo tanto a todos los datos que se encontraban por debajo de este valor se les asignó un valor de 20 pg/L. Una vez llevado a cabo este cambio, se procedió a realizar un Anova factorial y un Modelo lineal generalizado para corroborar los resultados del Anova ya que los datos no poseían una distribución normal.

Todos los análisis mencionados anteriormente para las variables fisiológicas y las inmunológicas fueron llevados a cabo con el programa estadístico “Jump 7”.

Resultados

Mediciones de parámetros físico-químicos

Los valores de pH, conductividad y temperatura obtenidos del agua de los mesocosmos durante todo el transcurso de esta investigación mostraron poca variación en el tiempo, por lo tanto se puede afirmar que los renacuajos focales estuvieron expuestos a condiciones físico-químicas similares durante los experimentos de estrés (Figuras 5, 6 y 7).

Variables de desarrollo

Los resultados obtenidos en las diferentes variables fisiológicas e inmunológicas muestran una diferencia significativa entre el tratamiento control y el control solvente. Por esto se decidió eliminar en los análisis posteriores al tratamiento control y utilizar al solvente (acetona) como comparación con los demás tratamientos.

La variable crecimiento mostró un efecto significativo en renacuajos expuestos al endosulfán beta en concentraciones altas (Fig 8). La disminución en crecimiento se presentó cuando este plaguicida se encontraba de manera individual con un promedio de crecimiento de 30.84 ± 2.76 mm, así como cuando estaba combinado con el fungicida clorotalonil y con la presencia de depredador, creciendo en promedio 34.18 ± 4.38 mm y 33.8 ± 3.85 mm, respectivamente (Cuadro 1). Estos mismos resultados se obtienen cuando se analizan utilizando un modelo lineal generalizado con distribución gamma ($\text{Chi}^2 = 4.59$, $\text{gl} = 1$, $p = 0.03$).

Este mismo patrón se observó en el peso de los renacuajos expuestos a concentraciones altas de endosulfán beta (Fig. 9). Dichas diferencias significativas se dieron cuando este plaguicida se aplicó individualmente y cuando se presentó en combinación con el fungicida clorotalonil (Cuadro 2); en estos tratamientos los renacuajos tuvieron un peso promedio de 0.79

g y 0.99 g respectivamente. Estos resultados son corroborados por el análisis del Modelo lineal generalizado ($\text{Chi}^2 = 21.54$, $\text{gl} = 1$, $p = 0.00$).

La presencia del depredador por sí misma no generó disminuciones o aumentos en el desarrollo de los renacuajos, sin embargo ocasionó una alta variación tanto en el peso como en el crecimiento de los mismos (Fig. 10 y 11).

Con respecto al desarrollo larval, el clorotalonil en concentración alta parece estimular el desarrollo de renacuajos, pues en esa concentración es 1.7 veces más probable que los renacuajos desarrollen estadios avanzados Gosner que en los controles (Odds ratio = 1.71, $\text{gl} = 1$, $p = 0.015$) (Fig. 12). Por otro lado, los renacuajos expuestos a concentraciones bajas de endosulfán beta tienen mayor probabilidad de quedarse en estadios tempranos Gosner comparados con el desarrollo de los individuos control (Odds ratio = 0.601, $\text{gl} = 1$, $p = 0.032$) (Fig 13).

Por último, no se encontraron diferencias significativas en la mortalidad generada por cada tratamiento ($F_{5,76} = 0.98$, $p = 0.96$). La proporción de individuos muertos es en promedio un 15%, sin embargo no hay un patrón que indique mortalidades atribuibles al efecto de los factores de estrés utilizados en esta investigación (Fig. 14).

Variables inmunológicas

En cuanto a los perfiles leucocitarios, se categorizaron los tipos de leucocitos según su forma y coloración (**Anexo 10**). Los resultados de estos perfiles generales muestran efectos significativos en la cantidad de leucocitos en renacuajos expuestos a diferentes tratamientos ($F_{5,92} = 3.13$, $p = 0.012$) (Cuadro 3). Además se encontró un aumento en el número de neutrófilos

ocasionado por la exposición a concentraciones altas de endosulfán beta ($F_{2,92} = 3.22, p = 0.045$) (Fig. 15). Por su parte, los renacuajos expuestos a concentraciones bajas de clorotalonil muestran aumentos en el número de monocitos ($F_{2,92} = 3.77, p = 0.027$) (Fig. 16) y eosinófilos en sangre ($F_{2,92} = 3.28, p = 0.043$) (Fig. 17). Varios tratamientos influyeron en el aumento de las cantidades de linfocitos en sangre, entre ellos están: clorotalonil, endosulfán beta, depredador con clorotalonil, clorotalonil con endosulfán beta, depredador con endosulfán beta y clorotalonil (Cuadro 4). Cabe destacar la interacción encontrada entre factores de estrés que produce aumentos en la cantidad de linfocitos en sangre (Fig. 18 y 19). Por último, ninguno de los tratamientos utilizados en esta investigación generó un aumento en los basófilos en sangre ($F_{5,92} = 0.51, p = 0.77$).

La proporción N/L no mostró afectaciones por ninguno de los factores de estrés utilizados ($\text{Chi}^2_{5,92} = 0.45, p = 0.998$). Esto pudo deberse al aumento en el número de linfocitos generado por la exposición a varios tratamientos de estrés (Cuadro 4).

La presencia de clorotalonil generó aumentos significativos en el número de eritrocitos y leucocitos totales ($F_{5,118} = 2.82, p = 0.019$). En el caso de los eritrocitos totales el aumento se dio en renacuajos expuestos a concentraciones bajas del fungicida clorotalonil ($F_{2,118} = 5.96, p = 0.003$) (Fig 20). Los resultados de los análisis de la cantidad de leucocitos totales no muestran ningún efecto ocasionado por los factores de estrés utilizados ($F_{2,118} = 1.41, p = 0.224$) (Fig 21).

La concentración de corticosteroides en sangre no se vió afectada por la presencia del depredador ni por la exposición a clorotalonil. Por su parte, los renacuajos expuestos a

endosulfán beta en concentraciones altas sí mostraron un aumento significativo en esta hormona ($F_{2,158} = 3.66, p = 0.028$) (Fig 22).

Por último, no se obtuvieron resultados del análisis de detección de anticuerpos IgY e IgM. Esto debido a que las inmunoglobulinas 10A9 (anti-IgM), 6.16 (anti-IgM) y 11D5 (anti-IgY) posiblemente se degradaron y perdieron su capacidad de detectar anticuerpos, ya que se realizaron varias pruebas utilizando sueros de individuos inmunizados y no se obtuvo ninguna reacción. También se realizó un análisis Dot-blotting (**Anexo 11**) para corroborar la efectividad de las inmunoglobulinas dando resultados negativos. Por tanto, no se puede generar ningún resultado a partir de la prueba inmunológica planteada.

Otras observaciones

Además de los efectos encontrados en el desarrollo y respuesta inmune en los renacuajos expuestos a factores de estrés, también se llevaron a cabo observaciones directas de efectos adversos encontrados en los sujetos experimentales. Uno de estos efectos fue la presencia de nadados erráticos en los renacuajos expuestos a tratamientos con endosulfán beta. Encontramos en 4 renacuajos de diferentes tratamientos con presencia de este insecticida un comportamiento inusual en su natación (Cuadro 5), ya que se observaban en tiempos prolongados sin movimiento mientras se encontraba boca arriba, luego de algunos lapsos de tiempo procedían a nadar de manera errática en la parte de arriba de la columna de agua. Este efecto en el comportamiento de los renacuajos se dio en su mayoría luego de 2-4 semanas después de comenzados los experimentos de mesocosmos. Otro efecto adverso documentado fue la presencia de malformaciones en la cola de varios individuos de diferentes tratamientos, estas malformaciones

fueron observadas cuando los renacuajos fueron sacrificados al final de los experimentos (Fig. 23). Es importante mencionar que los 6 individuos con estas malformaciones pertenecían a tratamientos con la presencia de ambos plaguicidas, la presencia del depredador y del control solvente. Esto último no nos permite establecer el causante de las malformaciones, ya que al tener individuos pertenecientes al tratamiento control solvente con este tipo de afectaciones indica que no es posible atribuirlo a ninguno de los factores de estrés analizados (Cuadro 5).

La presencia de daño abdominal se encontró en algunos individuos, ya que se observó ruptura del integumento exponiendo los intestinos de los renacuajos (Fig. 24). Esto se encontró en 5 ocasiones en individuos expuestos a tratamientos con endosulfán beta tanto solitario como en combinaciones con otros factores de estrés. Los individuos que presentaban este daño se encontraban vivos cuando fue documentado este efecto. Por último observamos en un individuo expuesto a la combinación de ambos plaguicidas en concentraciones bajas la presencia de un hematoma en su cola (Cuadro 5).

Discusión

Con esta investigación se demostró cómo la exposición a múltiples estresores químicos afectan tanto procesos de desarrollo como el sistema inmune de renacuajos de *L. taylori* que habitan las zonas medias-altas de Costa Rica.

El endosulfán beta es conocido por generar efectos neurotóxicos sobre vertebrados ya que funciona como un antagonista del neurotransmisor GABA, lo que afecta los canales de Cl

e inhibe el Ca^{+2} , Mg^{+2} así como la enzima ATPasa (Vale *et al.* 2003, Pereira *et al.* 2012). Los resultados de esta investigación muestran alteraciones en el comportamiento de renacuajos expuestos a este plaguicida, específicamente la presencia de nados erráticos en remolino y torsiones involuntarias del cuerpo. Esto se debe a la generación de periodos de hiperexcitabilidad seguidos de una disminución nerviosa en el control muscular y neural en los renacuajos (Bernabó *et al.* 2013). Las afectaciones a nivel nervioso tienen la capacidad de comprometer funciones biológicas como la orientación en el hábitat así como la búsqueda y competencia por alimento (Broomhall *et al.* 2004, Bernabó *et al.* 2013). Brunnelli *et al.* (2009) reportan que renacuajos de *Bufo bufo* expuestos a endosulfán beta de manera crónica presentan disminuciones en el crecimiento. Además, Broomhall *et al.* (2004) encontró que este plaguicida disminuye la tasa de alimentación de renacuajos de *Limnodynastes peronii* luego de 48 h de estar expuestos a este plaguicida. Las afectaciones en variables de desarrollo encontradas en esta investigación son una señal clara de que los procesos de alimentación en los renacuajos de *L. taylori* son afectados por la presencia de este estresor químico en el agua (Brunnelli *et al.* 2009).

Los efectos negativos que ocasiona el endosulfán beta sobre el desarrollo de los renacuajos tienen importantes repercusiones a nivel poblacional ya que amplía el tiempo en el cuál los renacuajos se mantienen en las lagunas. Esto se puede traducir en un aumento en la posibilidad de ser afectados por periodos de estrés hídrico provocado por altas temperaturas y alta radiación solar que se dan en el hábitat de esta especie. Este fenómeno fue observado durante esta investigación ya que algunas de las lagunas en que habita *L. taylori* se secaron completamente, lo que ocasionó mortalidades masivas de renacuajos de esta especie (Datos sin publicar). Por lo tanto, la presencia de endosulfán beta en el agua de estos ecosistemas puede volver vulnerables

a los renacuajos a la desecación de sus hábitats, lo que aumentaría el estrés que pueda ocasionar este fenómeno ambiental así como las mortalidades en larvas de anfibios.

En esta investigación se documentó la presencia de estrés en los renacuajos expuestos a endosulfán beta debido al aumento de corticosteroides y de neutrófilos en sangre. Varios estudios recientes (Kinderman *et al.* 2012, Gabor *et al.* 2013, Peterson *et al.* 2013) señalan una relación entre infecciones del hongo *Bd* y estrés fisiológico en algunas especies de anfibios. La presencia crónica de corticosteroides puede inhibir la respuesta inmune de los anfibios, volviéndolos más vulnerables ante el ataque de patógenos (Falso 2011, Buck *et al.* 2012, Searle *et al.* 2014). Ante esto es importante mencionar que paralelo a esta investigación se encontró la presencia de *Bd* en juveniles de *L. taylori* en las lagunas utilizadas para la colecta de huevos de esta especie (Datos sin publicar); por lo tanto el estrés producido por la presencia de endosulfán beta en el hábitat de esta especie podría estar ocasionando aumentos en las infecciones por *Bd*.

Con respecto al clorotalonil, el mecanismo de acción de este plaguicida se basa en reducir el glutatión intracelular en formas más simples por lo tanto no puede participar en reacciones enzimáticas durante la respiración celular (Grabusky *et al.* 2004). La aceleración del desarrollo larval generada por la presencia de clorotalonil en el agua de los mesocosmos pudo resultar una respuesta fisiológica desarrollada por los renacuajos para disminuir el tiempo de exposición a este químico. Muchas especies de anfibios en estado larval disminuyen el tiempo en el que realizan su desarrollo cuando están expuestos a estrés ya que intentan evadir rápidamente dicha situación (Greulich & Pflugmacher 2003). Este mecanismo utilizado por los renacuajos de *L. taylori* para evadir el efecto de este tóxico puede traer beneficios momentáneos,

sin embargo, puede tener costos importantes a futuro ya que compromete procesos de desarrollo, competencia y éxito reproductivo (Greulich & Pflugmacher 2003, Brunnelli *et al.* 2009).

Por otro lado, el clorotalonil también es conocido por su capacidad de dañar el ADN de linfocitos (Lebailly *et al.* 1997). Renacuajos expuestos a este plaguicida mostraron aumentos en linfocitos, eosinófilos y macrófagos, una respuesta posiblemente mediada por células NK y linfocitos T citotóxicos ante el daño generado en el ADN de linfocitos como se ha visto en otras exposiciones por este plaguicida (Shelley *et al.* 2009, MacMahon *et al.* 2011, Amadori 2016). Esta respuesta citotóxica puede a su vez potenciar la liberación de células fagocíticas y linfocitos generando mayor presencia de los mismos en sangre (Kindt *et al.* 2007).

MacMahon *et al.* (2011) reportó la presencia de efectos tóxicos que no siguen una tendencia clara por parte del clorotalonil sobre la mortalidad en renacuajos. Esta misma tendencia se encontró en esta investigación debido a los aumentos en eritrocitos y leucocitos registrados en los tratamientos con concentraciones bajas, mientras que las concentraciones altas no sucedió lo mismo. Esto hace pensar que el comportamiento de este plaguicida es bastante complejo ya que no sigue una tendencia clara en cuanto al aumento en su concentración y los efectos tóxicos que provoca. Por lo tanto, no sería necesaria la presencia de este plaguicida en concentraciones altas en el ambiente para generar una afectación en la respuesta inmune en las poblaciones de anfibios de zonas medias-altas.

La acción sinérgica entre varios factores estresantes puede ser una de las principales causas del aumento en la prevalencia de ciertos patógenos que afectan a los anfibios (Rollins-

Smith *et al.* 2011). En esta investigación se identificó la presencia de efectos sinérgicos en la toxicidad del endosulfán beta y clorotalonil cuando se presentaban en combinación, esto provocó la disminución del crecimiento de los renacuajos y el aumento en los linfocitos en sangre. Ambos efectos tienen la capacidad de alterar la homeostasis de los renacuajos influyendo en su desarrollo y respuesta inmune. Los efectos de las sinergias encontradas entre los plaguicidas analizados podrían ser un factor importante a considerar en cuanto a la conservación de anfibios de zonas medias-altas, ya que estos plaguicidas tienen la capacidad de tener alta persistencia en estas zonas debido a las condiciones ambientales que las caracterizan (Daly *et al.* 2007a, Shunthirasingham *et al.* 2011). Por lo tanto, las poblaciones de anfibios de altura no solo se encuentran expuestas a la presencia de plaguicidas en sus hábitats sino también a la interacción entre ellos y con otros factores bióticos que pueden perjudicar la salud de sus individuos. Por tanto, es de gran importancia seguir evaluando el efecto de otros plaguicidas y estresores bióticos de manera integral con el fin de establecer la manera en como afectan estas sustancias a los anfibios en sus hábitats naturales.

Por último, la alta variación en crecimiento y peso de los renacuajos expuestos a la presencia de depredadores nos indica que dentro de una misma camada de individuos existe una gran variabilidad intrínseca. Además de que posiblemente la plasticidad fenotípica también juega un papel importante al ocasionar que algunos individuos desarrollen colas más largas y musculosas con el fin de evadir la posibilidad de ser depredados (Laurila 2003, Kraft *et al.* 2006). A nivel ecológico este fenómeno es importante ya que ayuda a aumentar las probabilidades de sobrevivir ante factores de riesgo naturales. Por otro lado, relacionado a esto, nuestros resultados indican que la presencia de depredadores de manera crónica en los mesocosmos no fue un factor

que afectara a los renacuajos, esto posiblemente se dio debido a la adaptación de los individuos al riesgo de depredación conforme avanzaba el tiempo de la investigación (Laurila *et al.* 2004, 2008, Dahl *et al.* 2012). Por lo tanto, la presencia de depredadores, específicamente de larvas de odonatos pareciera no ser un factor estresante a largo plazo para renacuajos de *L. taylori* de zonas altas.

Conclusiones

Los hallazgos de esta investigación muestran como las poblaciones de renacuajos de *L. taylori* que habitan zonas altas estarían siendo afectadas por concentraciones subletales de los plaguicidas endosulfán beta y clorotalonil en ecosistemas acuáticos. Los datos de esta investigación muestran el primer hallazgo que relaciona al plaguicida endosulfán beta con aumentos en corticosteroides en anfibios. Poblaciones de renacuajos en estado de estrés crónico pueden ver afectados procesos importantes como lo son el desarrollo larval y la respuesta inmune. Este tipo de efectos pueden disminuir el valor adaptativo de los renacuajos así como aumentar la probabilidad de sean infectados por patógenos emergentes o ser afectados por procesos de estrés hídrico, lo que podría ocasionar declines poblacionales.

Cabe destacar la capacidad que tiene el plaguicida clorotalonil de acelerar el desarrollo de los renacuajos lo que afecta en el futuro su valor adaptativo; además de generar efectos citotóxicos sobre las células inmunitarias que podrían provocar gastos energéticos adicionales. Por otro lado, la toxicidad de este plaguicida no presenta un comportamiento lineal conforme

aumenta su concentración, lo que hace a esta sustancia aún más compleja en su afectación a anfibios.

Con respecto al efecto ocasionado por factores bióticos y la generación de estrés en anfibios, indica que la presencia de depredadores puede provocar afectaciones sobre algunos individuos, sin embargo dicho efecto tiende a desaparecer al darse una exposición crónica. Por otro lado, los resultados obtenidos en cuanto al aumento en el tiempo de desarrollo de los renacuajos y las mortalidades masivas por estrés hídrico observadas en los sitios de estudio, nos indican que es importante evaluar en investigaciones futuras el papel que juega la desecación de los hábitats acuáticos de zonas altas sobre los declines poblacionales de anfibios.

El aumento en la toxicidad de ambas sustancias al encontrarse combinadas es un factor de alta importancia al tratar de entender cómo afectan los plaguicidas a las poblaciones de anfibios. Los resultados sinérgicos de esta investigación dan una muestra de lo que está sucediendo en los hábitats de anfibios de zonas altas, sin embargo es necesario evaluar el efecto individual y grupal de otros plaguicidas que puedan estar presentes en estos sitios, esto con el fin de establecer de manera integral la influencia de estresores químicos sobre los declines enigmáticos ocurridos en estos lugares.

Cuadros

Cuadro 1. Resumen del análisis de Manova realizado para el crecimiento de los renacuajos de *L. taylori* expuestos a factores de estrés (g.l. 905).

<i>MANOVA tamaño</i>	g.l	F	P
Depredador	1	3.29	0.070
Endosulfán beta	2	3.30	0.037
Clorotalonil	2	0.39	0.671
Depredador*Endosulfán beta	2	0.79	0.450
Depredador*Clorotalonil	2	1.37	0.254
Endosulfán beta*Clorotalonil	4	3.74	0.005
Depredador*Endosulfán beta*Clorotalonil	4	2.75	0.027

Cuadro 2. Resumen del análisis de Manova realizado para los pesos de los renacuajos de *L. taylori* expuestos a factores de estrés (g.l. 902).

<i>MANOVA peso</i>	g.l	F	P
Depredador	1	0.05	0.810
Endosulfán beta	2	11.17	0.000

Clorotalonil	2	2.34	0.096
Depredador*Endosulfán beta	2	0.31	0.733
Depredador*Clorotalonil	2	1.17	0.311
Endosulfán beta*Clorotalonil	4	2.89	0.021
Depredador*Endosulfán beta*Clorotalonil	4	2.27	0.060

Cuadro 3. Resumen del análisis de Manova realizado para los perfiles de leucocitos obtenido de los renacuajos de *L. taylori* expuestos a factores de estrés (g.l 241).

<i>MANOVA perfiles de leucocitos</i>	g.l	F	<i>p</i>
Depredador	1	0.68	0.557
Clorotalonil	2	3.13	0.002
Endosulfán beta	2	2.76	0.005
Depredador * Clorotalonil	2	3.04	<0.001
Depredador * Endosulfán beta	2	0.94	0.507
Clorotalonil * Endosulfán beta	4	3.32	<0.001
Depredador * Clorotalonil * Endosulfán beta	4	2.77	<0.001

Cuadro 4. Resumen del análisis de Anova factorial realizado para los linfocitos en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a factores de estrés (g.l. 91)

<i>ANOVA perfiles de leucocitos</i>	g.l	F	<i>p</i>
Depredador	1	0.34	0.557
Clorotalonil	2	7.07	0.002
Endosulfán beta	2	5.76	0.005
Depredador * Clorotalonil	2	7.28	0.001
Depredador * Endosulfán beta	2	2.67	0.075
Clorotalonil * Endosulfán beta	4	16.83	<0.001
Depredador * Clorotalonil * Endosulfán beta	4	12.88	<0.001

Cuadro 5. Efectos adversos ocasionados por los factores de estrés en los diferentes tratamientos analizados (C = clorotalonil, D = depredador, E = endosulfán beta, A = concentración alta, B = concentración baja).

Efectos adversos	Tratamiento
Renacuajo con movimientos erráticos	EB_CB
Renacuajo con movimientos erráticos	EA_CA
Renacuajo con movimientos erráticos	D_EA_CA
Renacuajo con movimientos erráticos	EB
Malformación en cola	EA_CA
Malformación en cola	SOL

Malformación en cola	D
Malformación en cola	D_EB
Malformación en cola	D_EB_CB
Malformación en cola	D_EA_CB
Hematoma en cola	EB_CB
Daño abdominal. Intestino expuesto	EA
Daño abdominal. Intestino expuesto	EA
Daño abdominal. Intestino expuesto	CA
Daño abdominal. Intestino expuesto	D_EA
Daño abdominal. Intestino expuesto	D_EB_CB

Figuras

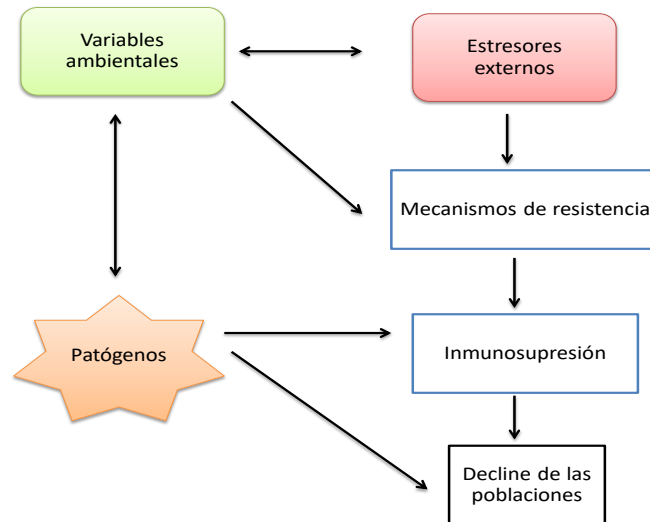


Fig. 1. Hipótesis de factores estresantes y su posible impacto en la respuesta inmune y los declines enigmáticos poblacionales de anfibios.



Fig. 2. Imagen satelital de la las lagunas utilizadas en esta investigación, ubicadas en el Campus de la Universidad Withworth, Costa Rica.

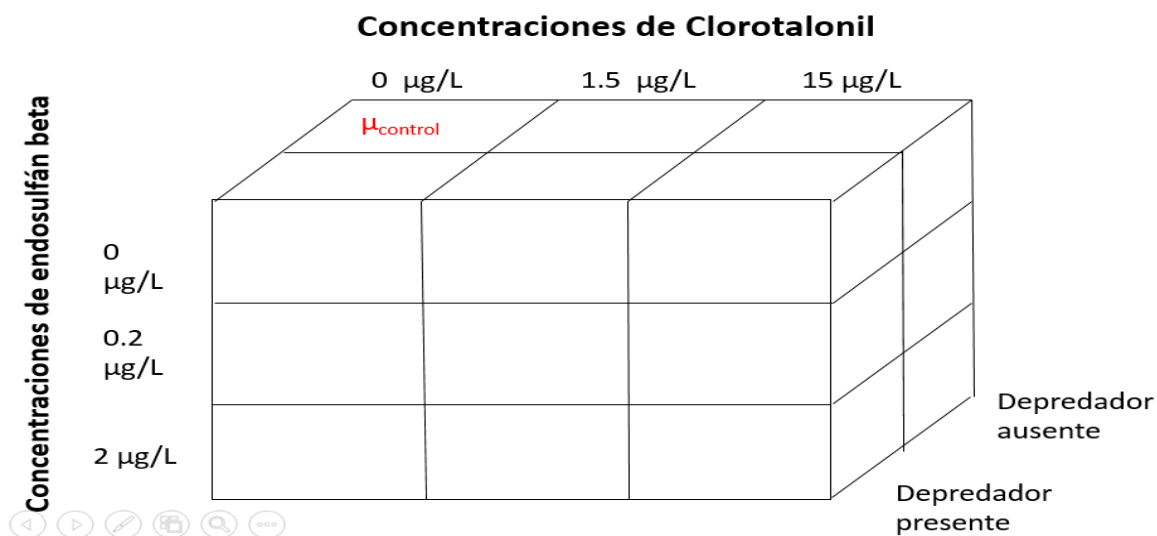


Fig. 3. Diseño experimental del efecto individual y sinérgico de diferentes factores estresantes sobre renacuajos de *L. taylori*. Efecto de dos plaguicidas (clorotalonil y endosulfán beta) con dos concentraciones diferentes y efecto de la presencia de depredadores en la respuesta inmune de larvas de anfibios.

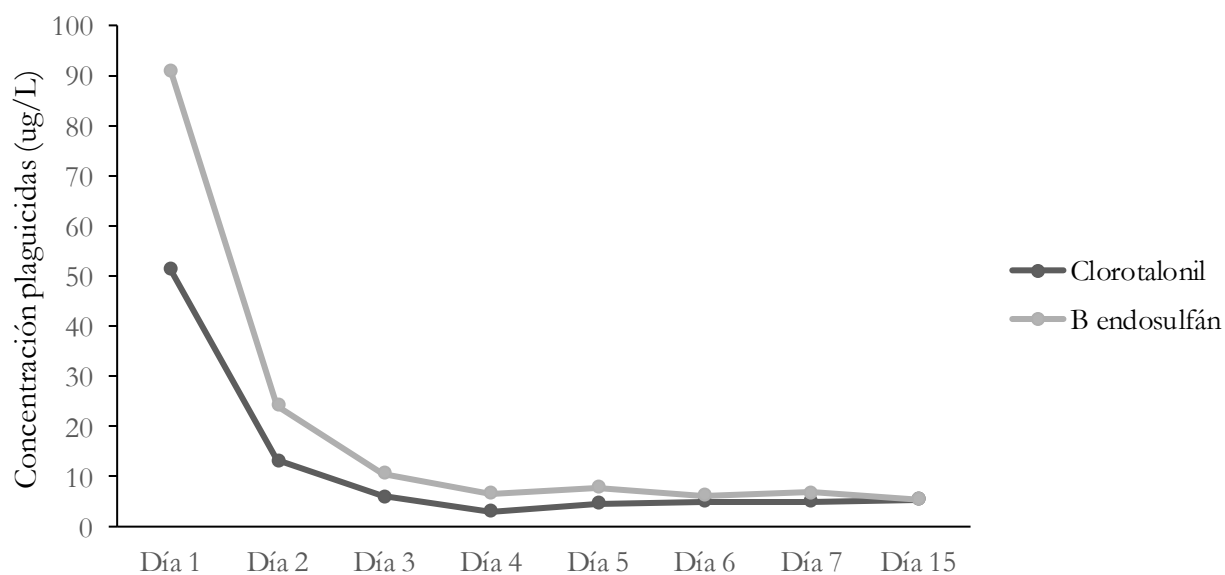


Fig. 4. Curva de degradación del fungicida clorotalonil y del insecticida endosulfán beta, obtenida a partir de dopajes controlados en un mesocosmo experimental.

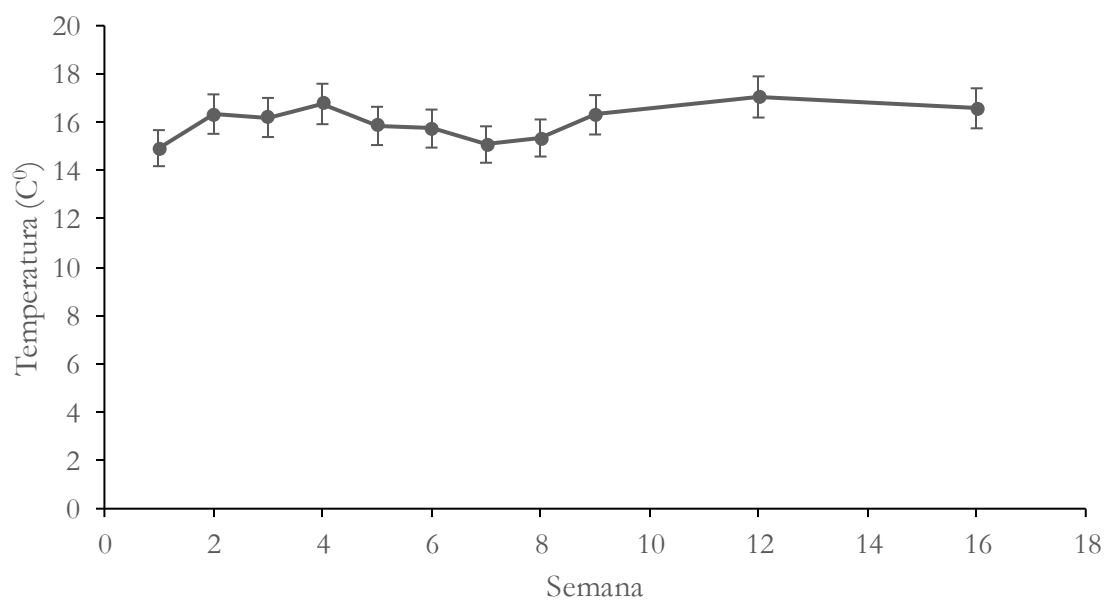


Fig. 5. Promedio de temperaturas (°C) tomadas semanalmente del agua de los mesocosmos utilizados en los experimentos de exposición a factores estresantes. Las barras de error representan $\pm 1 S$.

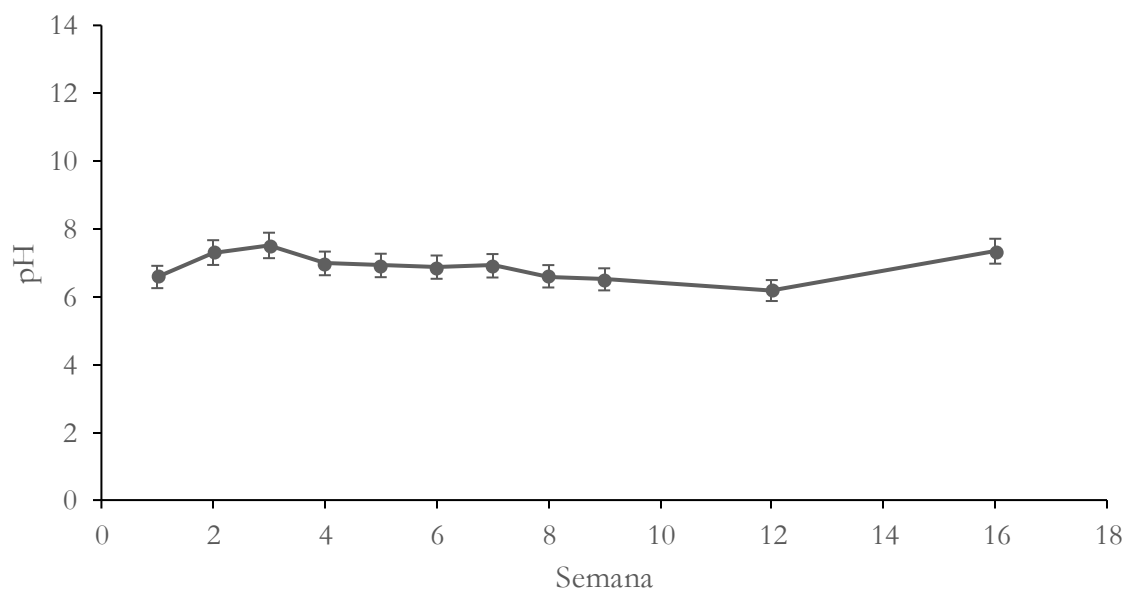


Fig. 6. Promedios de valores de pH tomados semanalmente del agua de los mesocosmos utilizados en los experimentos de exposición a factores estresantes. Las barras de error representan ± 1 S

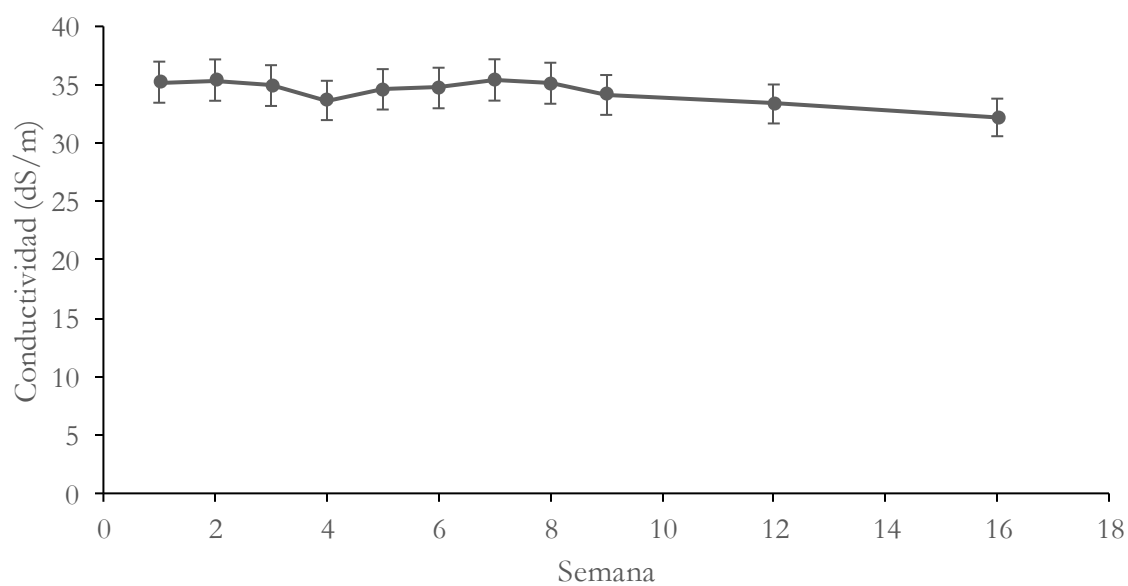


Fig. 7. Promedio de valores de conductividad (dS/m) obtenidos semanalmente del agua de los mesocosmos experimentales. Las barras de error representan ± 1 S.

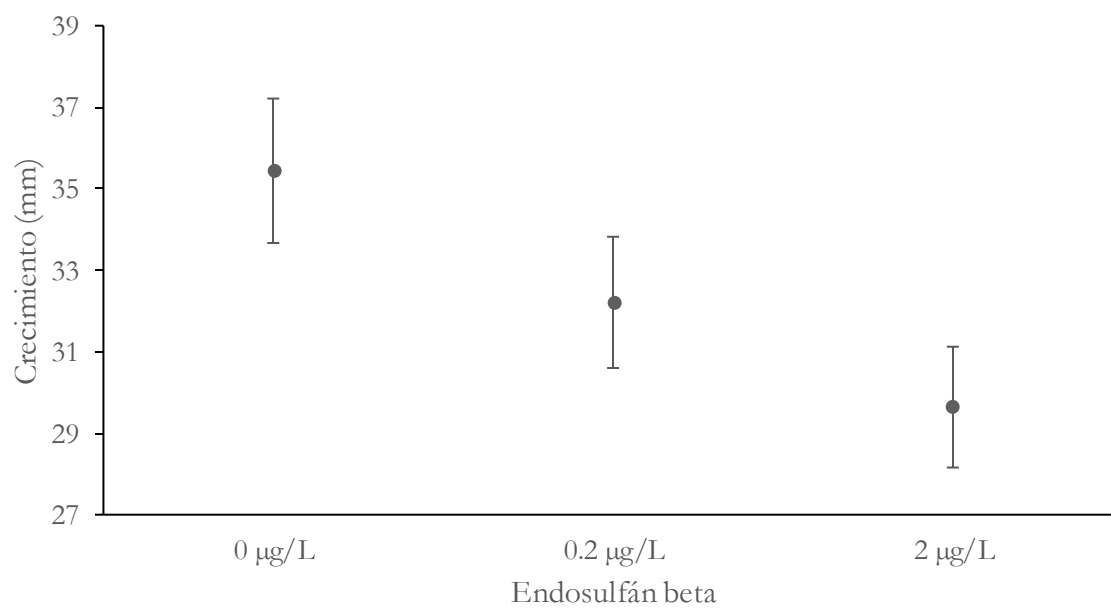


Fig. 8. Promedios de crecimiento de los renacuajos de *L. taylori* expuestos de manera crónica a diferentes concentraciones del insecticida endosulfán beta. Las barras de error representan ± 1 S.

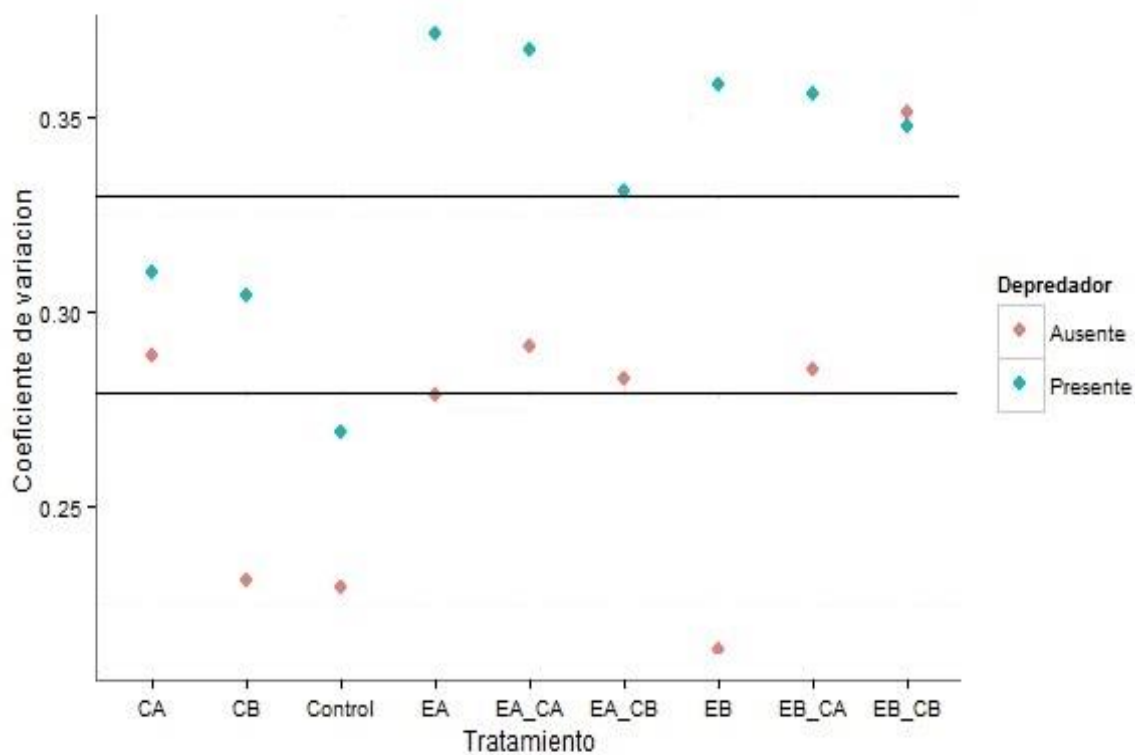


Fig. 9. Coeficientes de variación de los tamaños de los renacuajos de *L. taylori* expuestos a los diferentes factores de estrés (C = clorotalonil, E = endosulfán, A = concentración alta, B = concentración baja). Las barras horizontales negras representan los intervalos de confianza del promedio de los coeficientes de variación de todos los tratamientos.

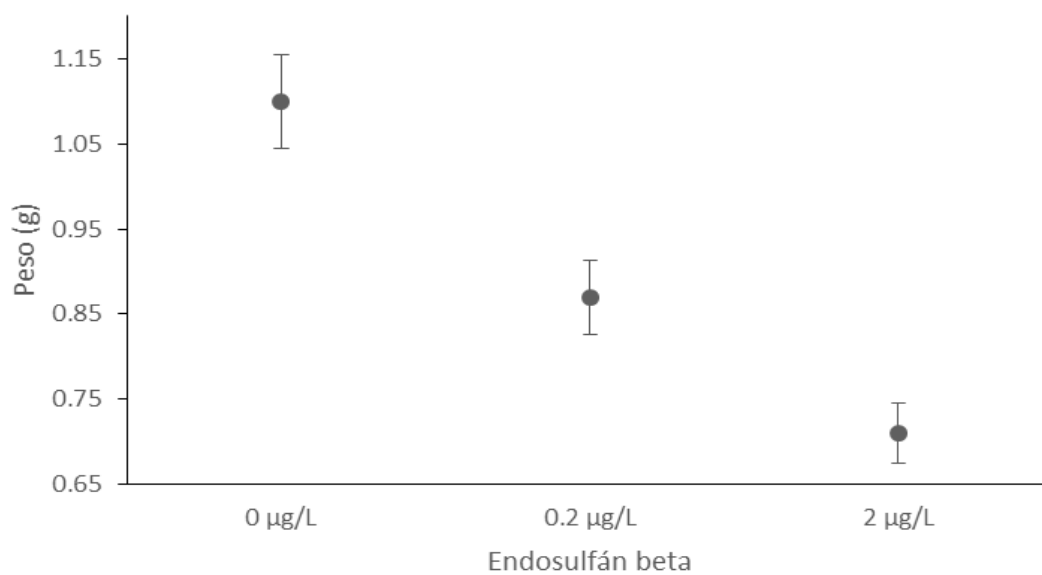


Fig. 10. Promedios de pesos de los renacuajos de *L. taylori* expuestos de manera crónica a diferentes concentraciones del insecticida endosulfán beta. Las barras de error representan ± 1 S.

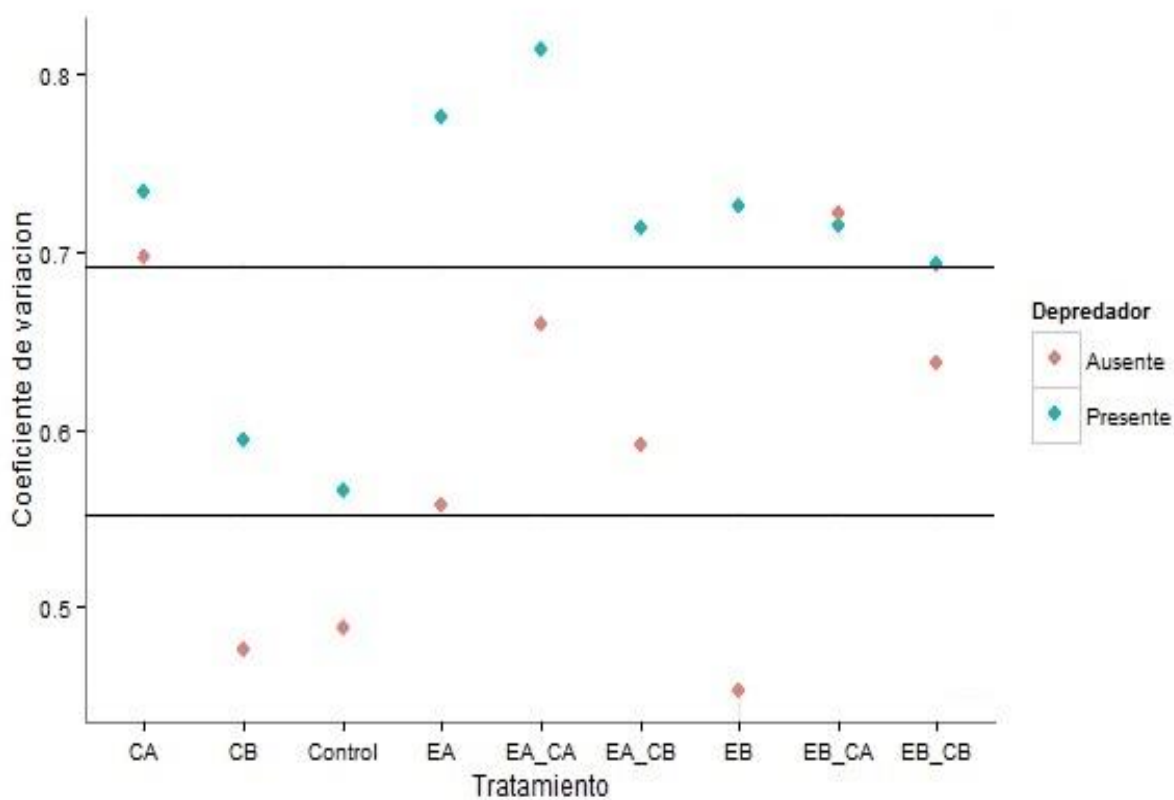


Fig. 11. Coeficientes de variación de los pesos de los renacuajos de *L. taylori* expuestos a los diferentes factores de estrés (C = clorotalonil, E = endosulfán, A = concentración alta, B = concentración baja). Las barras horizontales negras representan los intervalos de confianza del promedio de los coeficientes de variación de todos los tratamientos.

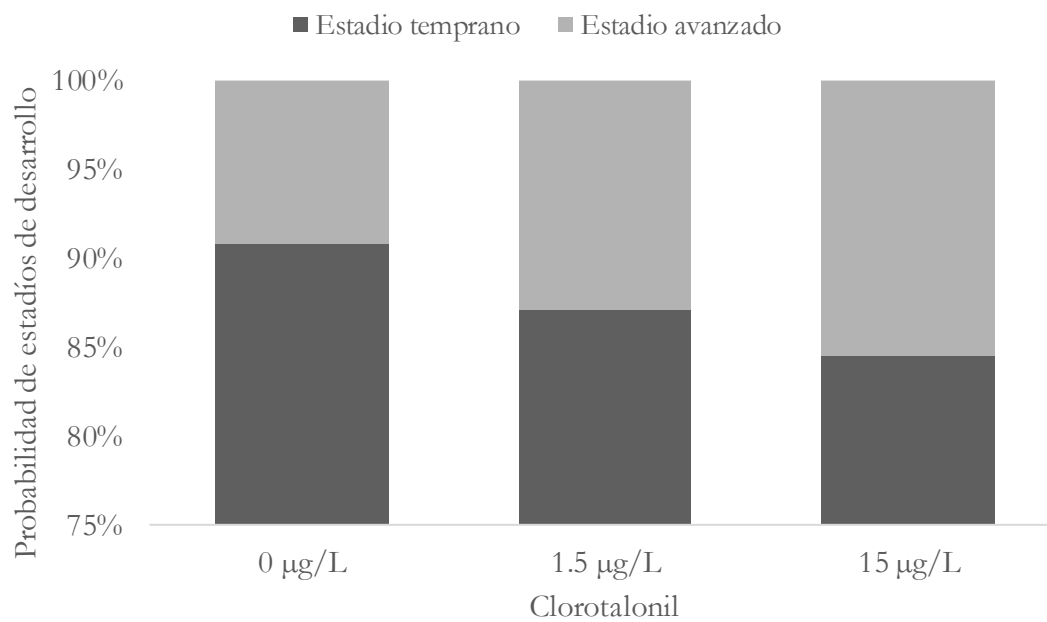


Fig. 12. Probabilidad de que renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones del plaguicida clorotalonil puedan desarrollar estadios Gosner tempranos o avanzados.

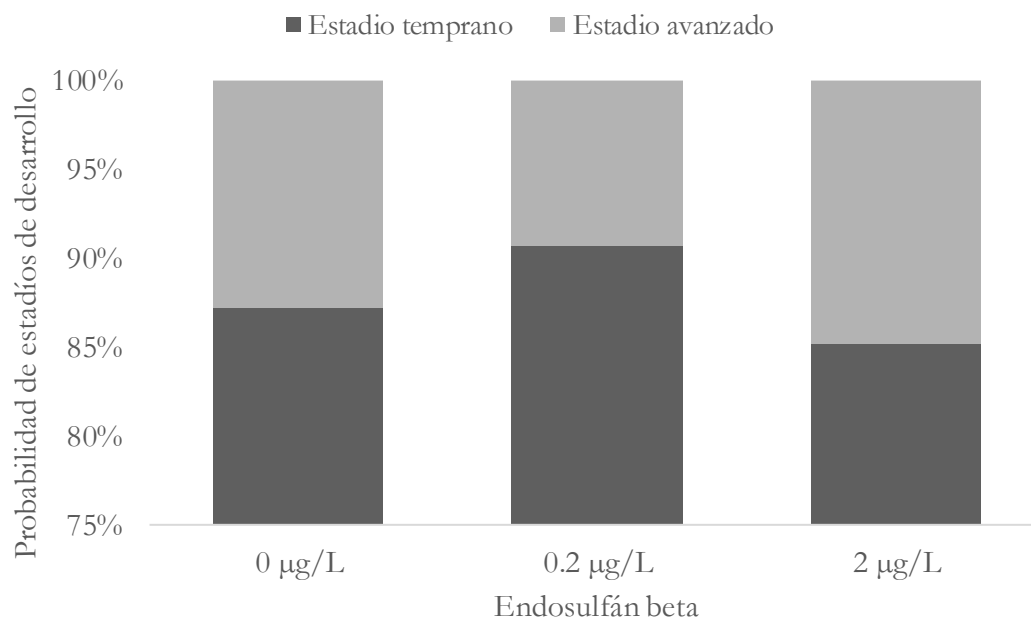


Fig. 13. Probabilidad de que renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones del plaguicida endosulfán beta puedan desarrollar estadios Gosner tempranos o avanzados.

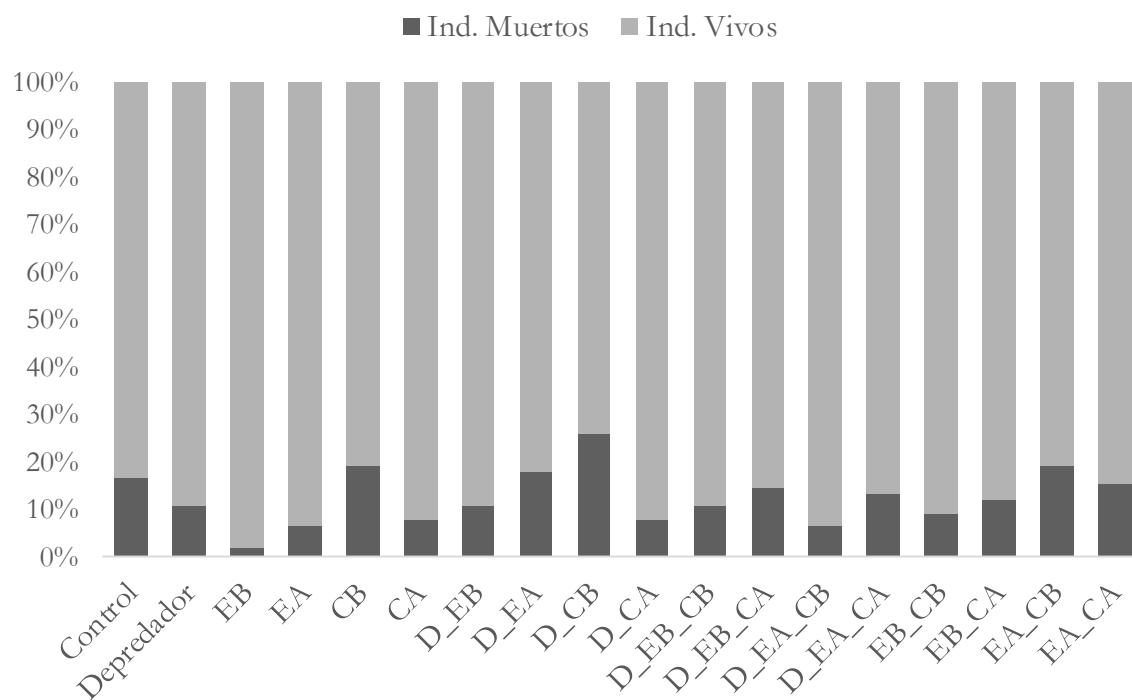


Fig. 14. Proporción de renacuajos de *L. taylori* muertos luego de ser expuestos a factores estresantes (C = clorotalonil, E = endosulfán, A = concentración alta, B = concentración baja).

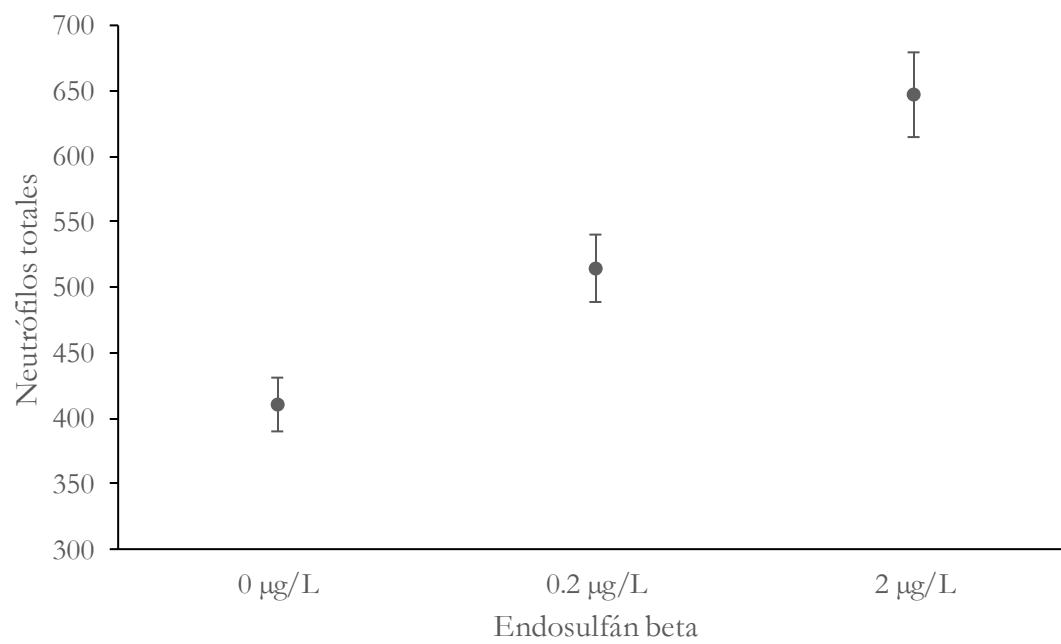


Fig. 15. Promedios de neutrófilos totales en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones de endosulfán beta. Las barras de error representan ± 1 S.

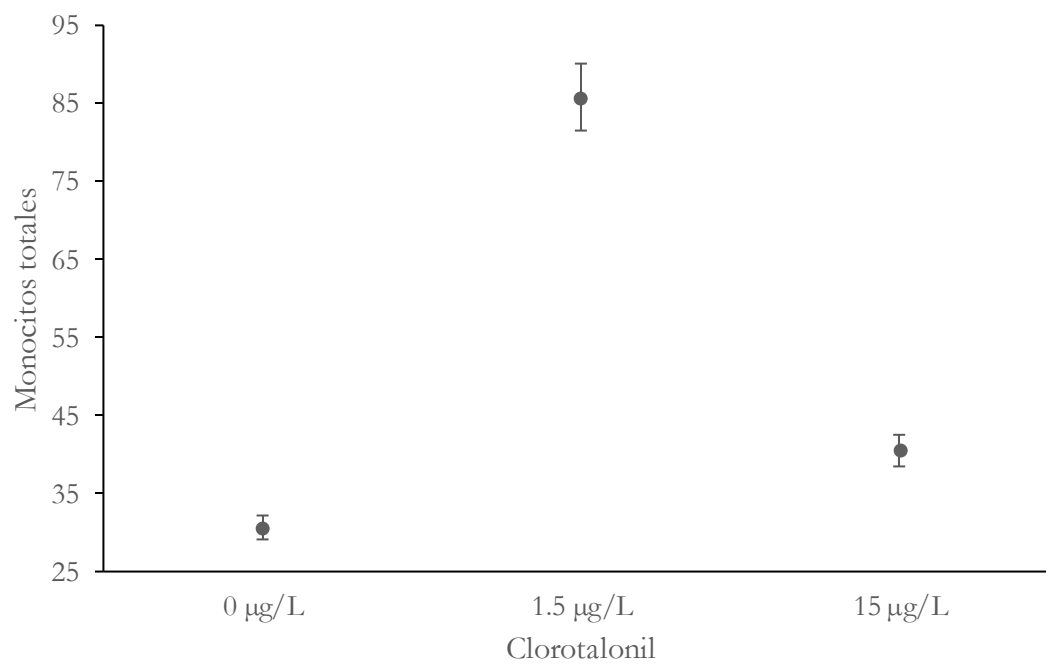


Fig. 16. Promedios de monocitos totales en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones de clorotalonil. Las barras de error representan ± 1 S.

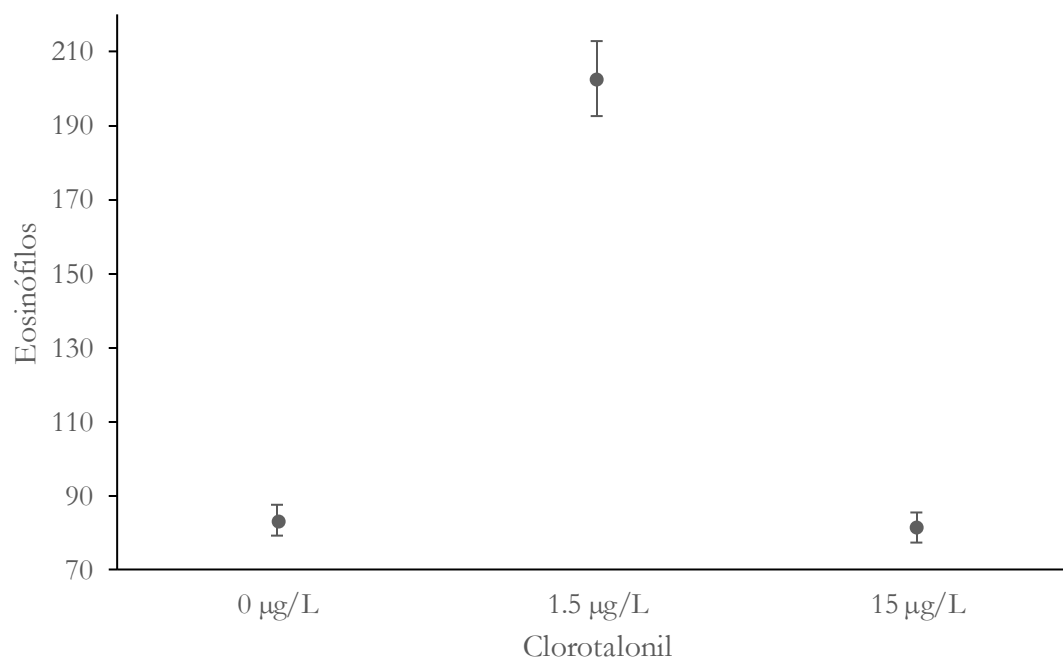


Fig. 17. Promedios de eosinófilos totales en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones de clorotalonil. Las barras de error representan ± 1 S.

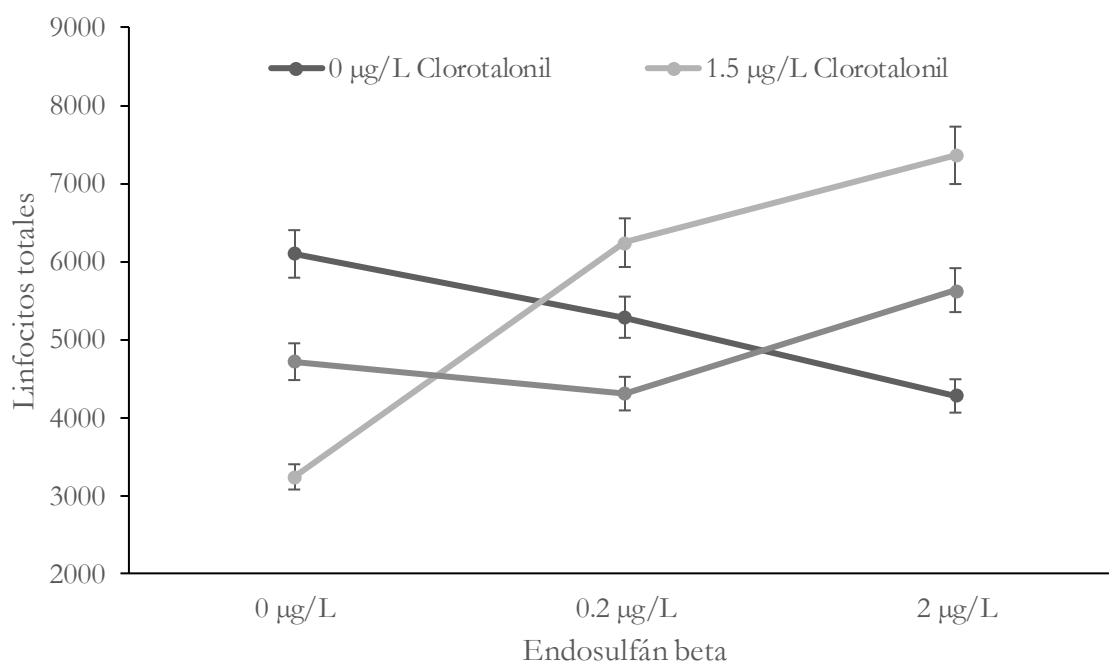


Fig. 18. Efectos sinérgicos observados en promedios de linfocitos totales en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones de los plaguicidas endosulfán beta y clorotalonil. Las barras de error representan $\pm 1 S$.

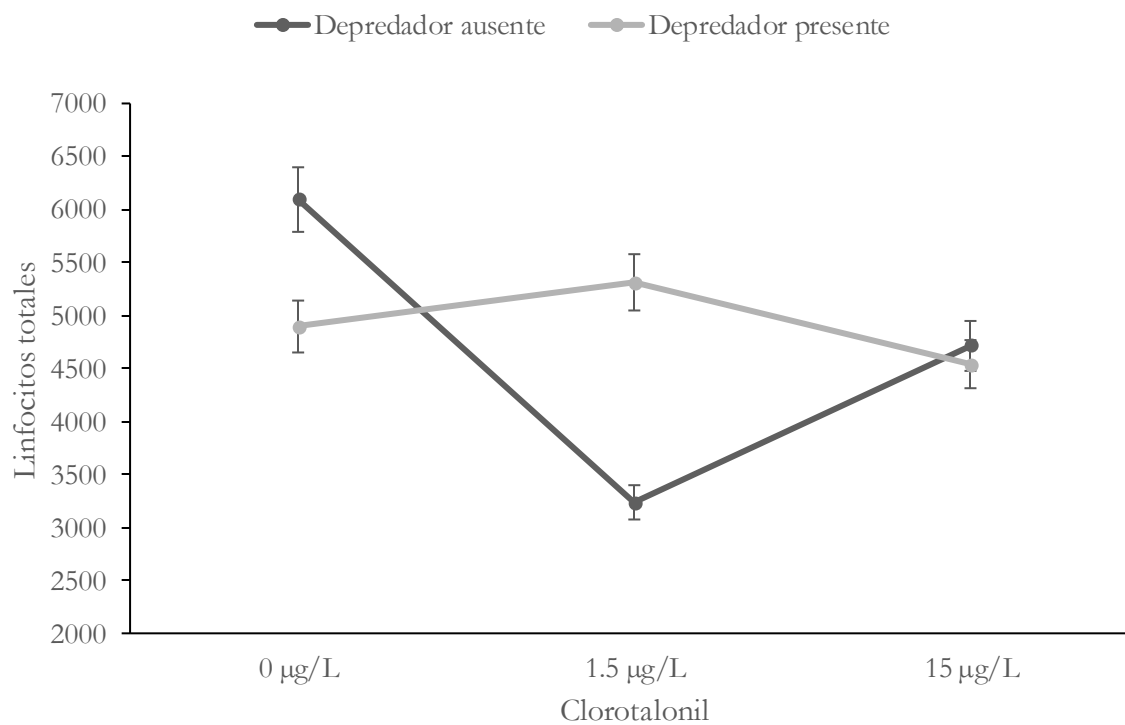


Fig. 19. Efectos sinérgicos observados en promedios de linfocitos totales en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones del plaguicida clorotalonil y la presencia o ausencia de depredador. Las barras de error representan $\pm 1 S$.

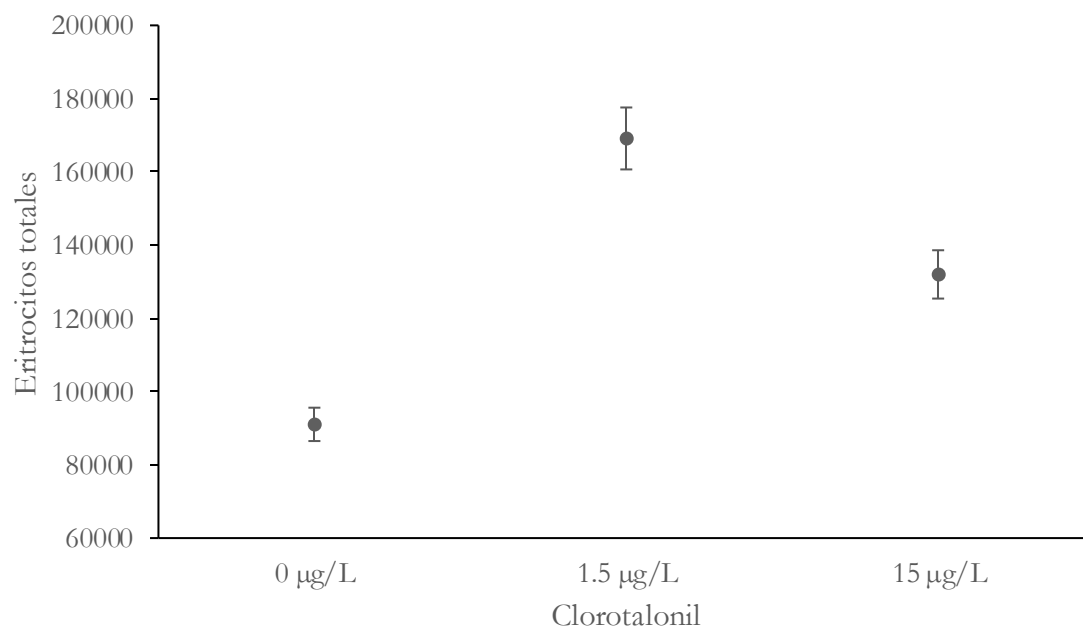


Fig. 20. Promedio de eritrocitos totales en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones de clorotalonil. Las barras de error representan ± 1 S.

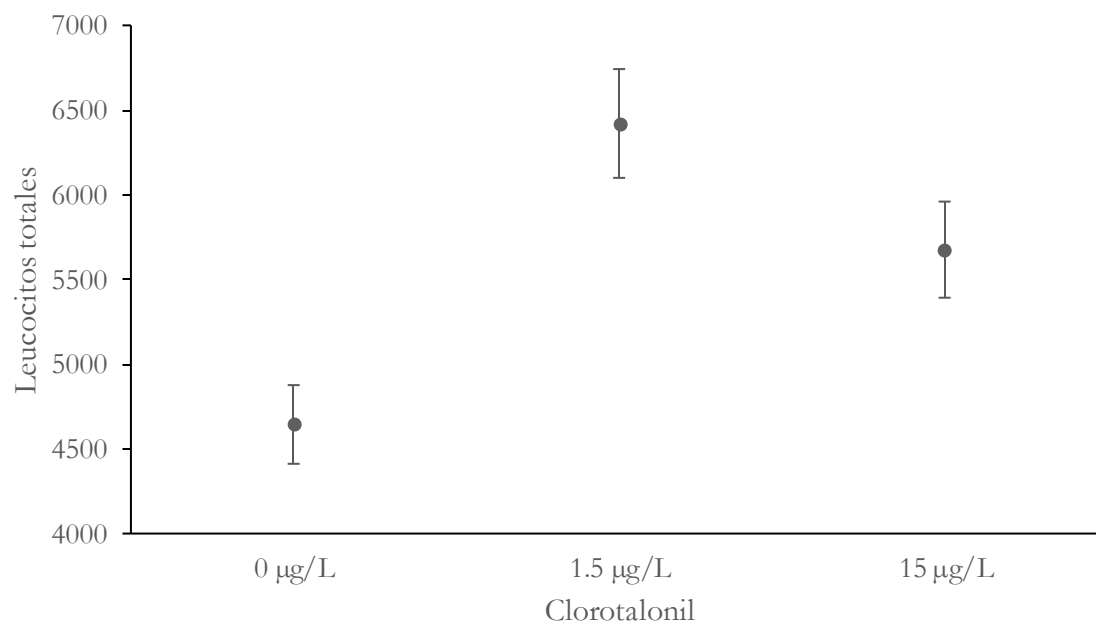


Fig. 21. Promedio de leucocitos totales en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones de clorotalonil. Las barras de error representan ± 1 S.

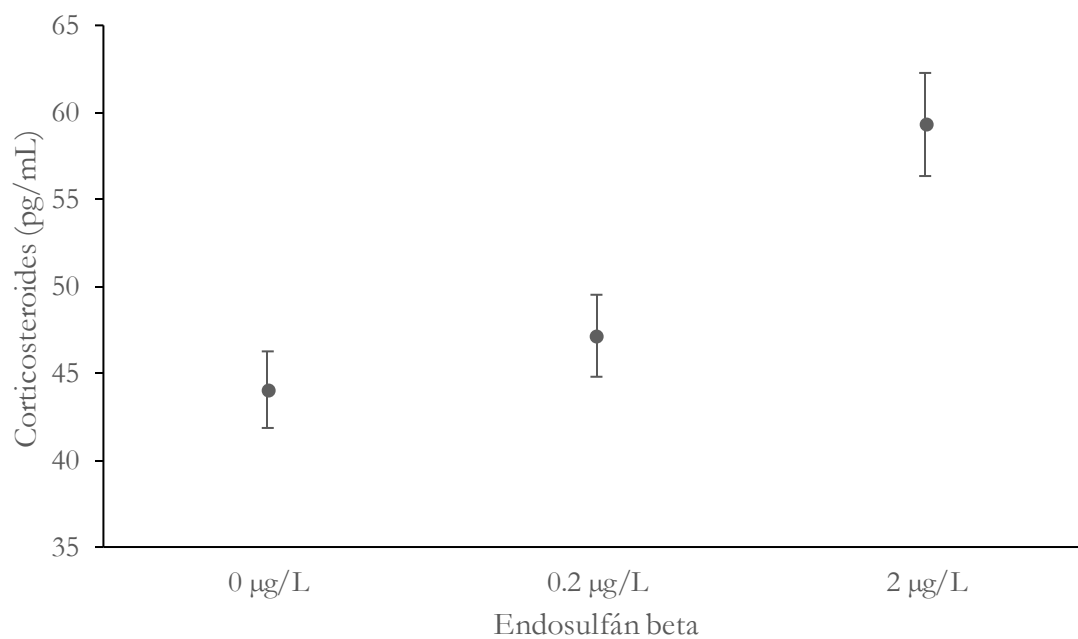


Fig. 22. Promedio de corticosteroides (pg/mL) en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a diferentes concentraciones del insecticida endosulfán beta. Las barras de error representan ± 1 S.

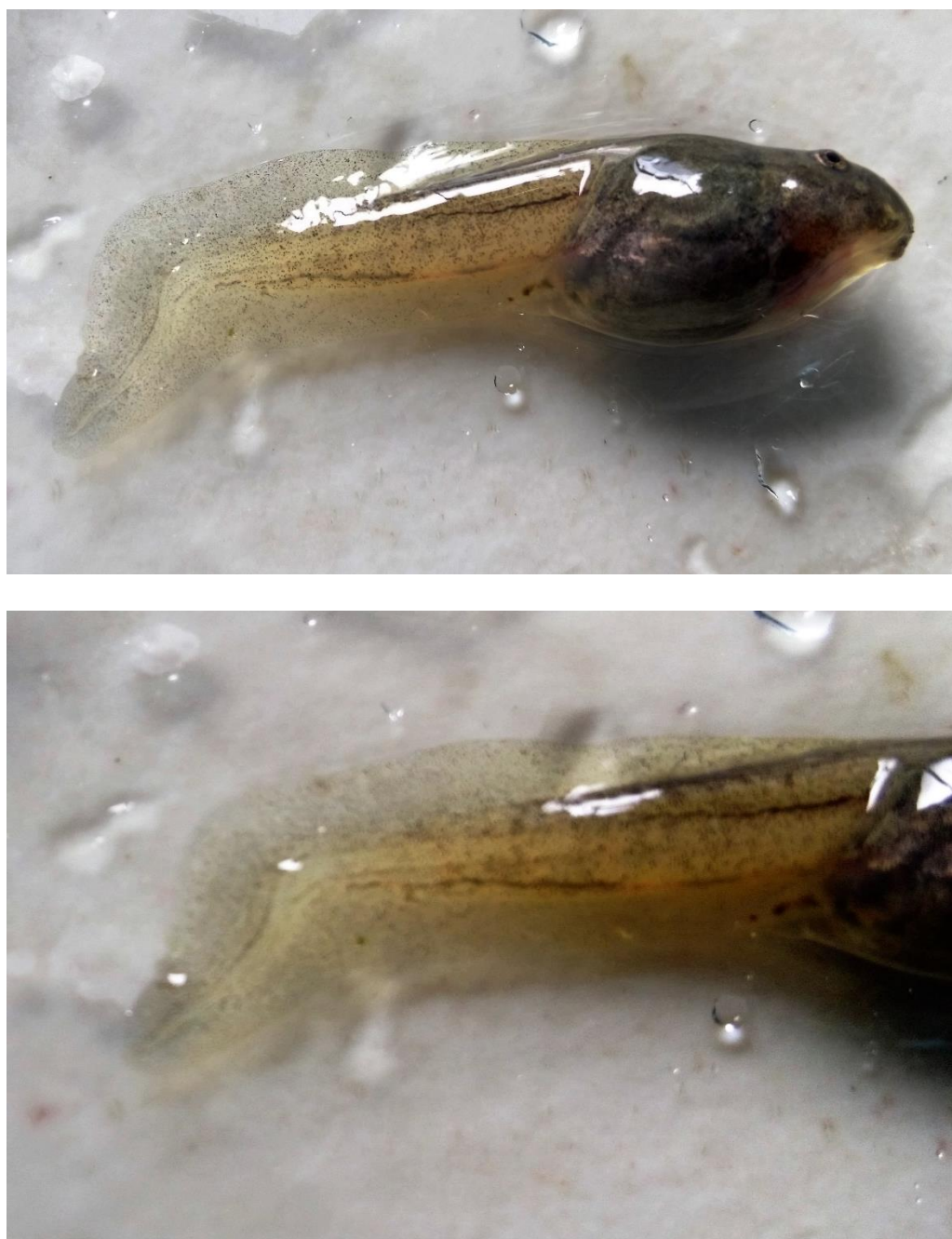


Fig. 23. Malformaciones en la cola encontradas en renacuajos de *L. taylori* expuestos al insecticida endosulfán beta.



Fig. 24. Exposición de intestinos encontrada en algunos renacuajos de *L. taylori* expuestos a factores de estrés.

Referencias bibliográficas

- Abarca, L., & C. Ruepert. 1992. Plaguicidas encontrados en el Valle de la Estrella: estudio preliminar. *Tecnología en Marcha*, 12: 31-38.
- Allender, M. C., & M. F. Fry. 2008. Amphibian hematology. *Veterinary Clinics of Exotic Animals*, 11: 463-480.
- Amadori, M. 2016. The innate immune response to non-infectious stressors. Human and animal models. Academic Press, Elsevier. London, UK. 276 p.
- Arikan, H., & K. Cicek. 2014. Haematology of amphibian and reptiles: a review. *North Western Journal of Zoology*, 10 (1): 190-209.
- Bejarano, F., J. Souza, J. M. Weber, C. Guadarrama, E. Escamilla, B. Beristáin, M. Acosta, M. I. Cárcamo & F. Ramírez. 2009. El endosulfán y sus alternativas en América Latina. Red de Acción sobre Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAPAM), Red Internacional de Eliminación sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (IPEN). 148p.
- Belden, L. K., & J. M. Kiesecker. 2005. Glucocorticosteroids hormone of larval treefrogs increases infection by *Alaria* sp. trematode cercarie. *Journal of Parasitology*, 91(3): 686-688.
- Berger, L., R. Speare & A.D. Hyatt. 1998. Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In: A. Campbell, ed. Declines and disappearances of Australian frogs. *Environment Australia: Canberra*, 9: 23-33.
- Bernabó, I., A. Guardia, D. La Russa, G. Madeo, S. Tripepi & E. Brunnelli. 2013. Exposure and post-exposure effects of endosulfan on *Bufo bufo* tadpoles: morpho-histological and ultrascultural study on epidermis and iNOS localization. *Aquatic Toxicology*, 142-143: 164-175.
- Blaustein, A.R., & A. Dobson. 2006. A message from the frogs. *Nature*, 439: 143-144.
- Blaustein, A. R., P. D. Hoffman, J. M. Kiesecker & J. B. Hays. 1996. DNA repair activity and resistance to solar UV-B radiation in eggs of the red-legged frog. *Conservation Biology*, 10: 1398-1402.
- Boiroju, N. K., & M. K. Reddy. 2012. Bootstrap method for testing of equality of several coefficients of variation. *International Journal of Advanced Mathematics and Statistics*, 2012: 1-6.
- Bolaños, F. V. 2009. Situación de los anfibios de Costa Rica. *Biocenosis*, 22 (1-2): 95-108.
- Bolaños, F. V., J. M. Savage & G. Chaves. 2011. Anfibios y Reptiles de Costa Rica. Listas Zoológicas Actualizadas UCR. Museo de Zoología UCR. San Pedro, Costa Rica. Última actualización el 6 de diciembre del 2011. Publicación original en el 2009. <http://museo.biologia.ucr.ac.cr/Listas/LZAPublicaciones.htm>.
- Boone, M. D., & S. M. James. 2003. Interactions of an insecticide, herbicide, and natural stressors in amphibian community mesocosms. *Ecological Applications*, 13 (3): 829-841.

- Boone, M. D., & R. D. Semlitsch. 2002. Interactions of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities. *Ecological Applications*, 12 (1): 307-316.
- Boone, M. D., P. S. Corn, M. A. Donnelly, E. E. Little & P. H. Niewiarowski. 2003. Physical stressors. Pag. 129-152 In: G. Linder, S. K. Krest & D. W. Sparling, eds. Amphibian decline: an integrated analysis of multiple stressors effects. Society of environmental toxicology and chemistry (SETAC), Pensacola, Florida.
- Bridges, C. M. 1997. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 1935-1939.
- Bridges, C., & M. Boone. 2002. The interactive effects of UV-B and insecticide exposure on tadpole survival, growth and development. *Biological Conservation*, 113: 49-54.
- Brock, P.M., C. C. Murdock & L. B. Martin. 2014. The history of ecoimmunology and its integration with disease ecology. *Integrative and Comparative Biology*, 54 (3): 353-362.
- Broomhall, S. 2004. Egg temperature modifies predator avoidance and the effects of the insecticide endosulfán on tadpoles of an Australian frog. *Journal of Applied Ecology*, 41: 105-113.
- Broomhall, S., & R. Shine. 2003. Effects of the insecticide endosulfan and presence of congeneric tadpoles on Australian treefrog (*Litoria freycineti*) tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45: 221-226.
- Brunelli, E., I. Bernabó, C. Berg, K. Lundstedt-Enkel, A. Bonacci & S. Tripepi. 2009. Environmentally relevant concentrations of endosulfán impair development, metamorphosis and behavior of *Bufo bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicology*, 91 (2009): 135-142.
- Brunner, J. L., D. M., Schock., E. W. Davidson & J. P. Collins. 2004. Intraspecific reservoirs: complex life history and the persistence of a lethal Ranavirus. *Ecology*, 85 (2): 560-566.
- Brunner, J. L., K. Richards & J. Collins. 2005. Dose and host characteristics influence virulence of Ranavirus infections. *Oecologia*, 144 (3): 399-406.
- Buck, J. C., J. Hua, W. R. Brogan III, T. D. Dang, J. Urbina, R. J. Bendis, A. B. Stoler, A. R. Blaustein & R. A. Relyea. 2015. Effects of pesticide mixtures on host-pathogen dynamics of the amphibian chytrid fungus. *PLoS ONE*, 10 (7): e0132832.
- Buck, J. C., E. A. Scheesele, R. A. Relyea & A. R. Blaustein. 2012. The effects of multiple stressors on wetlands communities: pesticides, pathogens and competing amphibians. *Freshwater Biology*, 57: 61-73.
- Burkhart, J. G., J. R. Bidwell, D. J. Fort & S. T. Sheffield. 2003. Chemical stressors. Pag. 111-128 In: G. Linder, S.K. Krest & D. W. Sparling, eds. Amphibian decline: an integrated analysis of multiple stressors effects. SETAC Press. Pensacola, Florida.
- Carey, C. 2000. Infectious disease and worldwide declines of amphibian populations, with comments on emerging diseases in coral reef organisms and in humans. *Environmental Health Perspectives*, 108, Supplement 1: Reviews in Environmental Health: 143-150.

- Carey, C., N. Cohen & L. Rollins-Smith. 1999. Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental & Comparative Immunology*, 23 (1999): 459-472.
- Carey, C., D. F. Bradford, J. L. Brunner, J. P. Collins, E. W. Davidson, D. E. Longcore, M. Ouellet, A. P. Pessier & D. M. Schock. 2003. Biotic factors in amphibian population declines. Pag. 153-208 In: G. Linder, S.K. Krest & D. W. Sparling, eds. Amphibian decline: An integrated analysis of multiple stressors effects. Society of environmental toxicology and chemistry (SETAC), Pensacola, Florida.
- Carter, A. 2000. How pesticides get into water - and proposed reduction measures. *Pesticide Outlook*, 11: 149-156.
- Castillo, L.E., E. De la Cruz & C. Ruepert. 1997. Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of Central America. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (1): 41-51.
- Castillo, L. E., C. Ruepert & E. Solís. 2000. Pesticides residues in the aquatic environment of banana plantation areas in the North Atlantic Zone of Costa Rica. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 8. 1942-1950.
- Castillo, L. E., C. Martínez, C. Ruepert, M. Gilek, E. Pinnock & E. Solis. 2006. Water quality and macroinvertebrate community response following pesticide applications in a banana plantation, Limon, Costa Rica. *Science of the Total Environment*, 367: 418-432.
- Chaves, A., D. Shea, & W. G. Cope. 2007. Environmental fate of chlorothalonil in a Costa Rican banana plantation. *Chemosphere*, 69: 1166-1174.
- Collins, J. P., & M. L. Crump. 2009. Extinction in our times: global amphibian decline. Oxford University Press, New York. 273p.
- Collins, J.P., & A. Storfer. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions*, 9: 89-98.
- Dahl, E., G. Orizaola, S. Winberg & A. Laurila. 2012. Geographic variation on corticosterone response to chronic predator stress in tadpoles. *Journal of Evolutionary Biology*, 25: 1066-1076.
- Daly, G. L., Y. D. Lei, C. Teixeira, D. C. Muir, L. E. Castillo, L. M. Jantunen, & F. Wania. 2007a. Organochlorine pesticides in the soils and atmosphere of Costa Rica. *Environmental Science & Technology*, 41: 1124-1130.
- Daly, G. L., Y. D. Lei, C. Teixeira, D. C. G. Muir, L. E. Castillo, & F. Wania. 2007b. Accumulation of current-use pesticides in neotropical montane forests. *Environmental Science & Technology*, 41:1118-1123.
- Daszak, P., L. Berger, A. A. Cunningham, A. D. Hyatt, D. E. Green & R. Speare. 1999. Emerging infectious disease and amphibian population declines. *Emerging Infection Disease*, 5:735-748.
- Davidson, C. 2004. Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecological Applications*, 14: 1892-1902.

- Davidson, C & R. A. Knapp. 2007. Multiple stressors and amphibian declines: dual impacts of pesticides and fish on Yellow-Legged Frogs. *Ecological Applications*, 17 (2): 587-597.
- Davis, A.K., D.L. Maney, & J.C. Maerz. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22: 760-772.
- Demas, G. E., D. A. Zysling, R. A. Beechler, M. P. Muehlenbein & S. S. French. 2011. Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. *Journal of Animal Ecology*, 80: 710-730.
- Denoel, M., B. D'Hooghe, G. F. Ficetola, C. Brasseur, E. De Pauw, J. P. Thome, & P. Kestemont. 2012. Using sets of behavioral biomarkers to assess short-term effects of pesticide: a study case with endosulfan on frog tadpoles. *Ecotoxicology*, 21: 1240-1250.
- Downs, C. J., J. S. Adelman & G. E. Demas. 2014. Mechanisms and methods in ecoimmunology: integrating within-organism and between-organisms processes. *Integrative and Comparative Biology*, 54 (3): 340-352.
- Duellman, W. E. 1999. Patterns of distribution of amphibians: a global perspective. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press. 633 p.
- Ernst, W. R., P. Jonah, K. Doe, G. Julien, & P. Hennigar. 1991. Toxicity to aquatic organisms of off-target deposition of endosulfan applied by aircraft. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10: 103-114.
- Falso, P. G. 2011. The effects of agricultural contaminants of amphibian endocrine an immune function. Tesis de Doctorado. Universidad de California, Berkeley. USA.
- Forson, D., & A. Storfer. 2006. Effects of atrazine and Iridovirus infection on survival and life-history traits of the long-toed salamander (*Ambystoma macrodactylum*). *Environmental Toxicology Chemistry*, 25: 168-173.
- Freeman, J.L., & A.L., Rayburn. 2005. Developmental impact of atrazine on metamorphosing *Xenopus laevis* as revealed by nuclear analysis and morphology. *Environmental Toxicology Chemistry*, 24: 1648-1653.
- Frost, D. 2015. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0 (5 enero 2016). Electronic database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Gabor, C. R., M. C. Fisher & J. Busch. 2013. A non-invasive stress assay shows that tadpole population infected with *Batrachochytrium dendrobatidis* have elevated corticosterone levels. *PLoS ONE*, 8: pe56054.
- La Gaceta. 2015. Decreto ejecutivo N° 38834. Poder Ejecutivo. Presidencia de la República. Costa Rica.
- Gagnetén, A. M. 2002. Efectos del herbicida Paraquat sobre el zooplancton. *Zoologia*, 92 (3): 47-56.

- Gardner, T. 2001. Declining amphibian populations: a global phenomenon in conservation biology. *Animal Biodiversity and Conservation*, 24:2 5–44.
- Gendron, A. D., D. J. Marcogliese, S. Barbeau, M. S. Christin, P. Brousseau, S. Ruby, D. Cyr & M. Fournier. 2003. Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. *Oecologia*, 135 (3): 469-476.
- Ghose, S., M. A. Donnelly, J. L. Kerby, & S. M. Whitfield. 2014. Acute toxicity tests and meta-analysis identify gaps in tropical ecotoxicology for amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(9): 2114-2119.
- Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16 (3): 183-190.
- Goyenola, G. 2007. Conductividad. Guía para la utilización de las valijas viajeras. Red de Monitoreo Ambiental Participativo de Sistemas Acuáticos (Red MAPSA). 1-3 pp.
- Grabusky, J., P. A. Martin, & J. Struger. 2004. Pesticides in Ontario: a critical assessment of potential toxicity of urban use products to wildlife, with consideration of endocrine disruption. Vol 3. Phenoxy herbicides, chlorotalonil and clorphyrifos. Technical report series No. 410. Canadian Wildlife Service.
- Greulich, K. & S. Pflugmacher. 2003. Differences in susceptibility of various life stages of amphibian to pesticide exposures. *Aquatic Toxicology*, 65: 329-336.
- Hansen, L. J., & M. L. Johnson. 1999. Conservation and toxicology: integrating the disciplines. *Conservation Biology*, 13:1225-1227.
- Harris, M.L., L. Chora, C. A. Bishop, & J. P. Bogart. 2000. Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64 (2): 263-270.
- Hayes, T. B., P. Case, S. Chui, D. Chung, C. Haeffele, K. Haston, M. Lee, V. P. Mai, Y. Marjua, J. Parker, & M. Tsui. 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environmental Health Perspectives*, 1: 40-50.
- Heenar, S.J. 1997. Amphibian pond communities in southwestern Ontario. In: Green D.M. (ed), Amphibians in decline-canadian studies of global problem. *Herpetological Conservation*, 1: 1-15.
- Heugens, E. H., A. J. Hendriks, T. Dekker, N. M. Van Straaten & W. Admiral. 2001. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainly factors for use in risk assessments. *Critical Reviews in Toxicology*, 31: 247-248.
- Hoffman, M. et al. 2010. The Impact of conservation on the status of the world's vertebrates. *Science*, 330: 1503-1509.
- Holdridge, L. 1979. Ecología basada en zonas de vida. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José, Costa Rica. 216 pp.
- Hsu, E. & L. Du Pasquier. 1984. Studies in *Xenopus* immunoglobulins using monoclonal antibodies. *Molecular Immunology*, 21: 257-270.

- Hussain, A. Q., & K. A. Pandit. 2012. Global amphibian declines: A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4 (10): 348-357.
- James, T. Y., F. L. Toledo, D. Rodder, D. Leite, A. M. Belasen, C. M. Betancourt-Román, T. S. Jenkinson, C. Lambertini, A. V. Longo, J. Ruggeri, J. P. Collins, P. A. Burrowes, K. V. Lips, K. R. Zamudio & J. E. Longcore. 2015. Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. *Determinants of Emergence in Wildlife Disease*, 5 (18): 4079-4097.
- Johnson, L., B. Welch, & S. M. Whitfield. 2013. Interactive effects of pesticide mixtures, predators, and temperature regimes on the toxicity of two pesticides to Red-Eyed Tree Frog larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32 (10): 1-8.
- Jones D. K., J. I. Hammond & R. Relyea. 2009. Very highly toxic effects of endosulfan across nine species of tadpoles: lag effects and family-level sensitivity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28 (9): 1939-1949.
- Kiesecker, J. M. 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 9900-9904.
- Kilpatrick, M., C. Briggs, & P. Daszak. 2010. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution*, 1170: 1-17.
- Kindermann, C., E. J. Narayan & J. M. Hero. 2012. Urinary corticosterone metabolites and chytridiomycosis disease prevalence in a free-living population of male Stony Creek Frog (*Litoria wilcoxii*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*. 162 (3): 171-176.
- Kindt, T. J., R. A. Goldsby, & B. A. Osborne. 2007. Inmunología de Kuby. Sexta Edición. McGraw-Hill Interamericana. 697p.
- Klemens, J. A., M. L. Wieland, V. J. Flanagan, J. A. Frick, & R. G. Harper. 2003. A cross taxa survey of organochloride pesticide contamination in a Costa Rican wildland. *Environmental Pollution*, 122: 245-251.
- Knapp, R. A., D. M. Boiano, & V. T. Vredenburg. 2007. Removal of nonnative fish results in population expansion of a declining amphibian (mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*). *Biological Conservation*, 135:11-20.
- Koprivnikar, J., M.R. Forbes, & R.L. Baker. 2006. Effects of atrazine on cercarial longevity, activity, and infectivity. *Journal of Parasitology*, 92: 306-311.
- Kraft, P. G., C. E. Franklin & M. W. Blows. 2006. Predator-induced phenotypic plasticity in tadpoles: extension or innovation. *Journal of Evolutionary Biology*, 19: 450-458.
- Lacher, T., J. Bickham, C. Gascon, R. Green, M. R., & M. Mora. 2010. Impacts of contaminants and pesticides on biodiversity and ecosystem structure and function. Pag. 109-143. In:

- R. J. Kendall, T. E. Lacher, Jr., G.P. Cobb & S.B. Cox, eds. Wildlife toxicology: emerging contaminant and biodiversity Issues. Taylor and Francis, Boca Raton.
- Langerveld A. J., R. Celestine, R. Zaya, & D. Mihalko. 2009. Chronic exposure to high levels of atrazine alters expression of genes that regulate immune and growth-related functions in developing *Xenopus laevis* tadpoles. *Environmental Research*, 109: 379-389.
- Lannoo, M. J. 2008. Malformed Frogs. University of California Press. Berkeley, California. 270 pp.
- Larson, D.L., S. McDonald, A.J. Fivizzani, W.E. Newton, S.J. Hamilton. 1998. Effects of the herbicide atrazine on *Ambystoma tigrinum* metamorphosis: duration, larval growth, and hormonal response. *Physiological and Biochemical Zoology*, 71: 671-679.
- Laurila, A. 2003. Behavioral responses to predator chemical cues and local variation in antipredator performance in *Rana temporaria* tadpoles. *Oikos*, 88 (1): 159-168.
- Laurila, A., M. Jarvi-Laturi, S. Pakkasmaa & J. Merila. 2004. Temporal variation in predation risk: stage dependency, graded responses and fitness costs in tadpoles antipredator defense. *Oikos*, 107: 90-99.
- Laurila, A., B. Lindgren & A. T. Laugen. 2008. Antipredator defenses along latitudinal gradient in *Rana temporaria*. *Ecology*, 89: 1399-1413.
- Lebailly P., C. Vigreux, T. Godard, F. Sichel, E. Bar, J. Y. LeTalaer, M. Henry-Amar & P. Gauduchun. 1997. Assessment of DNA damage induced in vitro by etoposide and two fungicides (carbendazim and chlorothalonil) in human lymphocytes with the comet assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis*, 375:205-217.
- Lehman, C., & B. Williams. 2010. Effects of current-use pesticides on amphibians. Pag. 167-202 In: D. W. Sparling, G. Linder, C. A. Bishop, & S. K. Krest, eds. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. Second Edition. CRC Press.
- Linder, G., C. Bishop, S. Krest, & D. W. Sparling. 2010. Epilogue. Pag 547-551 In: *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, Second Edition. CRC Press.
- Lips, K. R. 1998. Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology*, 12: 106-117.
- Lips, K. L., J. Diffendorfer, J. R., Mendelson, & M. W. Sears. 2008. Riding the wave: Reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biology*, 6 (3): 72.
- Lomonte, B. V. 2007. Manual de métodos inmunológicos. Cuarta Edición. Instituto Clodomiro Picado. Universidad de Costa Rica. 138p.
- Longcore, J.E., A.P., Pessier, & D.K. Nichols. 1999. *Batrochochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91: 219-227.
- MacMahon, T., N. Halstead, S. Johnson, T. R. Raffel, J. M. Romansic, P. W. Crumrine, R. K. Boughton, L. B. Martin, & J. R. Rohr. 2011. The fungicide chlorothalonil in nonlinearly associated with corticosterone levels, immunity, and mortality in amphibians. *Environmental Health Perspectives*, 119: 1098-1103.

- Martel, A., A. Ppitzten-Van der Slulis, M. Blooi, W. Bert, R. Ducatelle, M. C. Fisher, A. Woeltjes, W. Bosman, K. Chiers, F. Bossuyt, & F. Pasmans. 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (38): 15325–15329.
- Martel, A., M. Blooi, C. Adriaensen, P. Van Rooij, W. Beukema, M. C. Fisher, R. A. Farrer, B. R. Schmidt, U. Tobler, K. Goka, K. R. Lips, C. Muletz, K. R. Zamudio, J. Bosch, S. Lötters, E. Wombwell, T. W. J. Garner, A. A. Cunningham, A. Spitzen-van der Sluijs, S. Salvidio, R. Ducatelle, K. Nishikawa, T. T. Nguyen, J. E. Kolby, I. Van Boclaer, F. Bossuyt, & F. Pasmans. 2014. Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science*, 346 (6209): 630–631.
- Martin, L. B. 2009. Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything. *General and Comparative Endocrinology*, 163: 70-76.
- Martin, L. B., W. A. Hopkins, L. A. Mydlarz, & J. R. Rohr. 2010. The effects of anthropogenic global changes on immune functions and disease resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1195: 129-148.
- Martin, L. B., R. K. Boughton & D. R. Ardia. 2014. A new division of ecoimmunology and disease ecology. *Integrative and Comparative Biology*, 54 (3): 338-339.
- McCallum, L. M. 2007. Amphian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. *Journal of Herpetology*, 41 (3): 483-491.
- Millet, S., J. Bennett, K. A. Lee, M. Hau, & K. C. Klasing. 2007. Quantifying and comparing constitutive immunity across avian species. *Developmental & Comparative Immunology*, 31: 188–201.
- MINAE. 2005. Plan de manejo del Parque Nacional Braulio Carrillo. Ministerio de Ambiente y Energía, Sistema Nacional de Areas Protegidas, Costa Rica. 157 p.
- Muir, D. C., C. Teixeira, & F. Wania. 2004. Empirical and modeling evidence of regional atmospheric transport of current-use pesticides. *Environmental Toxicology Chemistry*, 23: 2421-2432.
- Murphy, K., P. Travers & M. Walport. 2009. Inmunología de Janeway. Séptima edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. México D.F. 887p.
- Mussman, R., L. Du Pasquier & E. Hsu. Is *Xenopus* IgX an analog of IgA? *European Journal of Immunology*, 26: 2823-2830.
- Pastoret, P. P., P. Griebel, H. Bazin & A. Govaerts. 1998. Handbook of Vertebrate Immunology. Academic Press. San Diego, California, EEUU. 661 p.
- Pereira, V.M., J. W. Bartolotto, L. W. Kist, M. B. Azevedo, R. S. Fritsch, R. L. Oliveira, T. C. Pereira, C. D. Bonan, M. R. Vianna & M. R. Bogo. 2012. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebra fish (*Danio rerio*). *NeuroToxicology*, 33: 469-475.

- Peterson, J. D., J. E. Steffen, L. K. Reinert, P. A. Cobine, A. Appel, L. Rollins-Smith & M. T. Mendoca. 2013. Host stress response is important for the pathogenesis of the deadly amphibian disease, chytridiomycosis, in *Litoria caerulea*. *PloS*, 8 (4): 1-7.
- Pounds, J. A., & M. L. Crump. 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the Golden Toad and the Harlequin Frog. *Conservation Biology*, 8: 72-85.
- Pounds, J. A., M. P. Fogden, J. M., Savage, & G. C. Gorman. 1997. Tests of null models for amphibian declines on a tropical mountain. *Conservation Biology*, 11 (6): 1307-1322.
- Pounds, J. A., M. P. L. Fogden, & J. H. Campbell. 1999. Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature*, 398 (6728): 611-615.
- Pounds, J. A., M. Bustamante, L. Coloma, J. A. Consuegra, M. Fogden, P. Foster, E. La Marca, K. Masters, A. Merino-Viteri, R. Puschendorf, S. Ron, G. A. Sánchez-Azofeifa, C. J. Still & B. Young. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439: 161-167.
- Puschendorf, R., F. Bolaños, & G. Chaves. 2006. The amphibian chytrid fungus along an altitudinal transect before the first reported declines in Costa Rica. *Biological Conservation*, 132: 136-142.
- Ramírez, F., F. Chaverri, E. de la Cruz, C. Wesseling, L. Castillo, & V. Bravo. 2009. Importación de plaguicidas en Costa Rica: período 1977-2006. IRET-Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Ramsey, J. P., L. K. Reinert, L. K. Harper, D. C. Woodhams, & L. A. Rollin-Smith. 2010. Immune defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus linked to global amphibian declines, in the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Infection and Immunity*, 78 (9): 3981-3992.
- Relyea, R. A. 2003. Predator cues and pesticides: a double dose of danger for amphibians. *Ecological Applications*, 13: 1515-1521.
- Relyea, R. 2004. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environmental Toxicology Chemistry*, 23:1737-1742.
- Relyea, R., & N. Mills. 2001. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 2491-2496.
- Relyea, R., N. Schoeppner & J. Hoverman. 2005. Pesticides and amphibians: the importance of community context. *Ecological Applications*, 15 (4): 1125-1134.
- Richmond, J. Q., A. E. Savage, K. R. Zamudio & E. B. Rosenblum. 2009. Toward immunogenetic studies of amphibian chytridiomycosis: linking innate and acquired immunity. *BioScience*, 59 (4): 311-320.
- Robert, J. & Y. Ohta. 2009. Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus*. *Developmental Dynamics*, 238: 1249-1270.

- Rohr, J. R. & P. W. Crumrine. 2005. Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecological Applications*, 15 (4): 1135-1147.
- Rohr, J. R. & K. A. Mc Coy. 2010. A qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians. *Environmental Health Perspectives*, 118 (1): 20-32.
- Rohr, J. R., & B. D. Palmer. 2005. Aquatic herbicide exposure increases salamander desiccation risk eight months later in a terrestrial environment. *Environmental Toxicology Chemistry*, 24: 1253-1258.
- Rohr, J. R., A. A. Elskus, B. S. Shepherd, P. H. Crowley, T. M. Mc Carthy, J. H. Niedzwiecki, T. Sager, A. Sih & B. D. Palmer. 2004. Multiple stressors and salamanders: effects of an herbicide, food limitation and hydroperiod. *Ecological Applications*, 14 (4): 1028-1040.
- Rohr, J. R., T., Sager, T. M., Sesterhenn & B. D., Palmer. 2006. Exposure, postexposure, and density-mediated effects of atrazine on amphibians: breaking down net effects into their parts. *Environmental Health Perspectives*, 114 (1): 46-50.
- Rohr, J. R., A. M., Schotthoefer, T. R., Raffel, H. J., Carrick, N., Halstead, J. T., & Hoverman. 2008. Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*, 455: 1235-123.
- Rollins-Smith, L., K. S. Barker, & T. Davis. 1997. Involvement of glucocorticoids in the reorganization of the amphibian immune system at metamorphosis. *Developmental Immunology*, 5: 145-152.
- Rollins-Smith, L., & J.M. Conlon. 2005. Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. *Developmental & Comparative Immunology*, 29: 589-98.
- Rollins-Smith, L., J. P. Ramsey, J. D. Pask, L. K. Reinert, & D. C. Woodhams. 2011. Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: impacts on changing environments. *Integrative and Comparative Biology*, 51 (4): 552-562.
- Root, T. L., J. T. Price, K. R. Hall, S. H. Schneider, C. Rosenzweig & J. A. Pounds. 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421: 57-60.
- Rumschlag, S. L. & M. D. Boone. 2015. How time of exposure to the amphibian chytrid fungus affects *Hyla chrysoscelis* in the presence of an insecticide. *Herpetologica*, 71 (3): 169-176.
- Sasa, M., G. Chaves, & L. W. Porras. 2010. The Costa Rican herpetofauna: conservation status and future perspectives. Pag. 511-603 In: L. D. Wilson, J. H. Townsend & J. D. Johnson, eds. Conservation of Mesoamerican amphibians and reptiles. Eagle Mountain, Utah. Eagle Mountain Publishing, L.C.
- Savage, J. 2002. The amphibians and reptiles of Costa Rica. A herpetofauna between two continents, between two seas. The University of Chicago Press. Chicago, EEUU. 1056 p.

- Searle, C. L., L. K. Belden, P. Du & A. R. Blaustein. 2014. Stress and chytridiomycosis: exogenous exposures to corticosterone does not alter amphibian susceptibility to a fungal pathogen. *Journal of Experimental Zoology*, 321A: 243-253.
- Segura, P. 1990. Historia San Rafael de Heredia. Consejo Municipal San Rafael. Mimeografiado.
- Seiter S. 2009. Predator presence suppresses immune function in larval amphibians. Michigan University. *Natural resources and Environmental*, 17 (9): 123-135.
- Semlitsch, R. D, & M. D Boone. 2009. Using aquatic mesocosms in amphibian ecology and conservation. Pág. 87-104 In: K. Dodd, ed. *Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques*. Oxford University Press, New York.
- Shelley L.K., S.K. Balfry, P.S. Ross, C.J. Kennedy. 2009. Immunotoxicological effects of a sub-chronic exposure to selected current-use pesticides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 92: 95-103.
- Shunthirasingham, C., T. Gouin, Y. D. Lei, C. Ruepert, L. E. Castillo, & F. Wania. 2011. Current-use pesticide transport to Costa Rica's high-altitude tropical cloud forest. *Environmental Toxicology Chemistry*, 30: 2709-2717.
- Sparling, D. W. 2010. Water-quality criteria for amphibians. Pag 105-120. In: K. Dodd, ed. *Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques*. Oxford University Press, New York.
- Sparling, D. W., G. M. Fellers. 2009. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian population. *Environmental Toxicology*, 28 (8): 1696-1703.
- Sparling, D. W., G. M. Fellers, & L. L. Mc Connell. 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 1591-1595.
- Stuart, S. N., J. S. Chanson, N. A. Cox, B. E. Young, A. S. L. Rodrigues, D. L. Fischman, & R. W. Waller. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306: 1783-1786.
- Thiemann, G. 2000. Patterns and consequences of behavioural responses to predators and parasites in *Rana* tadpoles. *Biological Journal of the Linnean Society*, 71: 513-528.
- UICN. 2013. IUCN Red list of threatened species. Version 2013.2. Revisado el 2 de diciembre de 2013 de: www.iucnredlist.org
- UN. 2011. Stockholm convention on persistent organic pollutants. Adoption of an Amendment to Annex A. United Nations.
- Vale, C., E. Fonfría, J. Bujons, A. Messeguer, E. Rodríguez-Farré & C. Suñol. 2003. The organochlorine pesticides γ -hexachlorocyclohexane (Lindane), α -endosulfan and Dieldrin differentially interact with GABBA and Glycine-gated chloride channels in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience*, 117: 397-403.

- De Voe, R., K. Geissler, S. Elmore, D. Rotstein, G. Lewbart & J. Guy. 2004. Ranavirus-associated morbidity and mortality in a group of captive eastern Box Turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 35 (4): 534-543.
- Von Duszeln, J. 1991. Pesticide contamination and pesticide control in developing countries: Costa Rica, Central America. Pag 410-428 In: M. L. Richardson, ed. Agriculture and the environment. Royal Society of Chemistry Press, UK.
- Wake, D. B. 1991. Declining amphibian populations. *Science*, 253: 860.
- Wake D. B & V. T. Vredenburg. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 11466-11473.
- Warne, R. W., G. A. Proudfoot & E. J. Crespi. 2015. Biomarkers of animal health: integrating nutritional ecology, endocrine ecophysiology, ecoimmunology, and geospatial ecology. *Ecology and Evolution*, 5 (3): 557-566.
- Weltje, L., P. Simpson, M. Gross, M. Crane & J. R. Wheeler. 2013. Comparative acute and chronic sensitivity of fish and amphibians: a critical review of data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32 (5): 984-994.
- Whitfield, S. M., K. E. Bell, T. Philippi, M. Sasa, F. Bolaños, G. Chaves, J. M. Savage, & M. A. Donnelly. 2007. Amphibian and reptile declines over 35 years at La Selva, Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (20):8352-8356.
- Whitfield, S. M., E. Geerdes, I. Chacón, E.R. Ballesterro, R.R. Jimenez, M.A. Donnelly, & J.L. Kerby. 2013. Infection and co-infection by the amphibian chytrid fungus and ranavirus in wild Costa Rican frogs. *Disease of Aquatic Organisms*, 104: 173-178.
- Wieland, M.L., J.A. Klemens, R.G. Harper & J.A. Frick. 2000. A survey of organochlorine pesticide contamination in Costa Rican wildlife. Honors Projects. 20 p.
- Wingfield, J. C. & R. M. Salposky. 2003. Reproduction and resistance to stress: when and how. *Journal of Neuroendocrinology*, 15: 711-724.
- Young, B. E., K. R. Lips, J. K. Reaser, R. Ibañez, A. W. Salas, J. R. Cedeño, L. A. Coloma, S. Ron, E. La Marca, J. R. Meyer, A. Muñoz, F. Bolaños, G. Chaves & D. Romo. 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin American. *Conservation Biology*, 15 (5): 1213-1223.
- Young, B.E., S. N. Stuart, J. S. Chanson, N. A. Cox, T. M. Boucher, & V. Arlington. 2004. Joyas que están desapareciendo: el estado de los anfibios en el nuevo mundo. NatureServe, Arlington, EEUU. 60 p.
- Young, S., P. Whitehorn, L. Berger, L. F. Skerratt, R. Speare, R. Garland & R. Webb. 2014. Defects in host immune function in tree frogs with chronic Chytridiomycosis. *PlosOne*, 9 (9): 1-16.

Zhao, Y., Q. Pan-Hammarstrom, S. Yu, N. Wertz, X. Zhang, N. Li, J. E. Butler & L. Hamstromm. 2006. Identification of IgF a hinge-region-containing Ig class, and IgD in *Xenopus tropicalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 12087-12092.

Anexos

Anexo 1. Masas de huevos de *L. taylori* colectadas en el área de estudio.



Anexo 2. Larva de odonato (*Anax sp.*) utilizado como depredador en los experimentos de exposición a factores de estrés.



Anexo 3. Sitio en donde se desarrollaron los experimentos de exposición de estrés utilizando mesocosmos.



Anexo 4. Mesocosmos utilizados para realizar los experimentos de exposición a factores estresantes.



Anexo 5. Protocolo de extracción y concentración de plaguicidas utilizados en microcosmos

Dopajes:

Se realizaron dopajes de plaguicidas en un mesocosmo de 15 L de agua filtrada con 15 gr de hojarasca húmeda. Los plaguicidas utilizados fueron:

- 30 $\mu\text{g/L}$ de Clorotalonil
- 30 $\mu\text{g/L}$ de Endosulfan beta

Se homogenizó la disolución de los plaguicidas agitando el agua levemente con ayuda de un agitador de vidrio durante 15 seg.

Extracción:

Se extrajeron 20 mL de agua proveniente del microcosmo utilizando una pipeta de vidrio. La muestra fue depositada en tubos de vidrio y se tomó una muestra en duplicado más una muestra blanco con agua filtrada.

A los tres tubos con muestra se le añadieron 3 gr de NaCl y se agitaron vigorosamente. Luego de esto se añadió 2 mL de hexano a cada tubo y se agitaron por 3 min. Una vez terminado esto se esperaron dos minutos para la separación de las fases; como esto no sucedió y se formaron burbujas en la parte superior de la muestra, se procedió a centrifugar durante 5 min a una velocidad de 2000 ppm. Una vez separadas las fases, se extrajo la parte más superficial usando una pipeta Pasteur la cual se colocó en un nuevo tubo de vidrio. Esto se repitió una vez más para cada una de las muestras.

Luego de realizar la extracción del hexano, se concentró la muestra utilizando nitrógeno líquido hasta obtener un volumen de aproximadamente de 100 a 50 μ L; posterior a esto, se agregó 1 mL de isooctano para realizar nuevamente la concentración de la muestra con nitrógeno. Por último, se agregó nuevamente 1 mL de isooctano para la muestra final y se agito por un momento. La muestra final se colocó en un vial de extracción para la posterior extracción de los plaguicidas utilizando cromatografía de gases.

Anexo 6. Jaula que contenía a los depredadores de los tratamientos de exposición a riesgo de depredación



Anexo 7. Protocolo de ELISA para corticosteroides utilizando volúmenes pequeños de suero/plasma

1. Poner todas las soluciones a temperatura ambiente antes de ser usadas.
2. Colocar una alícuota de 10 μL de cada muestra en un Eppendorf.
3. Preparar 1 ml 1:100 de la solución “Steroid displacement reagent (SDR)” (inmediatamente antes de usar).
4. Adicionar 10 μL de SDR a cada Eppendorf de cada muestra.

5. Vortex.
6. Dejar reposar por 5 min antes de ser diluido con el buffer de ELISA.
7. Adicionar 380 μ L del buffer de ELISA en cada tubo con muestra de plasma.
8. Vortex.
9. La dilución final de las muestras es de 1:40.

Anexo 8. Protocolo de cuantificación de corticosteroides en suero sanguíneo de anfibios

Todos las muestras y reactivos deben de ser colocadas a temperatura ambiente al menos 30 min antes de ser usados. Todas las muestras y estándares deben de ser corridos en duplicado.

1. Pipetear 100 μ L del diluyente estándar (Assay Buffer 15) en los pozos denominados NSB y Bo (estándar 0 pg/mL).
2. Pipetear 100 μ L de los estándares del 1 al 5 en los pozos correspondientes.
3. Pipetear 100 μ L de cada muestra en los pozos correspondientes.
4. Pipetear 50 μ L del Assay Buffer 15 en los pozos correspondientes al NSB.
5. Pipetear 50 μ L del conjugado azul en cada pozo, excepto en los pozos de Actividad Total (TA) y los pozos de los blancos.
6. Pipetear 50 μ L de los anticuerpos amarillos en cada pozo, excepto en los pozos de los blancos, TA y NSB.

Nota: todos los pozos deberían de tener color verde excepto los pozos de NSB que deberían de ser azules. Los blancos y TA no deberían tener color hasta este momento.

7. Incubar el plato a temperatura ambiente en un agitador de platos durante 2 horas a 500 rpm. El plato debe de ser cubierto con el sellador de platos.
8. Decantar el contenido de los pozos y lavar adicionando 400 μ L de la solución de lavado en todos los pozos. Repetir los lavados dos veces más para un total de 3 lavados.
9. Después del último lavado, decantar el plato fuertemente sobre una toalla absorbente para remover cualquier remanente del buffer de lavado.
10. Adicionar 5 μ L del conjugado azul en los pozos de TA.
11. Adicionar 200 μ L de la solución sustrato pNpp en cada pozo. Incubar a temperatura ambiente por 1 h sin agitar.
12. Adicionar 50 μ L de la solución stop a cada pozo. Esto detiene la reacción y el plato debe de leerse inmediatamente.
13. Leer el plato a 405 nm, realizar una corrección entre 570 y 590 nm.

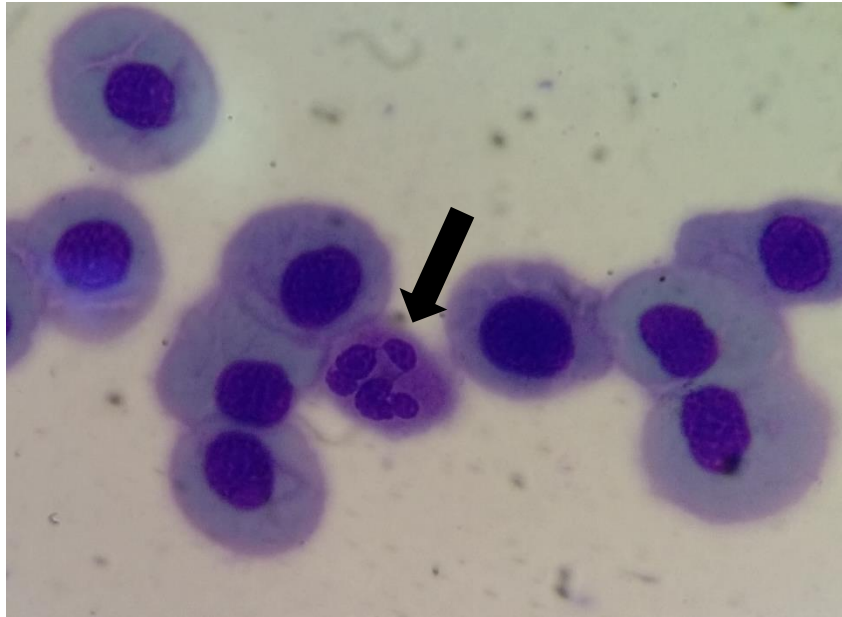
Anexo 9. Protocolo ELISAS para detección de inmunoglobulinas IgM y IgY

1. Añadir 0.5 μ g-1 μ g/100 μ L de proteína BSA-DNP en Buffer de recubrimiento por pozo. Dejar en incubación overnight.
2. Decantar.
3. Añadir 100 μ L de una solución caseína al 2%-PBS. Incubar durante 30 min.
4. Decantar.
5. Añadir 50 μ L en los pozos las diluciones de las muestras (caseína 1%-PBS). Diluciones de las muestras en factor de 2. Incubar por 2-3 h.

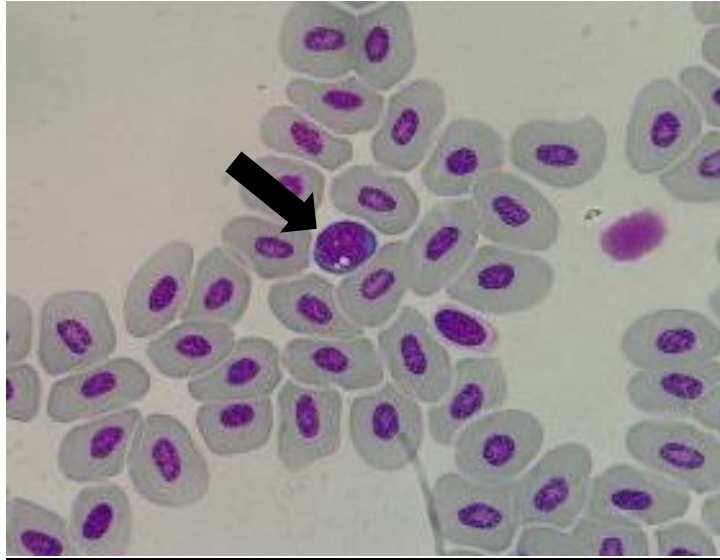
6. Decantar.
7. Realizar 5 lavados con el buffer de lavados. Cada lavado se deja durante 5 min en el shaker.
8. Añadir 100 μ L de los anticuerpos monoclonales IgM. Dilución $\frac{1}{2}$. Incubar 2-3 h.
9. Decantar.
10. Realizar 5 lavados con el buffer de lavados. Cada lavado se deja durante 5 min en el shaker.
11. Añadir 100 μ L el conjugado anti-ratón. 1:5000. Incubar 1 h.
12. Decantar.
13. Realizar 5 lavados con el buffer de lavados. Cada lavado se deja durante 5 min en el shaker.
14. Añadir 100 μ L el sustrato px OPD- H_2O_2 hasta desarrollo de color. Control negativo no debe de desarrollar color
15. 50 μ L HCL 1-2 molar Sustrato stop.
16. Leer inmediatamente lector de ELISA a una longitud de 492nm.

Anexo 10. Clasificación de leucocitos encontrados en sangre de renacuajos de *L. taylori* expuestos a factores estresantes.

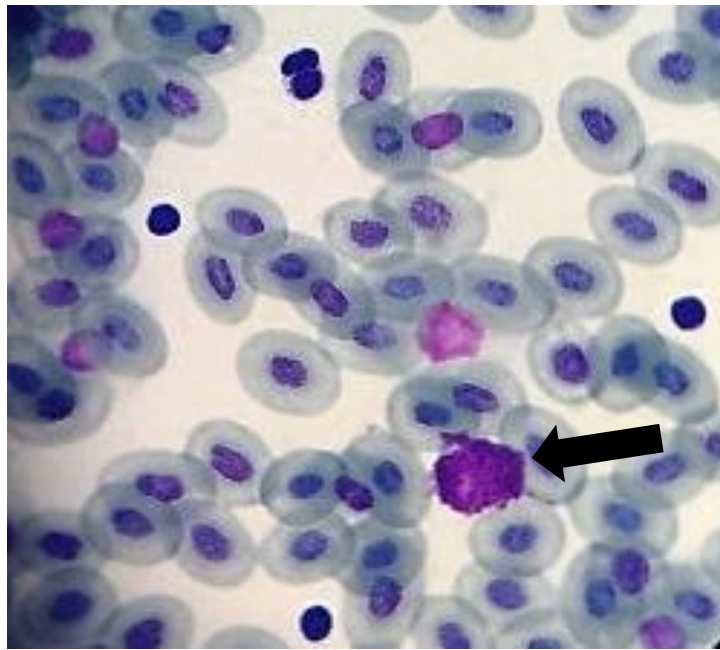
Neutrófilo



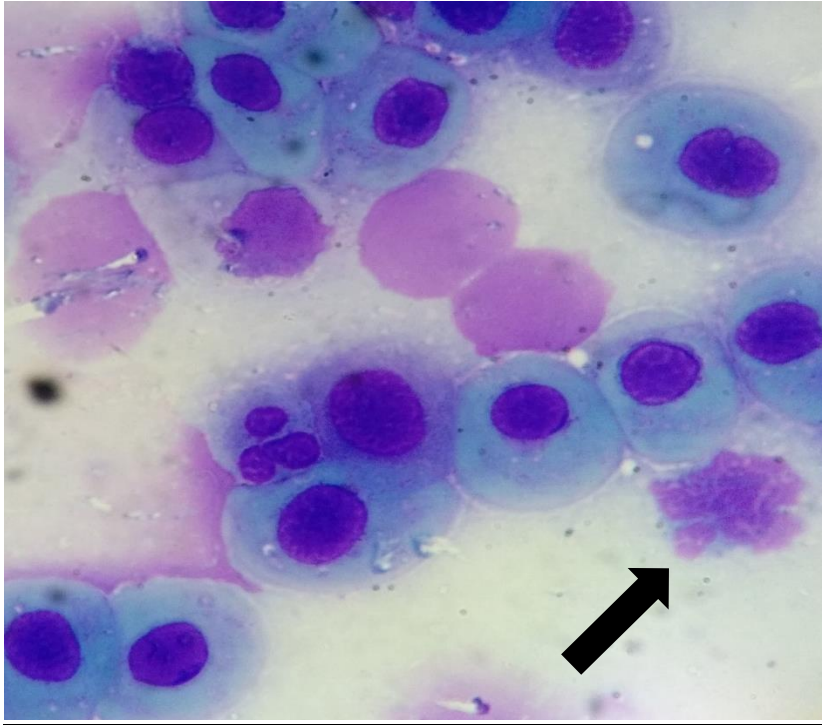
Linfocito



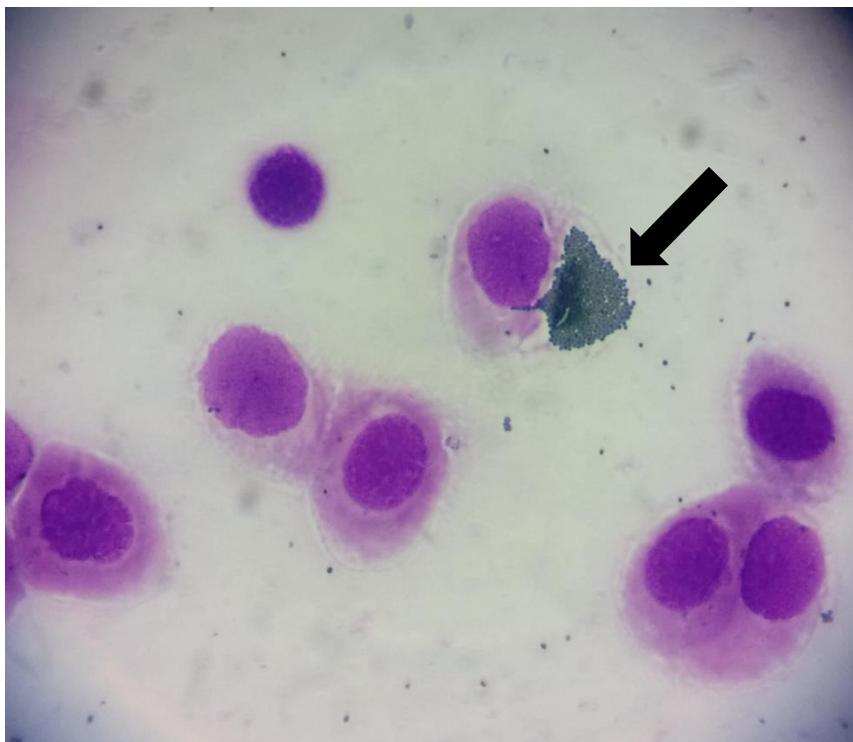
Eosinófilo



Monocito



Basófilo



Anexo 11. Protocolo técnica Dot-Blotting para evaluar la efectividad de las inmunoglobulinas IgM e IgY.

Esta técnica inmunológica es una variante de la prueba de ELISA realizada sobre una membrana de nitrocelulosa.

1. Añadir en tres lugares distintos de la membrana de nitrocelulosa 3 concentraciones diferentes de cada inmunoglobulina. En el primer sitio colocar 5 μ L, en el segundo sitio 10 μ L y en el tercero 20 μ L.
2. Colocar cada membrana de nitrocelulosa en una caja petri

3. Añadir una solución de caseína 2%-PBS en la caja petri hasta cubrir totalmente la membrana. Dejar incubar por una hora.
4. Decantar.
5. Añadir en la caja petri la solución de conjugado anti-ratón. 1:5000 hasta cubrir toda la membrana. Incubar 1 h.
6. Decantar.
7. Añadir el sustrato precipitable para peroxidasa en la caja petri hasta cubrir la membrana. Esperar hasta que se observe un precipitado en el punto en donde se colocó cada inmunoglobulina.
8. Detener la reacción utilizando sustrato stop: 50 μ L HCl 1-2 molar.
9. Observar si existen diferencias entre los precipitados de acuerdo a las concentraciones de inmunoglobulinas analizadas.