



**Interacción entre la variabilidad térmica y la exposición  
a pesticidas sobre la locomoción, tasa metabólica,  
rasgos celulares y bioquímicos de la rana invasora  
*Xenopus laevis***

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

**Magíster en Ciencias Biológicas**

Facultad De Ciencias

Por

**Diego Ignacio Landaeta Martínez**

Noviembre, 2024

Director de Tesis Dr. Pablo Sabat Kirkwood

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGÍSTER**

**Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato.**

**Diego Ignacio Landaeta Martínez**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 27 de septiembre de 2024

Director de Tesis:

Dr. Pablo Sabat Kirkwood

---

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Claudio Veloso Iriarte

---

Dr. Isaac Peña Villalobos

---



Nació en Santiago de Chile un 9 de junio de 1993. Desde muy pequeño se interesó por la música y la naturaleza. Fue durante la enseñanza media cuando descubre que la biología era una de sus pasiones, motivándolo a estudiar pedagogía en biología en la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación el año 2014. Trabajó durante 6 años en el Laboratorio de Fisiología Animal de la UMCE y fue la profesora Gricelda Ruiz quien le recomendó realizar el Magister en Ciencias Biológicas en la Universidad de Chile. A comienzos del año 2022 conoce a su tutor, el Dr. Pablo Sabat, quien lo aceptó en el Laboratorio de Ecofisiología Animal de la Universidad de Chile y lo acompañó hasta completar sus estudios de postgrado.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor Pablo Sabat por su increíble generosidad, buena onda, compromiso y por dejarme participar en sus proyectos de investigación. Agradezco mucho sus consejos, enseñanzas y ser parte de su gran equipo de trabajo. También quiero agradecer a la comisión evaluadora formada por los doctores Claudio Veloso e Isaac Peña-Villalobos, por sus comentarios y apoyo técnico para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a mis compañeros de trabajo en el laboratorio de Ecofisiología Animal por su apoyo y amistad, especialmente a Andrés Sazo, Felipe Álvarez, Francisco del Basto, Benjamín Corvalán, Javiera Arcila, Isaac Peña, Natalia Ramírez, Lucas Navarrete y Maite Arriagada.

Obviamente le agradezco a mi mamá, papá, hermanos y toda mi familia por educarme con cariño y por su infinita paciencia, los llevo en lo más profundo de mi corazón. A mis amigos-hermanos Laguneros por ser el pilar que sostiene mi pasión musical, a Nicole por su amistad incondicional y a JP por ser de esas amistades que no muere con la distancia.

Agradezco al Center of Applied Ecology and Sustainability (CAPES) la oportunidad de realizar esta investigación y a ANID PIA/BASAL AFB240003 y FONDECYT 1241249 por el financiamiento.

## INDICE DE MATERIAS

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1. Hipótesis.....	8
1.2. Objetivos .....	9
1.2.1. Objetivo general.....	9
1.2.1. Objetivos específicos .....	9
<b>2. Materiales y métodos</b> .....	<b>10</b>
2.1. Diseño experimental y aclimatación .....	10
2.2. Tasa metabólica estándar .....	11
2.3. Respuesta de enderezamiento .....	13
2.4. Obtención de sangre y relación neutrófilos:linfocitos (N/L) .....	13
2.5. Biomarcadores de estrés oxidativo.....	14
2.6. Ensayo de enzimas estererasas.....	17
2.7. Análisis estadístico .....	18
<b>3. Resultados</b> .....	<b>20</b>
3.1. Tamaño corporal y rendimiento locomotor.....	20
3.2. Tasa metabólica (SMR) y coeficiente térmico ( $Q_{10}$ ).....	21
3.3. Perfil leucocitario y relación N/L.....	23
3.4. Estado oxidativo .....	24
3.5. Estererasas plasmáticas.....	26
3.6. Análisis multivariado (PCA) .....	27
<b>4. Discusión</b> .....	<b>31</b>
4.1. Efecto de la variabilidad térmica y exposición a CPF sobre el rendimiento locomotor.....	31
4.2. Ajustes de la eficiencia energética.....	33
4.3. Respuesta leucocitaria ante la fluctuación térmica y exposición a pesticida.....	34
4.4. Biomarcadores bioquímicos y energéticos .....	35
4.5. Limitaciones del estudio .....	38
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>39</b>
<b>6. Referencias</b> .....	<b>40</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>54</b>

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Resumen de las condiciones de aclimatación. Cuatro tratamientos experimentales considerando un periodo de 14 días de exposición. Los tratamientos incluyeron temperatura constante y clorpirifós (TC/P), temperatura variable y clorpirifós (TV/P), temperatura constante sin clorpirifós (TC/NP) y temperatura variable sin clorpirifós (TV/NP).

**Tabla 2.** Medidas de resumen (promedio  $\pm$  DE) del tamaño corporal y la respuesta locomotora de *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. TC: temperatura constante, TV: temperatura variable, NP: no expuesto al pesticida y P: expuesto al pesticida. Superíndices muestran diferencias entre grupos mediante la prueba *a posteriori* de Fisher.

**Tabla 3.** Ejes del PCA derivados del análisis de rasgos bioquímicos y energéticos en *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. En negrita las variables que presentan una carga  $> 0,7$ .

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Curvas de rendimiento locomotor en función de la temperatura de medición para los individuos de *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós, categorizadas por la exposición a pesticida (A) y por el tratamiento térmico (B). Los tratamientos incluyeron temperatura constante (TC), temperatura variable (TV), no expuestos al pesticida (NP) y expuestos al pesticida (P). Los valores se muestran en valores promedio ( $\pm$  EE) del recíproco del tiempo de enderezamiento (1/s), y los asteriscos reflejan diferencias significativas entre los grupos.

**Figura 2.** Valores (promedio  $\pm$  EE) de la tasa metabólica y el coeficiente térmico de *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. SMR medida a 16 y a 30°C categorizado por la exposición al pesticida (A).  $Q_{10}$  categorizado por la exposición a pesticida (B) y por ambos factores (C). Los tratamientos incluyeron temperatura constante (TC), temperatura variable (TV), no expuestos al pesticida (NP), y expuestos al pesticida (P). Superíndices muestran diferencias entre grupos mediante la prueba *a posteriori* de Fisher.

**Figura 3.** Resultados del índice N/L en *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós, categorizado por el factor pesticida (A), por el factor tratamiento térmico (B) y por ambos factores (C). Los tratamientos incluyeron temperatura constante (TC), temperatura variable (TV), no expuestos al pesticida (NP), y expuestos al pesticida (P). Superíndices muestran diferencias entre grupos mediante la prueba *a posteriori* de Fisher.

**Figura 4.** Biomarcadores de estrés oxidativo en individuos de *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para la capacidad antioxidante total en plasma (A), peroxidación lipídica en plasma (B), y estado oxidativo (C). Los tratamientos incluyeron temperatura constante (TC), temperatura variable (TV), no expuestos al pesticida (NP), y expuestos al pesticida (P). Superíndices muestran diferencias entre grupos mediante la prueba *a posteriori* de Fisher.

**Figura 5.** Actividad enzimática de las esterasas en plasma de *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. Diferencias significativas entre tratamientos para la acetilcolinesterasa (A), butirilcolinesterasa (B), carboxilesterasa 1-naftil acetato (C) y carboxilesterasa 4-nitrofenil acetato (D). Los tratamientos incluyeron temperatura constante (TC), temperatura variable (TV), no expuestos al pesticida (NP), y expuestos al pesticida (P). Superíndices muestran diferencias entre grupos mediante la prueba *a posteriori* de Fisher.

**Figura 6.** Resultados del análisis de componentes principales (PCA) incluyendo los biomarcadores plasmáticos y las variables energéticas en *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. El PC 1 estuvo fuertemente correlacionado con TAC, TBARS, CbE 4-NPA, CbE 1-NA y AChE; y el PC 2 estuvo significativamente correlacionado con Q<sub>10</sub> y SMR. Los tratamientos incluyeron temperatura constante (TC), temperatura variable (TV), no expuestos al pesticida (NP), y expuestos al pesticida (P).

## LISTA DE ABREVIATURAS

SMR: tasa metabólica estándar

AChE: acetilcolinesterasa

BChE: butirilcolinesterasa

CbE: carboxilesterasa

OP: pesticida organofosforado

CPF: clorpirifós

CPFoxon: clorpirifos-oxon

TAC: capacidad antioxidante total

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico

ROS: especies reactivas de oxígeno

TC: temperatura constante

TV: temperatura variable

NP: no-pesticida

P: pesticida

## RESUMEN

A medida que las temperaturas medias y la fluctuación térmica aumenten en una escala global, es probable que las poblaciones de plagas crezcan y expandan sus áreas de distribución, incrementando la necesidad del uso de agroquímicos como los pesticidas. Los anfibios son un grupo muy sensibles a estas perturbaciones ambientales, lo que ha contribuido a la creciente disminución de sus poblaciones naturales. Sin embargo, el efecto combinado de estos estresores y de su variabilidad, sobre la fisiología energética, capacidad detoxificadora e inmunológica ha sido poco explorada. Este estudio evaluó la respuesta de la rana de uñas africana (*Xenopus laevis*) expuesta a un régimen de variación térmica combinado con clorpirifós, un insecticida organofosforado ampliamente utilizado en Chile. Individuos adultos ( $n = 20$ ) se expusieron a dos concentraciones de clorpirifós (0 y 1  $\mu\text{g/L}$ ) y a dos tratamientos térmicos (constante [ $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ] y variable [ $23 \pm 7^\circ\text{C}$ ]). Junto con esto, se estimó la tasa metabólica, la respuesta locomotora, la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa, la capacidad detoxificadora a partir de la sensibilidad al CPF-oxon de las esterasas butirilcolinesterasa y carboxilesterasa, la capacidad antioxidante total, la peroxidación lipídica y el perfil leucocitario de los individuos. Encontramos que el pesticida fue el factor que más afectó a los biomarcadores, mostrando una disminución en la locomoción, metabolismo, defensas antioxidantes y la enzima

butirilcolinesterasa. Además, se encontró que el índice de estrés inmunológico y el índice de equilibrio oxidativo fueron mayores en los grupos expuestos a ambos estresores. En conclusión, estos resultados enfatizan la importancia de considerar ambos factores ambientales al evaluar los efectos de los pesticidas en organismos ectotermos ya que tanto el aumento de las temperaturas medias como la variabilidad térmica pueden intensificar los efectos adversos de los pesticidas en los anuros de vida libre.

## ABSTRACT

As average temperatures and thermal fluctuations increase on a global scale, pest populations are likely to grow and expand their distribution areas, increasing the need for agrochemicals such as pesticides. Amphibians are a group highly sensitive to these environmental disturbances, which has contributed to the ongoing decline of their natural populations. However, the combined effect of these stressors and their variability on energy physiology, detoxification capacity, and immune function has been little explored. This study evaluated the response of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) exposed to a thermal variation regime combined with chlorpyrifos, a widely used organophosphate insecticide in Chile. Adult individuals (n = 20) were exposed to two concentrations of chlorpyrifos (0 and 1 µg/L) and two thermal treatments (constant [23 ± 0.5°C] and variable [23 ± 7°C]). In addition, metabolic rate, locomotor response, acetylcholinesterase enzymatic activity, detoxification capacity based on sensitivity to CPF-oxon of butyrylcholinesterase and carboxylesterase, total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and leukocyte profile of the individuals were estimated. We found that the pesticide was the factor that most affected the biomarkers, showing a decrease in locomotion, metabolism, antioxidant defenses, and butyrylcholinesterase enzyme activity. Furthermore, the immunological stress index and oxidative balance index were higher in the groups exposed to both

stressors. In conclusion, these results emphasize the importance of considering both environmental factors when assessing the effects of pesticides on ectothermic organisms, as both the increase in average temperatures and thermal variability can intensify the adverse effects of pesticides on free-living anurans.

## 1. INTRODUCCION

Entender la naturaleza de los efectos diferenciales del –y respuestas al– cambio climático en especies es una tarea esencial para la ciencia contemporánea. Las múltiples perturbaciones antrópicas que impulsan el denominado cambio global amenazan gravemente la biodiversidad (Bozinovic y Cavieres, 2019), a través de cambios en las interacciones entre especies y del funcionamiento de los ecosistemas (Polazzo et al., 2021). En particular, se ha informado que Amphibia es la clase más afectada entre los vertebrados, con el 41% de las especies declaradas en peligro de extinción (IUCN, 2022). De esta manera, se ha documentado que las poblaciones naturales de anfibios se han visto disminuidas debido al cambio climático desde hace décadas (Hoffmann et al., 2010; Lobos et al., 2013; Boualit et al., 2022). Una de las principales causas de esta disminución, es la fragmentación del hábitat, el cambio de uso de suelos para fines agrícolas y la aplicación de plaguicidas (Mestre et al., 2019; Bovo et al., 2018; Boccioni et al., 2022). La exposición a estos contaminantes provoca efectos adversos significativos en los anfibios, que incluyen la disminución de la tasa de crecimiento, desarrollo y supervivencia, así como aumento en la incidencia de malformaciones. Además, se observa un deterioro del potencial reproductivo, de la función inmunológica y de los sistemas nervioso y locomotor (Sparling y Fellers, 2009; Gavel et al., 2021; Boualit et al., 2023).

En condiciones naturales, los organismos a menudo se ven enfrentados al efecto combinado de los factores climáticos y la exposición a contaminantes (Sih et al., 2004; Janssens y Stoks, 2017). Debido a que la temperatura ambiental influye de manera significativa en la mayoría de las respuestas fisiológicas, bioquímicas y ecológicas de los ectotermos (Calosi et al., 2008; Kazmi et al., 2022), es comprensible que la toxicidad de los pesticidas aumente con la temperatura (Gordon y Leon, 2005; Noyes et al., 2009; Hooper et al., 2013). Este incremento de la toxicidad impacta negativamente en la tolerancia térmica, la conducta de forrajeo, el potencial reproductivo, el desempeño inmunológico y locomotor (Noyes et al., 2009; Arambourou y Stoks, 2015; Quiroga et al., 2019; Philippe et al., 2022). Sin embargo, los efectos de la variabilidad térmica sobre la fisiología de los organismos han sido explorados en menor medida (Barbosa et al., 2017).

Diversas investigaciones han demostrado que la variabilidad térmica puede tener impactos variados y, en ocasiones, contradictorios en la fisiología de los organismos. Estos efectos se observan especialmente en las tasas metabólicas, la fecundidad, el crecimiento y desarrollo, así como en el rendimiento inmunológico y la resistencia al estrés (Bozinovic et al., 2013; Paaijmans et al., 2013; Vasseur et al., 2014). Por ejemplo, se ha encontrado que el aumento en la variabilidad térmica puede incrementar la toxicidad de los pesticidas, lo que resulta en una disminución del funcionamiento de los invertebrados acuáticos (Barbosa et al., 2017; Willming et al., 2013; Willming y Maul, 2016; Verheyen y Stoks, 2019). Sin embargo, otros estudios sugieren que

la variación térmica puede atenuar el efecto tóxico del pesticida organofosforado clorpirifós, observando una mayor supervivencia en invertebrados expuestos a fluctuaciones de temperatura en comparación con aquellos sometidos a condiciones térmicas constantes (Delnat et al., 2021). A pesar de estos hallazgos, los efectos interactivos entre los pesticidas y la variación de temperatura sobre la bioenergética, la capacidad detoxificadora, la función inmune y el desempeño locomotor siguen siendo poco comprendidos. Además, se conoce aún menos acerca de las consecuencias de estas interacciones en la fisiología de los anfibios, lo que subraya la necesidad de realizar más investigaciones en este campo.

Uno de los pesticidas más utilizados para el control de plagas en plantaciones agrícolas en Chile es el clorpirifós (O, O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato, CPF; Servicio Agrícola y Ganadero, 2019). Este agroquímico se caracteriza por ser altamente tóxico para los organismos no-objetivos como invertebrados, peces y anfibios, ya que inhibe la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) alterando, por ejemplo, la contracción muscular (Sandoval-Herrera et al., 2019). Por su parte, la respuesta detoxificadora inmediata ante la presencia de CPF es la desulfuración oxidativa por parte de isoenzimas del citocromo P450 que catalizan la formación de un metabolito biológicamente activo llamado clorpirifós-oxon (CPF-O), el cual es el responsable del daño neurotóxico por su gran afinidad con el sitio activo de AChE (Chambers et al., 2010; Dzul-Caamal et al., 2012; Narváez et al., 2016). Debido a que la AChE es una enzima sensible al CPF, la determinación de sus niveles en los

tejidos (p. ej. plasma) se utiliza ampliamente como biomarcador para evaluar el efecto de pesticidas organofosforados (OP), tanto en animales terrestres como acuáticos (Lionetto et al., 2013). Además de la actividad AChE, existen otros biomarcadores para detectar la presencia y el daño de pesticidas en los organismos, como son la carboxilesterasa (CbE) y la butirilcolinesterasa (BChE) (Sanchez-Hernandez et al., 2009; Stefanidou et al., 2009). Sin embargo, es fundamental complementar las respuestas bioquímicas con respuestas conductuales fuertemente asociadas al rendimiento locomotor (p. ej. el reflejo de enderezamiento), para comprender como la disrupción celular podría afectar el desempeño del organismo (Sandoval-Herrera et al., 2019). En este contexto, medir reflejos asociados al rendimiento locomotor es un biomarcador adecuado para evaluar tanto los efectos de la temperatura (Cortes et al., 2016), como la exposición a pesticidas (Quiroga et al., 2019).

Por su parte, los pesticidas pueden alterar el equilibrio oxidativo y respuestas metabólicas de los organismos. Efectivamente, el desequilibrio redox en los organismos se ve exacerbado por la presencia de pesticidas (Silvestre, 2020). En ese contexto, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), generadas a partir del metabolismo de oxígeno es la responsable del daño oxidativo (Betteridge, 2000). Entre estos daños, los más comunes son la oxidación de proteínas, daños al ADN y la unión de las ROS a los fosfolípidos poliinsaturados de la membrana plasmática lo que provoca peroxidación lipídica (Livingstone et al., 1993; Banerjee et al., 2001). Aunque las ROS se producen de forma natural, las células cuentan con mecanismos para minimizar la toxicidad

de los radicales libres. Por ejemplo, se ha observado que la exposición a pesticidas en algunos anuros aumenta los niveles de peroxidación lipídica, así como la actividad de enzimas antioxidantes, lo que indica una respuesta compensatoria al daño oxidativo (Costa et al., 2008; David et al., 2012). Además del desequilibrio redox, se han identificado cambios en las tasas metabólicas (Narváez et al., 2016; Álvarez-Vergara et al., 2022). En particular, la tasa metabólica estándar en ectotermos es utilizada como un indicador complementario del fitness del organismo (Bech et al., 2020), permitiendo evaluar hasta qué punto los organismos expuestos a xenobióticos reasignan energía a mecanismos de desintoxicación y/o mantienen procesos fisiológicos normales (Blevin et al., 2017; Narváez et al., 2022).

Por otro lado, se desconoce en gran medida los mecanismos subyacentes a la inmunotoxicidad de CPF en vertebrados acuáticos, incluidas las especies de anfibios. Un mecanismo de acción potencial sugiere que la inmunotoxicidad está relacionada con la producción de ROS inducida por CPF, que luego puede desencadenar la apoptosis de células efectoras de la inmunidad innata, como los leucocitos (Marchand et al., 2017). De hecho, estudios han reportado cambios en los recuentos de leucocitos por efectos compensatorios ante el daño citotóxico (Ural, 2013; Mestre et al., 2019). En este contexto, los perfiles leucocitarios y el índice neutrófilos/linfocitos (N/L) pueden ser útiles para evaluar el sistema inmunológico y las respuestas al estrés (Davis et al. 2018; Mestre et al., 2019). Paralelamente, el uso combinado de múltiples herramientas o biomarcadores, que son medidas objetivas de los cambios bioquímicos, fisiológicos o celulares

que ocurren en respuesta a la exposición a contaminantes, permite una evaluación más completa y confiable de los efectos de la exposición a pesticidas (Sanchez-Hernandez et al., 2023).

Para llenar el vacío de conocimiento sobre los efectos de los estresores ambientales en los anfibios, se utilizó a la rana de uñas africana *Xenopus laevis*. El uso de este anuro como modelo para estudiar los efectos de la variabilidad térmica y la exposición a pesticidas en Chile y el mundo se justifica por su amplia distribución como especie invasora (Measey et al., 2012; Mora et al., 2019), lo que le permite habitar una variedad de ambientes con diferentes condiciones térmicas (Cortes et al., 2016) y niveles de contaminación química (Shapira et al., 1998). Su notable flexibilidad fisiológica, que le permite ajustarse a cambios ambientales extremos (Sabat et al., 2005), la convierte en un modelo ideal para realizar estudios sobre los efectos combinados de estos factores en la fisiología de los organismos. Además, *Xenopus* es resistente al cautiverio y al manejo experimental (Reed, 2005; McNamara et al., 2018), lo que facilita su uso en investigaciones controladas sin comprometer la calidad de los resultados. Estos atributos, junto con su relevancia ecológica como especie invasora en diversas regiones (Lobos y Jaksic, 2005; Measey et al., 2012), permitirían extrapolar los hallazgos a otros anfibios, ofreciendo valiosas perspectivas sobre cómo las presiones ambientales actuales afectan la fauna silvestre.

Por lo tanto, en esta investigación surge la necesidad de responder a la siguiente pregunta:

¿Cómo influye la exposición a pesticida en la respuesta locomotora, la actividad enzimática de detoxificación, las funciones fisiológicas, el estrés oxidativo y la inmunidad de los anuros en condiciones contrastantes de variabilidad térmica?

## 1.1. HIPOTESIS

La variación de temperatura y la contaminación por pesticidas generan mayores costos fisiológicos para mantener la homeostasis en diferentes niveles de organización (p. ej. celular y orgánico). En este sentido, la exposición a un ambiente con fluctuaciones térmicas puede resultar en una reasignación de energía que disminuya la capacidad de respuesta del organismo para detoxificar pesticidas.

De la hipótesis se desprenden las siguientes predicciones:

- (i) Las ranas aclimatadas a un ambiente térmicamente variable contaminado con CPF disminuirán su capacidad de desintoxicación, aumentando así su sensibilidad a este xenobiótico.
  
- (ii) Los animales expuestos a variabilidad térmica y CPF también podrían experimentar una disminución en su capacidad metabólica y locomotora, presentar alteraciones en los perfiles leucocitarios y exhibir un mayor potencial de estrés oxidativo.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo general

Evaluar la interacción entre la variabilidad térmica y la exposición a un pesticida, sobre los rasgos de locomoción, energéticos, celulares y bioquímicos en una especie de anuro invasor.

### 1.2.2. Objetivos específicos

Determinar la tasa metabólica estándar (SMR) y la respuesta de enderezamiento en ranas aclimatadas a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y pesticida.

Determinar los marcadores de estrés oxidativo e inmunológico en ranas aclimatadas a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y pesticida.

Determinar la respuesta de las enzimas asociadas a la sensibilidad (acetilcolinesterasa) y detoxificación (butirilcolinesterasa y carboxilesterasa) de xenobióticos en ranas aclimatadas a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y pesticida.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. *Diseño experimental y aclimatación*

Los animales ( $n = 20$ ) fueron obtenidos de capturas previas en dos localidades de la Región Metropolitana, La Manreza, Talagante ( $33^{\circ}43' S$ ,  $71^{\circ}1' W$ ) y San José, Melipilla ( $33^{\circ}37' S$ ,  $71^{\circ}14' W$ ), en pozas y canales de regadío aledañas a zonas agrícolas. Las ranas se mantuvieron en las dependencias del laboratorio de ecofisiología animal siguiendo las recomendaciones de manejo y cuidado descritas por Reed (2005) y McNamara et al. (2018). Específicamente, se utilizaron cajas de plástico (61 L) con un volumen de agua de 20 L y fotoperiodo luz:oscuridad de 12h:12h. Además, se alimentaron con carne molida de vacuno dos veces por semana previamente a la limpieza de los contenedores y recambio de agua.

Luego de una semana de habituación a las condiciones de laboratorio, los animales fueron separados aleatoriamente en cuatro grupos experimentales y se aclimataron a un tratamiento contrastante de temperatura (constante [ $23^{\circ}C$ ] y variable [ $23 \pm 7^{\circ}C$ ]) y pesticida (no expuesto a CPF [ $0 \mu g/L$ ] y expuesto a CPF [ $1 \mu g/L$ ]) durante dos semanas (véase Tabla 1). La concentración seleccionada de CPF en disolución ( $1 \mu g/L$ ) se encontró dentro del rango de concentraciones ambientalmente relevantes (Giddings et al., 2014; Álvarez-Vergara et al., 2022).

Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile (23681-FCS-UCH), en donde se llevaron a cabo los experimentos.

**Tabla 1.** Resumen de las condiciones de aclimatación. Cuatro tratamientos experimentales considerando un periodo de 14 días de exposición. Los tratamientos incluyeron temperatura constante y clorpirifós (TC/P), temperatura variable y clorpirifós (TV/P), temperatura constante sin clorpirifós (TC/NP) y temperatura variable sin clorpirifós (TV/NP).

	<b>Exposición a clorpirifós</b>	
<b>Tratamiento térmico</b>	TC ( $23 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) / NP	TC ( $23 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) / P
	TV ( $23 \pm 7^{\circ}\text{C}$ ) / NP	TV ( $23 \pm 7^{\circ}\text{C}$ ) / P

## 2.2. Tasa metabólica estándar

La tasa metabólica estándar (SMR) se estimó como el volumen consumido de oxígeno ( $\text{VO}_2$ ) utilizando el método de respirometría de flujo abierto siguiendo el protocolo de Kiss et al. (2009) con modificaciones de Peña-Villalobos et al. (2016). Brevemente, los individuos se secaron suavemente con una toalla de papel, se pesaron usando una balanza electrónica ( $\pm 0,1$  g) y se colocaron en cámaras acrílicas transparentes de 1,5 L. Dentro de cada cámara se colocó una toalla de papel húmeda y luego se ubicó en un gabinete iluminado con temperatura controlada (Sable Systems, Henderson, Nevada) a temperatura constante ( $16$  o  $30 \pm 0,5$  °C).

La cámara metabólica recibió aire a 400 mL/min de un controlador de flujo másico y a través de tubos BevA-Line (Thermoplastic Processes Inc., Georgetown, Delaware). El aire que sale de la cámara pasó primero por una columna de diédrita para secarlo, luego el aire seco entró al analizador de CO<sub>2</sub> y finalmente a través de un analizador de O<sub>2</sub> FoxBox equipado con un medidor de flujo (Sable Systems, Henderson, Nevada) calibrado con una mezcla conocida de oxígeno (20%) y nitrógeno (80%) que se certificó por cromatografía (INDURA, Chile). Debido a que el CO<sub>2</sub> se extrajo antes de entrar en el analizador de O<sub>2</sub>, el consumo de oxígeno se calculó como (Withers, 1977):  $VO_2 = (FR \times 60 \times (F_i O_2 - F_e O_2) / (1 - F_i O_2))$ , donde FR es la tasa de flujo en mL/min, F<sub>i</sub> y F<sub>e</sub> son las concentraciones fraccionarias de O<sub>2</sub> entrando y saliendo de la cámara metabólica, respectivamente. Debido a que esta especie es principalmente activa durante la noche, todas las mediciones metabólicas se realizaron en el periodo de menor actividad, durante el día (entre las 10:00 y las 14:00 h; Abel et al., 1992).

Antes y después de cada registro, se realizó una línea base de al menos 10 min, considerando un intervalo de muestreo cada 5 s. Los animales permanecieron en la cámara durante 3 h, tiempo suficiente para alcanzar condiciones de estado estable, lo que normalmente ocurrió después de 1 a 2 h. Por último, en cada medición se utilizó un periodo de 20 min más estables y de menor consumo de oxígeno en el registro.

El análisis y procesamiento de datos se realizó a través del software EXPEDATA (Sable System, international, NV, Estados Unidos).

### *2.3. Respuesta de enderezamiento*

Tres días antes y tres días después de la aclimatación a las condiciones experimentales, se midió la respuesta de enderezamiento, entendida como el tiempo que demora un individuo en volver a una posición boca abajo después de haber sido colocado boca arriba, en los cuatro grupos experimentales a tres temperaturas diferentes. La estimación del rendimiento locomotor se basó en el protocolo de Cortes et al. (2016). En resumen, los animales fueron expuestos a la temperatura experimental de medición a las 10:00 h, y a las 18:00 h se realizaron las pruebas de rendimiento. El procedimiento se repitió durante seis días consecutivos: en los primeros tres días se midieron animales no expuestos al xenobiótico y en los últimos tres días a los animales expuestos al pesticida. La secuencia para las temperaturas experimentales fue la siguiente: día 1,  $23 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ; día 2,  $16 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ; día 3,  $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ; día 4,  $23 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ; día 5,  $16 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ; día 6,  $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . La masa corporal se midió antes de todos los procedimientos experimentales con una balanza electrónica ( $\pm 0,1$  g). Finalmente, las curvas se expresaron en términos de frecuencia (recíproco del tiempo; 1/s), lo que indica que valores más altos sugieren un mayor rendimiento locomotor.

### *2.4. Obtención de sangre y relación neutrófilos:linfocitos (N/L)*

Al finalizar las mediciones de la tasa metabólica, los animales se sedaron sumergiéndolos en una solución del anestésico MS222 (300 mg/L, pH = 7.0) para obtener una muestra de sangre desde el corazón (Reed, 2005; Green, 2009; McNamara et al., 2018). Una vez verificada la pérdida del reflejo ante el pellizco

de las patas traseras, y utilizando una jeringa esterilizada de 27G con EDTA como anticoagulante (Ruiz et al., 1989; Green, 2009; Lorrain-Soligon et al., 2022) se extrajo cerca del 1% de la masa corporal en sangre (10  $\mu$ L/g).

Con 10  $\mu$ L de sangre se generaron frotis sanguíneos (extensiones sobre portaobjetos) para determinar el perfil leucocitario y calcular la relación N/L, una medida indirecta del estrés ambiental (Davis et al., 2008; Johnstone et al., 2012). Para ello, los frotis se secaron al aire (a 25°C) por 3 minutos y luego se aplicó la tinción May-Grünwald-Giemsa (5 min con solución May-Grünwald; se lavó con agua de grifo y 10 min con solución Giemsa 10%). Los porcentajes de eosinófilos, basófilos, monocitos, neutrófilos y linfocitos se obtuvieron al contar un total de 100 glóbulos blancos bajo aumento mayor (100X) con ayuda de un microscopio óptico (Microscopio trinocular LED Biotek) y un software analizador de imágenes (S-Viewer) con aumento digital.

Finalmente, las muestras sanguíneas restantes se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C (Boeco M240R, Alemania) para separar los elementos figurados del plasma. Se recuperó el sobrenadante (plasma) de cada muestra en un criotubo de 2 mL nuevo que fue almacenado a -80 °C (Thermo Scientific Forma 89000 series) para análisis posteriores.

### *2.5. Biomarcadores de estrés oxidativo*

Para evaluar los parámetros de estrés oxidativo, se determinó la capacidad antioxidante total (TAC) y se realizó el ensayo de peroxidación lipídica, midiendo los niveles de TBARS, ambos en plasma. Para el primer caso, se realizó el

ensayo de TAC midiendo la intensidad colorimétrica del complejo cobre-neocuproína que se redujo desde iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) a iones  $\text{Cu}^+$  por acción de las moléculas antioxidantes en la muestra de plasma generando una coloración azulada, y midiendo la absorbancia a 450 nm (Apak et al., 2008). Se preparó un medio de reacción en volumen en proporción para microplaca basado en Apak et al. (2004), el que contenía 10 mM de Cloruro de Cobre (II), 1 M de Acetato de Amonio (pH = 7,0) como buffer y 7,5 mM de neocuproína. El medio de reacción se terminó de preparar al añadir el volumen de muestra o estándar y se dejó incubar por una hora a 25°C. El volumen final de reacción es de 0,205 mL, el volumen de cada reactante se ajustó para un ensayo de microplaca respecto a las proporciones señaladas por Apak et al. (2004). Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Sky High UV/VIS a 450 nm a 25°C. El buffer de dilución de las muestras fue PBS. Debido a que se utilizó trolox como estándar, la capacidad antioxidante se presenta como la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox.

El ensayo TBARS midió la intensidad de formación de aductores de ácido 2-tiobarbiturico (TBA). El protocolo se basó en Ohkawa et al. (1979) pero con modificaciones. En frío, se añadió a la muestra una solución (fría en hielo) de antioxidante 5% Butil-hidroxitolueno (BHT) para evitar la formación y el efecto de moléculas prooxidantes durante el procesamiento de la muestra de plasma, en una proporción volumen/volumen 1:100 (BHT:muestra). La dilución de la muestra se realizó en KCl al 1,15%. Se preparó por separado varias soluciones acuosas de 8% SDS (p/v), 55 mM TBA en ácido acético al 20% (v/v). Se preparó el medio

de reacción primero añadiendo relación 3:2 de muestra y SDS, incubando por 5 minutos en hielo. Luego se mezcló un medio de reacción de proporción volumen/volumen 4:3:1 de agua, TBA y muestra. Este medio se incubó por una hora a 95°C en un baño seco. Luego de este periodo rápidamente se extrajo la muestra y se enfrió hasta temperatura ambiente en menos de 4 minutos en hielo. Se utilizó un tubo control con agua y se analizó la disminución de la temperatura de este tubo con un termómetro de mercurio. Las muestras a temperatura ambiente (25 °C) se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se recogió y se colocó un volumen de 200 µL en una microplaca. Se cuantificó la absorbancia en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Sky High UV/VIS a 532 nm a 25°C. El nivel de malondialdehído (MDA) en las muestras se cuantificó mediante una curva de calibración con el protocolo antes mencionado reemplazando por soluciones de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) un análogo al MDA también llamado Malondialdeido bis (dimetil acetal), en un rango de concentraciones de 0 a 125 µM. Finalmente, se calculó un índice de equilibrio oxidativo como la relación TBARS/TAC (x1000) para generar un valor único que integró variaciones potenciales en el equilibrio oxidativo entre individuos (Gutiérrez et al., 2019) aplicado en organismos ectotermos (Narváez et al., 2022). Los valores de índice altos significan niveles altos de estrés oxidativo (Costantini et al., 2007).

## 2.6. Ensayo de enzimas esterasas

La actividad de tres enzimas esterasas implicadas en la toxicidad aguda del CPF (acetilcolinesterasa [AChE]) y su detoxificación (butirilcolinesterasa [BChE], EC 3.1.1.8 y carboxilesterasa [CbE] EC 3.1.1.1) fueron determinadas en muestras de plasma. La inhibición de BChE y CbE se considera un mecanismo no catalítico de desintoxicación de pesticidas, en el cual la molécula de organofosforado se inactiva mediante la unión irreversible al sitio activo de estas esterasas (Lockidge y Masson, 2000; Liu et al., 2011; Cui et al., 2015). Las actividades de AChE y de BChE se determinaron según el método de Ellman et al. (1961), adaptado al formato de microplaca de 96 pocillos por Wheelock et al. (2005). El medio de reacción (200  $\mu$ L) estaba compuesto por tampón fosfato de Na 0,1 M (pH = 8,0), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) 320  $\mu$ M, yoduro de acetiltiocolina (AcSCh) 60 mM o yoduro de butiriltiocolina (BuSCh), y la muestra. La formación del producto fue monitoreada durante 8 minutos a 412 nm. La actividad específica fue calculada usando el coeficiente de absorción molar de 8,6  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

La actividad CbE fue determinada utilizando los sustratos éster 1-naftilacetato (1-NA) y 4-nitrofenil acetato (4-NPA) siguiendo el ensayo discontinuo de Thompson (1999). Usando 1-NA el medio de reacción (250  $\mu$ L, volumen final) contenía Tris-HCl 0,1 M (pH = 7,4), 1-NA 20 mM y la muestra, y se incubó durante 10 minutos a 25 °C. La hidrólisis de 1-NA se detuvo añadiendo 50  $\mu$ L de una solución preparada disolviendo 0,1 % de Fast Red ITR en una mezcla de 2,5 % (p/v) de SDS y 2,5 % de Tritón X-100. Las microplacas se dejaron en oscuridad durante 30 minutos para que se desarrollara el complejo Naftol-Fast Red ITR que

fue leído a 530 nm. La actividad específica calculada utilizando un coeficiente de extinción molar de  $14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Usando 4-NPA el medio de reacción (250  $\mu\text{L}$ , volumen final) estaba compuesto de Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) con la muestra. La reacción se inició con 10  $\mu\text{L}$  de 4-NPA 20 mM y se incubó en agitación continua durante 10 minutos a  $25^\circ\text{C}$ . Luego la reacción se detuvo agregando 50  $\mu\text{L}$  de SDS 2% en Tris 2% y se monitorizó la formación de 4-nitrofenol a 405 nm. La actividad específica se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de  $8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Los ensayos cinéticos se realizaron por triplicado y se leyeron utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO UV/VIS a  $25^\circ\text{C}$ . Se incluyeron espacios en blanco (i.e., medios de reacción sin muestras) en los ensayos para descartar la generación no enzimática de los productos de reacción. La concentración de proteínas total fue cuantificada siguiendo el método de Bradford (1976) usando albúmina de suero bovino como estándar, por lo que todas las actividades enzimáticas se expresaron como actividad específica por miligramo de proteína ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$  proteína).

### *2.7. Análisis estadístico*

Antes de realizar los análisis entre tratamientos, se comprobó la distribución normal de los datos mediante una prueba de Shapiro-Wilk, y una prueba de Levene para comprobar su homocedasticidad. Luego, se utilizó un ANOVA factorial de dos vías para determinar diferencias significativas entre los grupos promedios de cada variable entre los grupos experimentales. De igual manera se

utilizó un análisis de covarianza (ANCOVA) para descartar el efecto de la masa corporal. Además, se empleó un análisis de comparaciones múltiples, el análisis *a posteriori* de Fisher LSD, para identificar cuáles tratamientos presentaron diferencias significativas entre sí.

Debido a que las variables analizadas presentaron una alta colinealidad; y para reducir el número de variables, se utilizó un análisis de componentes principales (PCA), incluyendo las principales variables bioquímicas y energéticas en el modelo. Posteriormente, los dos ejes principales del modelo fueron analizados mediante un ANOVA por separado usando como factores el tratamiento térmico y la exposición al pesticida. Por último, se combinó la nomenclatura dicotómica de significancia de un valor  $p$  menor a 0,05 con la propuesta por Muff et al. (2022) para la interpretación del valor  $p$  como evidencia de resultados. Todos los análisis se realizaron en el software estadístico STATISTICA 7.0 (StatSoft 2004) y los gráficos en el software Prism (GraphPad 2020).

### 3. RESULTADOS

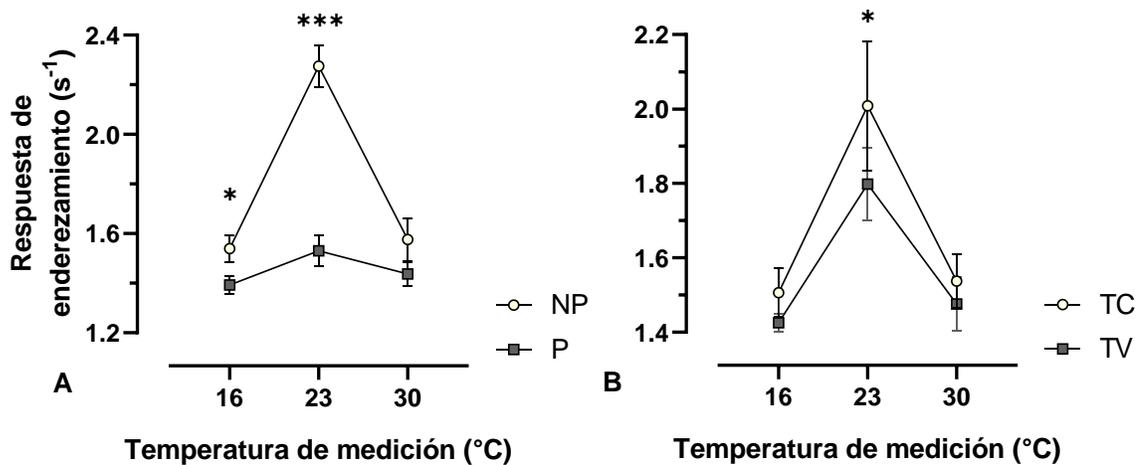
#### 3.1. Tamaño corporal y rendimiento locomotor

Luego de la aclimatación a dos semanas a las condiciones experimentales, la masa corporal y la longitud hocico-cloaca (SVL) no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (véase Tabla 2; Tabla S1 para los resultados estadísticos).

**Tabla 2.** Medidas de resumen (promedio  $\pm$  DE) del tamaño corporal y la respuesta locomotora de *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. TC: temperatura constante, TV: temperatura variable, NP: no expuesto al pesticida y P: expuesto al pesticida. Superíndices muestran diferencias entre grupos mediante la prueba *a posteriori* de Fisher.

Tratamientos	TC/NP	TC/P	TV/NP	TV/P
n	5	5	5	5
<b>Mb</b> (g)	125,2 $\pm$ 51,9	115,2 $\pm$ 43,4	113,3 $\pm$ 37,2	139,6 $\pm$ 24,6
<b>SVL</b> (mm)	103,6 $\pm$ 17,7	100,9 $\pm$ 13,8	101,2 $\pm$ 13,8	111,6 $\pm$ 8,8
<b>RE a 16°</b> (s <sup>-1</sup> )	1,64 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	1,38 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	1,44 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	1,41 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
<b>RE a 23°</b> (s <sup>-1</sup> )	2,47 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	1,55 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	2,08 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	1,52 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
<b>RE a 30°</b> (s <sup>-1</sup> )	1,60 $\pm$ 0,27	1,48 $\pm$ 0,19	1,56 $\pm$ 0,31	1,40 $\pm$ 0,09

El rendimiento locomotor fue afectado significativamente por el tratamiento térmico y el pesticida, siendo mayor para los grupos no expuestos al pesticida (Fig. 1A), como también para los grupos mantenidos a una temperatura constante (Fig. 1B; Tabla S1).

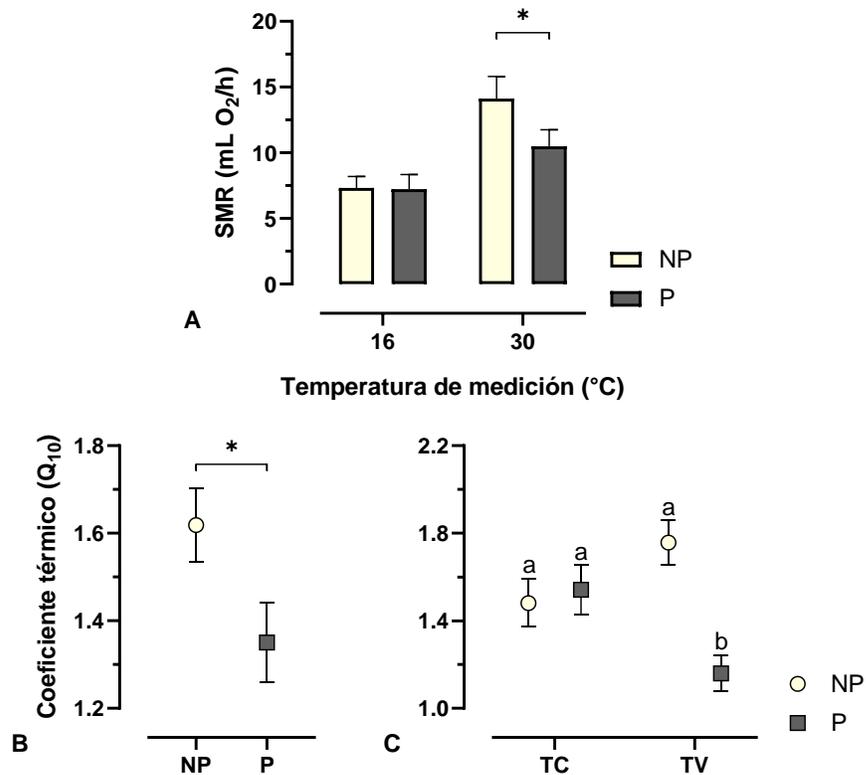


**Figura 1.** Curvas de rendimiento locomotor en función de la temperatura de medición para los individuos de *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós, categorizadas por la exposición a pesticida (A) y por el tratamiento térmico (B). Los tratamientos incluyeron temperatura constante (TC), temperatura variable (TV), no expuestos al pesticida (NP) y expuestos al pesticida (P). Los valores se muestran en valores promedio ( $\pm$  EE) del recíproco del tiempo de enderezamiento (1/s), y los asteriscos reflejan diferencias significativas entre los grupos.

### 3.2. Tasa metabólica (SMR) y coeficiente térmico ( $Q_{10}$ )

Los resultados del ANCOVA factorial revelaron que la tasa metabólica covarió con la masa corporal después de la aclimatación (ANCOVA SMR a 16°:  $F_{(1, 15)} = 7,446$ ,  $p = 0,016$ ; SMR a 30°:  $F_{(1, 15)} = 11,48$ ,  $p = 0,004$ ). Sin embargo, sólo la exposición al pesticida afectó el metabolismo medido a 30°C, siendo este

significativamente menor en los grupos expuestos al xenobiótico (Fig. 2A). No se encontró evidencia de un efecto del tratamiento térmico ni de la interacción entre esos factores sobre SMR (Tabla S1).



**Figura 2.** Valores (promedio  $\pm$  EE) de la tasa metabólica y el coeficiente térmico de *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. SMR medida a 16 y a 30°C categorizado por la exposición al pesticida (A).  $Q_{10}$  categorizado por la exposición a pesticida (B) y por ambos factores (C). Los tratamientos incluyeron temperatura constante (TC), temperatura variable (TV), no expuestos al pesticida (NP), y expuestos al pesticida (P). Superíndices muestran diferencias entre grupos mediante la prueba *a posteriori* de Fisher.

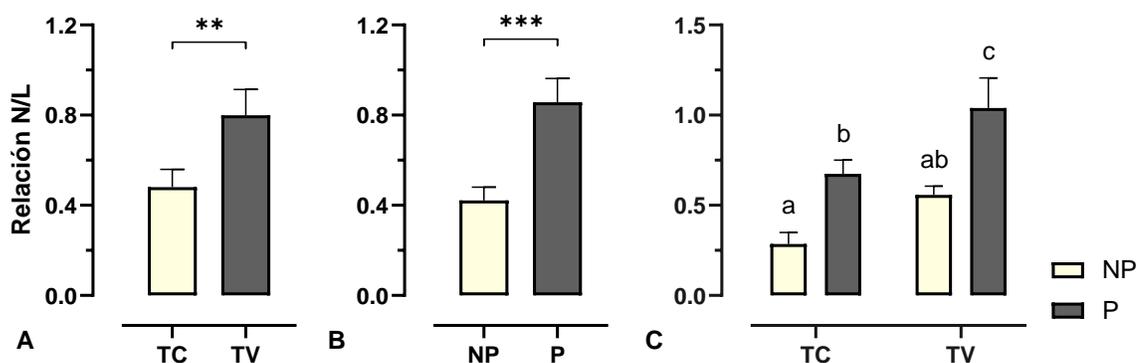
El análisis factorial reveló que el coeficiente térmico ( $Q_{10}$ ), fue afectado significativamente por la exposición al pesticida (Tabla S1), siendo menor en el

grupo expuesto al xenobiótico (Fig. 2B). Además, se evidenció un efecto significativo de la interacción entre los factores (Fig. 2C), mas no por el tratamiento térmico (Tabla S1).

### 3.3. *Perfil leucocitario y relación N/L*

El ANOVA factorial mostró que, tras la aclimatación de los organismos, el perfil leucocitario presentó diferencias en los recuentos diferenciales de basófilos, neutrófilos y linfocitos (Fig. S1; Tabla S2). Específicamente, en los grupos expuestos a CPF se encontró un aumento en el recuento de neutrófilos y una reducción en el número de basófilos y linfocitos (Tabla S3). En contraste, los grupos expuestos a temperatura variable presentaron un menor número de linfocitos y un aumento en el recuento de neutrófilos en comparación con los grupos mantenidos a temperatura constante (Tabla S3).

Además, se evidenció una relación N/L significativamente mayor en las ranas expuestas al pesticida (Fig. 3A), así como en individuos sometidos al tratamiento térmicamente variable (Fig. 3B). Sin embargo, no se encontró evidencia de un efecto de la interacción de los factores sobre este índice (Fig. 3C; Tabla S2).

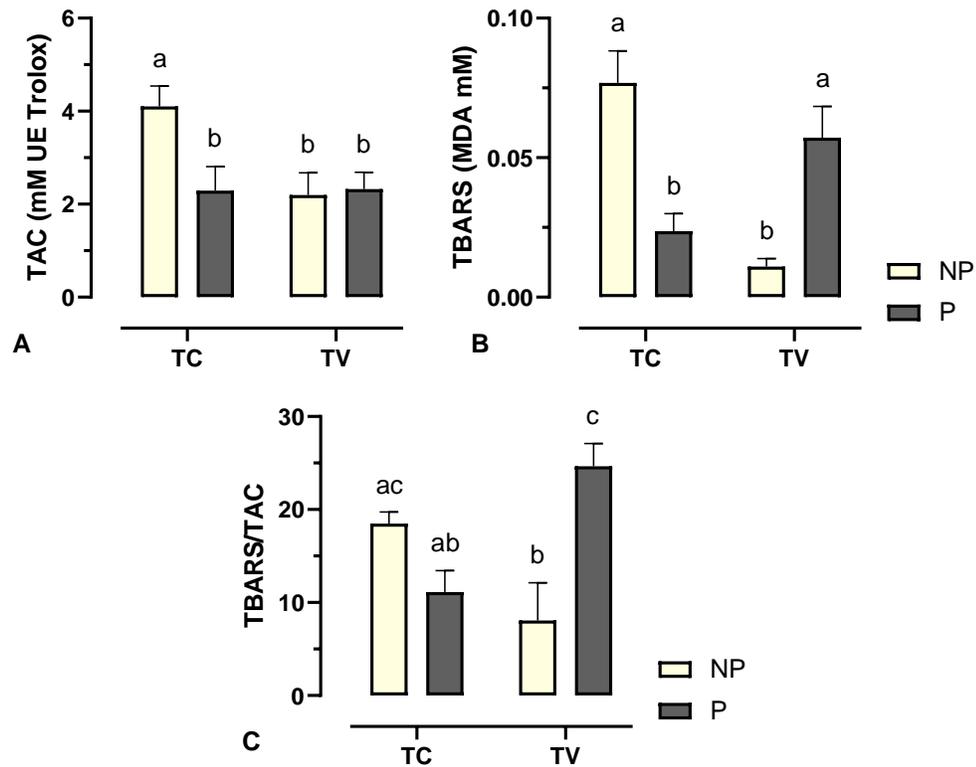


**Figura 3.** Resultados del índice N/L en *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós, categorizado por el factor pesticida (A), por el factor tratamiento térmico (B) y por ambos factores (C). Los tratamientos incluyeron temperatura constante (TC), temperatura variable (TV), no expuestos al pesticida (NP), y expuestos al pesticida (P). Superíndices muestran diferencias entre grupos mediante la prueba *a posteriori* de Fisher.

#### 3.4. Estado oxidativo

Una vez finalizada la aclimatación, el ANOVA factorial mostró que la TAC fue afectada marginalmente por el tratamiento térmico y por la exposición a pesticida, pero sin ser significativos estos efectos. En cambio, se identificó un efecto significativo de la interacción entre los factores (Tabla S1). La prueba *a posteriori* mostró que el grupo aclimatado al régimen térmico constante sin pesticida (TC-0  $\mu\text{g/L}$ ) presentó mayores de TAC que en los grupos restantes ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4A). Por su parte, los niveles de TBARS, no fueron afectados por la exposición al pesticida, pero si se encontró un efecto marginal del tratamiento térmico sobre TBARS. Además, se encontró un efecto significativo de la interacción entre los factores (Tabla S1). La prueba *a posteriori* mostró que los grupos TC-0  $\mu\text{g/L}$  y TV-

1  $\mu\text{g/L}$  fueron aquellos que tuvieron valores más altos de TBARS, pero no presentaron diferencias significativas entre ellos (Fig. 4B).



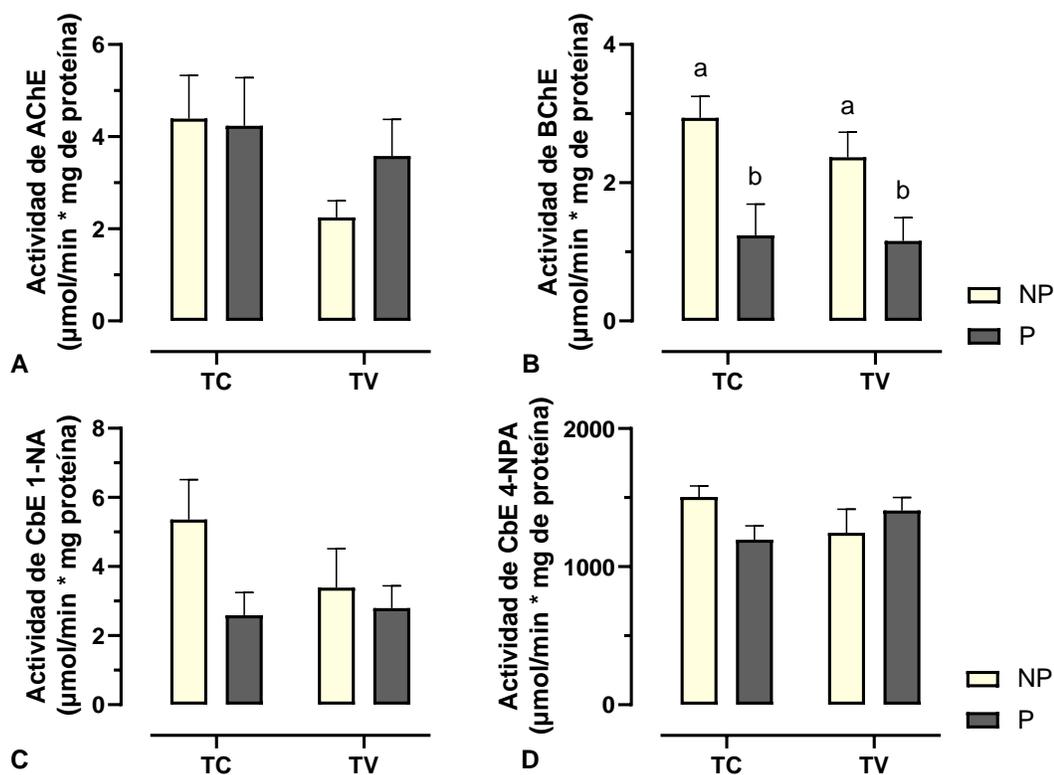
**Figura 4.** Biomarcadores de estrés oxidativo en individuos de *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para la capacidad antioxidante total en plasma (A), peroxidación lipídica en plasma (B), y estado oxidativo (C). Los tratamientos incluyeron temperatura constante (TC), temperatura variable (TV), no expuestos al pesticida (NP), y expuestos al pesticida (P). Superíndices muestran diferencias entre grupos mediante la prueba *a posteriori* de Fisher.

Por otro lado, al finalizar la aclimatación, el índice de equilibrio oxidativo (TBARS/TAC), fue afectado solo por la interacción entre los factores (Tabla S1), revelando que el grupo TV-1  $\mu\text{g/L}$  tuvo los mayores niveles en comparación con

los grupos restantes, aun cuando este aumento no fue estadísticamente diferente del grupo TC-0  $\mu\text{g/L}$  (Fig. 4C).

### 3.5. *Esterasas plasmáticas*

La actividad de AChE no fue afectada por ninguno de los factores ni por su interacción después de la aclimatación (Tabla S1; Fig. 5A). No obstante, se identificó que la exposición a pesticida tuvo un efecto significativo en la actividad de BChE, presentando una disminución en los grupos expuestos a clorpirifós (Fig. 5B). También se evidenció un efecto marginalmente significativo del pesticida sobre la actividad de la CbE 1-NA, con una tendencia a disminuir en presencia de CPF (Fig. 5C). Por último, la actividad de CbE 4-NPA solo se vio afectada marginalmente por la interacción entre el tratamiento térmico y la exposición al xenobiótico (Fig. 5D; Tabla S1).



**Figura 5.** Actividad enzimática de las esterasas en plasma de *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. Diferencias significativas entre tratamientos para la acetilcolinesterasa (A), butirilcolinesterasa (B), carboxilesterasa 1-naftil acetato (C) y carboxilesterasa 4-nitrofenil acetato (D). Los tratamientos incluyeron temperatura constante (TC), temperatura variable (TV), no expuestos al pesticida (NP), y expuestos al pesticida (P). Superíndices muestran diferencias entre grupos mediante la prueba *a posteriori* de Fisher.

### 3.6. Análisis multivariado (PCA)

Debido a la alta colinealidad entre las variables predictoras, realizamos un PCA que incluyó todas variables energéticas y bioquímicas. Los resultados de este análisis revelaron que las ocho variables del modelo se redujeron a dos ejes PCA. En conjunto, los dos ejes explican el 65,7% de la varianza total, lo que indica que

capturan una proporción considerable de la variabilidad en las variables analizadas (Tabla 3). El primer componente (PC 1) estuvo correlacionado con la TAC, TBARS, la actividad de CbE 4-NPA, CbE 1-NA y AChE. El segundo componente (PC 2) estuvo significativamente correlacionado con el coeficiente térmico ( $Q_{10}$ ) y la tasa metabólica (SMR) (Tabla 3).

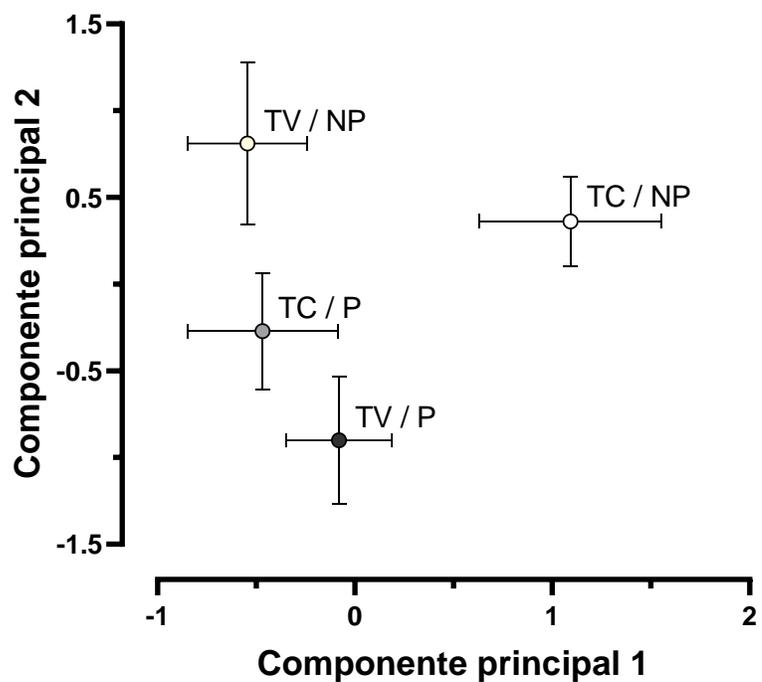
**Tabla 3.** Ejes del PCA derivados del análisis de rasgos bioquímicos y energéticos en *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. En negrita las variables que presentan una carga > 0,7.

<b>Variables</b>	<b>PCA eje 1</b>	<b>PCA eje 2</b>
TAC	<b>0,913</b>	0,094
TBARS	<b>0,765</b>	-0,068
CbE 4-NPA	<b>0,746</b>	-0,360
CbE 1-NA	<b>0,744</b>	0,326
AChE	0,693	-0,156
BChE	0,605	0,493
$Q_{10}$	-0,050	<b>0,880</b>
SMR	-0,048	<b>0,765</b>
Valor propio	3,38	1,88
Varianza explicada (%)	42,3	23,4
Varianza explicada acumulada (%)	42,3	65,7

El eje 1 puede ser interpretado como la capacidad bioquímica de responder al xenobiótico, debido a una alta asociación con las variables TAC, TBARS, CbE 4-NPA, CbE 1-NA y AChE. Por su parte, el eje 2, interpretado como la variable relacionada con el gasto energético, está significativamente asociado

con  $Q_{10}$  y SMR. El análisis de ANOVA factorial posterior sobre los valores de las puntuaciones factoriales reveló que para el eje 1 hubo un efecto de la interacción entre la temperatura y el pesticida ( $F_{(1, 16)} = 7,85$ ,  $p = 0,013$ ), pero no de la temperatura ( $F_{(1, 16)} = 2,99$ ,  $p = 0,103$ ) ni de la exposición al pesticida ( $F_{(1, 16)} = 2,30$ ,  $p = 0,148$ ). Para el eje 2, se encontró un efecto significativo de la exposición al pesticida ( $F_{(1, 16)} = 10,32$ ,  $p = 0,005$ ), pero no de la temperatura ( $F_{(1, 16)} = 0,062$ ,  $p = 0,807$ ) ni de la interacción entre los factores ( $F_{(1, 16)} = 2,19$ ,  $p = 0,158$ ).

La prueba *a posteriori* de Fisher reveló que el valor del eje 1 fue significativamente mayor en los animales aclimatados al tratamiento térmico constante sin pesticidas con respecto a los demás grupos, mientras que para el eje 2, los animales aclimatados al tratamiento térmico variable con pesticida tuvieron significativamente menores valores que los animales aclimatados a los tratamientos térmicos variable y constante libre de pesticida (Fig. 6; Tabla S4).



**Figura 6.** Resultados del análisis de componentes principales (PCA) incluyendo los biomarcadores plasmáticos y las variables energéticas en *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. El PC 1 estuvo fuertemente correlacionado con TAC, TBARS, CbE 4-NPA, CbE 1-NA y AChE; y el PC 2 estuvo significativamente correlacionado con  $Q_{10}$  y SMR. Los tratamientos incluyeron temperatura constante (TC), temperatura variable (TV), no expuestos al pesticida (NP), y expuestos al pesticida (P).

## 4. DISCUSION

### 4.1. *Efecto de la variabilidad térmica y exposición a CPF sobre el rendimiento locomotor*

Las diferencias observadas en las respuestas de enderezamiento (Fig. 1A) sugieren que la exposición a CPF afecta negativamente las capacidades físicas, perjudicando la función neuromuscular probablemente al inhibir las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa (Colombo et al., 2005; Bonifacio et al., 2017), tal como se ha reportado en otros anuros (Attademo et al., 2015; Liendo et al., 2015; Rutkoski et al., 2020). Esto se debe a que el exceso de acetilcolina sobre estimula los receptores colinérgicos, provocando impulsos nerviosos continuos que pueden provocar fatiga muscular y parálisis, lo que lleva a una reducción del rendimiento locomotor (Quiroga et al., 2019). Sin embargo, aunque no encontramos diferencias en la actividad de la acetilcolinesterasa en el plasma entre animales expuestos y no expuestos a pesticidas, los efectos en tejidos periféricos o en el plasma pueden ser menos evidentes (Sanchez-Hernandez y Wheelock, 2009; Boualit et al., 2022). En estos tejidos, la inhibición de la acetilcolinesterasa no siempre se manifiesta de manera tan pronunciada como en el sistema nervioso central o en la sinapsis neuromuscular, aunque puede contribuir a la toxicidad general y a la acumulación de acetilcolina. Por lo tanto, la ausencia de diferencias en la actividad de la acetilcolinesterasa en el plasma

podría deberse a una menor sensibilidad en estos tejidos o a mecanismos compensatorios que no logramos detectar en este estudio, lo cual difiere de lo esperado dado el impacto neuromuscular observado.

Por su parte, los resultados revelan que la respuesta de enderezamiento presentó una dependencia térmica significativa (Elnitsky y Claussen, 2006; Cortes et al., 2016). Además, la variación del régimen de temperatura afectó negativamente el desempeño del organismo (Slein et al., 2023), especialmente en rangos de temperatura cercana a los 23°C (Fig. 1B). Este efecto puede ser particularmente relevante para las poblaciones de *X. laevis* que habitan ambientes con fluctuación térmica contrastante (Wagener et al., 2021; Araspin et al., 2023).

Al considerar tanto la exposición al pesticida como la variabilidad térmica, los efectos perjudiciales sobre el rendimiento locomotor pueden ser explicados por dos factores. Primero, una mayor toxicidad del CPF provocada por el aumento de la temperatura ambiental (Patra et al., 2015; Verheyen y Stoks, 2019), o bien, una menor eficiencia en la detoxificación del CPF debido a la disminución de la temperatura (Quiroga et al., 2019). De esta manera, la neurotoxicidad inducida por el CPF, combinada con un amplio rango de temperaturas (16-30 °C), podría afectar significativamente la coordinación y la fuerza muscular (Quiroga et al., 2024), lo que llevaría a reducciones drásticas en el rendimiento locomotor (Fig. 1A y 1B).

#### 4.2. Ajustes de la eficiencia energética

La correlación positiva encontrada entre SMR y tamaño corporal es un resultado esperado, reportado tanto en *X. laevis* (Louppe et al., 2018) como en otros anuros (Steyermark et al., 2005). Sin embargo, no se observó una aclimatación significativa (es decir, plasticidad fenotípica) de SMR por efecto del tratamiento térmico, a pesar de que la presencia de aclimatación en esta variable es común en otros anuros (Marcheti et al., 2023) y ectotermos acuáticos (Carter et al., 2023). Por el contrario, nuestros resultados respaldan dos ideas propuestas: (i) la existencia de una capacidad limitada para aclimatarse a entornos variables (Niehaus et al., 2011; Young y Gifford, 2013), ya que las respuestas pasivas a la temperatura pueden ser suficientes para mantener el equilibrio energético (Havird et al., 2020), y (ii) una baja sensibilidad térmica de los procesos metabólicos (Kern et al., 2015) en respuesta a la variación térmica continua, especialmente durante las temperaturas ambientales máximas (Kern et al., 2014).

Curiosamente, la marcada disminución en la tasa metabólica estándar (SMR) observada (Fig. 2A) tras la exposición experimental a OP sugiere un posible efecto de supresión metabólica, un fenómeno previamente reportado en el pez *Fundulus heteroclitus* y el anuro *X. laevis*, debido principalmente a la fatiga muscular y al compromiso de las capacidades locomotoras y cardiorrespiratorias (Weis y Candelmo, 2012; Watson et al., 2014; Álvarez-Vergara et al., 2022). Además, se ha informado que los pesticidas OP generan compuestos que causan daño mitocondrial (Thosapornvichai et al., 2022), incluso a concentraciones que no son suficientes para inhibir la actividad de AChE (Terry, 2012; Costa, 2018).

Por lo tanto, una disminución en la producción energética podría contribuir aún más a la toxicidad del pesticida, principalmente al disminuir la energía disponible para invertir en mecanismos de desintoxicación y reparación (Verheyen et al., 2022). Además, la disminución en la sensibilidad térmica ( $Q_{10}$ ) de SMR por efecto del pesticida (Fig. 2B y 2C) parece ser una consecuencia en los anuros expuestos a CPF (Quiroga et al., 2024), lo que sugiere que los pesticidas OP pueden interferir en la capacidad de las ranas para ajustar su metabolismo mediante aclimatización a diferentes condiciones de temperatura.

#### *4.3. Respuesta leucocitaria ante la fluctuación térmica y exposición a pesticida*

Los recuentos diferenciales de leucocitos en vertebrados están fuertemente relacionados con la función inmunológica, y consisten en linfocitos, monocitos y granulocitos (Mestre et al., 2019). Por un lado, los monocitos y granulocitos juegan una función en la remoción de restos celulares lesionados, mientras que los linfocitos están relacionados con la producción de anticuerpos (Mestre et al., 2019). La fluctuación de la temperatura impactó significativamente los recuentos de neutrófilos y linfocitos, por lo que la función inmune se ve comprometida en los anfibios (Terrell et al., 2013) debido a que (i) se puede desencadenar una respuesta de estrés térmico y (ii) puede afectar la actividad de las células o proteínas asociadas a la función inmune (Raffel et al., 2006). En ese sentido, es probable que los aumentos en el índice N/L (Fig. 3A) reflejen un efecto indirecto de la respuesta al estrés (Terrell et al., 2013; Greenspan et al., 2017), tal y como lo muestran las poblaciones de la salamandra gigante (*Cryptobranchus*

*alleganiensis*) a lo largo de un gradiente de calidad del hábitat (Litmer et al., 2020).

Los resultados evidenciaron diferencias significativas en el índice N/L entre los grupos experimentales (Fig. 3B y 3C), lo que podría ser consecuencia de una mayor sensibilidad en *X. laevis* a agentes tóxicos. Esto es consistente con la predicción de que la exposición a pesticidas involucra un aumento de la relación N/L debido a la neutrofilia y/o linfopenia (da Silva et al., 2020; Zhevel et al., 2024) acompañada de la disminución significativa del número de basófilos encontrados en los grupos expuestos a CPF, lo que podría indicar una reducción general de la capacidad defensiva del organismo (Zhevel et al., 2024). Considerando que los neutrófilos forman la primera línea de defensa del sistema inmune innato de los vertebrados, su aumento indicaría una movilización de las fuerzas protectoras del organismo en respuesta al estrés (Romanova y Romanova, 2003), mientras que una disminución de los linfocitos podría deberse al efecto en el aumento de los glucocorticoides plasmáticos (Bahl et al., 2024). Sin embargo, estas respuestas no son universales, como lo revelan algunos estudios en donde no se modifica el índice N/L en ectotermos expuestos a pesticidas (Mestre et al., 2019; Salinas et al., 2024).

#### 4.4. *Biomarcadores bioquímicos y energéticos*

Los efectos de la interacción entre la variabilidad térmica y la exposición a CPF indican una relación compleja que impacta sobre los niveles de TAC, TBARS y el índice de estrés oxidativo. Así, los mayores niveles de TAC encontrados en el

grupo mantenido a temperatura constante y libre de CPF (Fig. 4A) sugiere que las ranas podrían sintetizar activamente compuestos antioxidantes endógenos (Álvarez-Vergara et al., 2022). Además, la disminución de los niveles de TAC en los animales expuestos al pesticida reflejaría una posible inhibición en las enzimas y otras proteínas antioxidantes (Roche et al., 2008), como ocurre en insectos y ranas (Álvarez-Vergara et al., 2022; Verheyen et al., 2023). Es posible entonces que la interacción entre CPF y variabilidad térmica produjeran un efecto antagónico sobre la capacidad antioxidante en aquellos grupos expuestos a pesticida (Fig. 4A), agotando los compuestos utilizados como defensas antioxidantes (Verheyen et al., 2023).

Si bien los niveles de TBARS y el índice de estrés oxidativo entre el grupo control y el expuesto a CPF no difieren entre sí (Fig. 4B y 4C), la potencial relación positiva y funcional entre el daño oxidativo y la tasa metabólica (Buttermer et al., 2010; Bury et al., 2020) sugiere que una menor SMR en los anuros traerá consecuencias en la producción de ROS (Roussel et al., 2015). Por lo tanto, es posible que una disminución en los presupuestos energéticos explique la variación observada en los niveles de daño oxidativo en las ranas.

La disminución significativa de la actividad plasmática de BChE en los grupos expuestos al pesticida (Fig. 5B) junto con la disminución marginalmente significativa de CbE 1-NA (Fig. 5C), refleja que la exposición a plaguicidas OP en los anuros provoca inhibiciones de las enzimas colinesteraras y carboxilesterasas (Lajmanovic et al., 2018). Se ha propuesto que la inhibición de la actividad de BChE y CbE 1-NA funcionaría como un mecanismo de protección enzimática (ver

Narváez et al., 2016), y esto podría explicar la constancia observada en la actividad plasmática de AChE en los anuros (Liendro et al., 2015) incluido *X. laevis* (Álvarez-Vergara et al., 2022).

Por otro lado, la variación térmica por sí sola no alteró significativamente las actividades de las colinesterasas y carboxilesterasas, lo que sugiere que estas enzimas tienen amplios rangos de funcionamiento térmico, o bien, que *X. laevis* posee mecanismos que le permiten compensar los niveles alterados de estas enzimas debido al cambio térmico, como lo indican estudios en el pez *Sander vitreus* (Phillips et al., 2002) y en el caballito de mar *Hippocampus erectus* (Del Vecchio et al., 2024).

Finalmente, la identificación de dos componentes principales relacionados con la respuesta bioquímica a los xenobióticos y el gasto energético proporciona una comprensión integral de los impactos del CPF y la variabilidad térmica. Este análisis de componentes principales reveló dos patrones destacables: por un lado, la capacidad bioquímica para responder a la toxicidad asociada a la detoxificación del pesticida disminuye por efecto de la interacción entre la exposición a CPF y la variabilidad térmica (Slein et al., 2023; Verheyen et al., 2023). Por otro lado, los grupos expuestos a los pesticidas mostraron una reducción en el gasto energético, lo que indicaría que estos factores estresantes podrían afectar de manera diferencial las vías bioquímicas y energéticas (Lajmanovic et al., 2018; Álvarez-Vergara et al., 2022).

#### 4.5. *Limitaciones del estudio*

Finalmente, este estudio tiene algunas limitaciones que merecen atención. Esta investigación se centró en la medición de las respuestas bioquímicas a nivel plasmático, que pueden no reflejar con precisión los cambios fisiológicos que se producen a nivel de otros tejidos. Por lo tanto, sin evaluaciones a nivel de órganos internos y aquellos asociados a la locomoción, nuestros hallazgos pueden no reflejar completamente los procesos biológicos sistémicos y localizados que subyacen a los cambios observados en las respuestas bioquímicas.

Además, aunque las ranas provenían de zonas agrícolas, desconocemos si estuvieron en contacto con estos xenobióticos. Sin embargo, si los organismos hubieran estado expuestos a pesticidas organofosforados, la actividad de las enzimas esterasas no habría mostrado inhibición. Por ello, asumimos que los anuros no estuvieron expuestos a dosis capaces de generar efectos significativos en sus respuestas fisiológicas durante el periodo de aclimatación.

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que la exposición simultánea al pesticida clorpirifós y a la variabilidad térmica produce efectos sinérgicos y complejos sobre múltiples aspectos del rendimiento fisiológico, incluyendo la locomoción, el metabolismo energético, la actividad de enzimas detoxificadoras y las defensas antioxidantes. Además, se observó un incremento en los índices de estrés fisiológico asociado a estos dos factores, afectando directamente la capacidad de aclimatación y el equilibrio energético en la rana *Xenopus laevis*. Sin embargo, nuestros hallazgos indican que este anuro invasor puede tolerar niveles moderados de CPF y resistir los diversos ajustes fisiológicos y bioquímicos, incluyendo cambios en el balance energético. En términos generales, el aumento de las temperaturas medias y la variabilidad térmica pueden intensificar los efectos negativos de los pesticidas. Por lo tanto, el análisis detallado de cómo estos factores impactan la salud y la capacidad de respuesta a los xenobióticos en esta especie modelo resulta fundamental para comprender mejor la adaptabilidad y supervivencia de los anuros en entornos sujetos a rápidos cambios ambientales.

## 6. REFERENCIAS

- Abel, D., Seale, D. B., & Boraas, M. E. (1992). Periodicities and transient shifts in anuran (*Xenopus laevis*, *Rana clamitans*) oxygen consumption revealed with flow-through respirometry. *Comparative biochemistry and physiology part A: Physiology*, 101(3), 425–432. doi:10.1016/0300-9629(92)90491-8
- Álvarez-Vergara, F., Sanchez-Hernandez, J. C., y Sabat, P. (2022). Biochemical and osmoregulatory responses of the African clawed frog experimentally exposed to salt and pesticide. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 258, 109367. doi:10.1016/j.cbpc.2022.109367
- Apak, R., Güçlü, K., Ozyürek, M. y Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970–7981. doi:10.1021/jf048741x
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. y Celik, S. E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim Acta* 160, 413–419. doi:10.1007/s00604-007-0777-0
- Arambourou, H. y Stoks, R. (2015). Combined effects of larval exposure to a heat wave and chlorpyrifos in northern and southern populations of the damselfly *Ischnura elegans*. *Chemosphere*, 128, 148–154. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.01.044
- Araspin, L., Wagener, C., Padilla, P., Herrel, A. y Measey, J. (2023). Shifts in the Thermal Dependence of Locomotor Performance across an Altitudinal Gradient in Native Populations of *Xenopus laevis*. *Physiological and biochemical zoology: PBZ*, 96(4), 272–281. doi:10.1086/725237
- Attademo, A., Peltzer, P., Lajmanovich, R., Cabagna-Zenkhusen, M., Junges, C., Lorenzatti, E., Aró, C. y Grenón, P. (2015). Biochemical changes in certain enzymes of *Lysapsus limellium* (Anura: Hylidae) exposed to chlorpyrifos. *Ecotoxicology and environmental safety*, 113, 287–294. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.12.021
- Bahl, M. F., Salgado Costa, C., Demetrio, P. M., Mac Loughlin, T. M., Arruti, M. E., Brodeur, J. M. C. y Natale, G. S. (2024). Integration of a battery of biomarkers to evaluate the health status of field-collected frogs of *Leptodactylus luctator* living

- in ecosystems with different anthropogenic disturbances. *The Science of the total environment*, 933, 173174. doi:10.1016/j.scitotenv.2024.173174
- Banerjee, B. D., Seth, V y Ahmed, R. S. (2001). Pesticide-Induced Oxidative Stress: Perspective and Trends. *Reviews on Environmental Health*, 16(1), 1–40. doi:10.1515/reveh.2001.16.1.1
- Barbosa, M., Inocentes, N., Soares, A. M. y Oliveira, M. (2017). Synergy effects of fluoxetine and variability in temperature lead to proportionally greater fitness costs in *Daphnia*: A multigenerational test. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 193, 268–275. doi:10.1016/j.aquatox.2017.10.017
- Bech, C., Christiansen, M. T., Kvernland, P., Nygård, R. M., Rypdal, E., Sneltorp, S. K., Trondrud, L. M. y Tvedten, Ø. G. (2020). The standard metabolic rate of a land snail (*Cepaea hortensis*) is a repeatable trait and influences winter survival. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 249, 110773. doi:10.1016/j.cbpa.2020.110773
- Betteridge D. J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism: clinical and experimental*, 49(2 Suppl 1), 3–8. doi:10.1016/s0026-0495(00)80077-3
- Blévin, P., Tartu, S., Ellis, H. I., Chastel, O., Bustamante, P., Parenteau, C., Herzke, D., Angelier, F. y Gabrielsen, G. W. (2017). Contaminants and energy expenditure in an Arctic seabird: Organochlorine pesticides and perfluoroalkyl substances are associated with metabolic rate in a contrasted manner. *Environmental research*, 157, 118–126. doi:10.1016/j.envres.2017.05.022
- Boccioni, A. P. C., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M. y Martinuzzi, C. S. (2021). Toxicity assessment at different experimental scenarios with glyphosate, chlorpyrifos and antibiotics in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Chemosphere*, 273, 128475. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128475
- Bonifacio, A. F., Ballesteros, M. L., Bonansea, R. I., Filippi, I., Amé, M. V. y Hued, A. C. (2017). Environmental relevant concentrations of a chlorpyrifos commercial formulation affect two neotropical fish species, *Cheirodon interruptus* and *Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere*, 188, 486–493. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.08.156
- Boualit, L., Cayuela, H., Cattin, L. y Chèvre, N. (2022). The Amphibian Short-Term Assay: Evaluation of a New Ecotoxicological Method for Amphibians Using Two Organophosphate Pesticides Commonly Found in Nature-Assessment of Biochemical, Morphological, and Life-History Traits. *Environmental toxicology and chemistry*, 41(11), 2688–2699. doi:10.1002/etc.5436
- Boualit, L., Cayuela, H., Ballu, A., Cattin, L., Reis, C. y Chèvre, N. (2023). The Amphibian Short-Term Assay: Evaluation of a New Ecotoxicological Method for Amphibians

- Using Two Organophosphate Pesticides Commonly Found in Nature-Assessment of Behavioral Traits. *Environmental toxicology and chemistry*, 42(7), 1595–1606. doi:10.1002/etc.5642
- Bovo, R., Navas, C., Tejado, M., Valença, S. y Gouveia, S. (2018). Ecophysiology of Amphibians: Information for Best Mechanistic Models. *Diversity*, 10(4), 118. doi:10.3390/d10040118
- Bozinovic, F., Catalán, T., Estay, S. y Sabat, A. P. (2013). Acclimation to daily thermal variability drives the metabolic performance curve. *Evolutionary Ecology Research*, 15, 579–587.
- Bozinovic, F. y Cavieres L. A. (2019). *El cambio climático y la biología funcional de los organismos*. Ediciones Universidad Católica de Chile.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Bury, S., Cierniak, A., Jakóbik, J., Sadowska, E. T., Cichoń, M. y Bauchinger, U. (2020). Cellular Turnover: A Potential Metabolic Rate-Driven Mechanism to Mitigate Accumulation of DNA Damage. *Physiological and biochemical zoology*, 93(2), 90–96. doi:10.1086/707506
- Buttemer, W. A., Abele, D. y Costantini, D. (2010). From bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Functional Ecology*, 24(5), 971–983. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01740.x
- Calosi, P., Bilton, D. T. y Spicer, J. I. (2008). Thermal tolerance, acclimatory capacity and vulnerability to global climate change. *Biology letters*, 4(1), 99–102. doi:10.1098/rsbl.2007.0408
- Carter, M. J., Cortes, P. A. y Rezende, E. L. (2023). Temperature variability and metabolic adaptation in terrestrial and aquatic ectotherms. *Journal of thermal biology*, 115, 103565. doi:10.1016/j.jtherbio.2023.103565
- Chambers, J. E., Meek, E. C. y Ross, M. (2011). The Metabolic Activation and Detoxication of Anticholinesterase Insecticides. En: T. Satoh y R. C. Gupta (Eds.), *Anticholinesterase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity, and Epidemiology* (1ª ed., pp. 77–84). Wiley. doi:10.1002/9780470640500
- Colombo, A., Orsi, F. y Bonfanti, P. (2005). Exposure to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos inhibits acetylcholinesterase activity and affects muscular integrity in *Xenopus laevis* larvae. *Chemosphere*, 61(11), 1665–1671. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.04.005

- Cortes, P. A., Puschel, H., Acuña, P., Bartheld, J. L. y Bozinovic, F. (2016). Thermal ecological physiology of native and invasive frog species: do invaders perform better?. *Conservation physiology*, 4(1), cow056. doi:10.1093/conphys/cow056
- Costa, L. G. (2018). Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 162(1), 24–35. doi:10.1093/toxsci/kfx266
- Costa, M. J., Monteiro, D. A., Oliveira-Neto, A. L., Rantin, F. T. y Kalinin, A. L. (2008). Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. *Ecotoxicology*, 17(3), 153–163. doi:10.1007/s10646-007-0178-5
- Costantini, D., Cardinale, M. y Carere, C. (2007). Oxidative damage and anti-oxidant capacity in two migratory bird species at a stop-over site. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 144(4), 363–371. doi:10.1016/j.cbpc.2006.11.005
- Cui, F., Li, M. X., Chang, H. J., Mao, Y., Zhang, H. Y., Lu, L. X., Yan, S. G., Lang, M. L., Liu, L. y Qiao, C. L. (2015). Carboxylesterase-mediated insecticide resistance: Quantitative increase induces broader metabolic resistance than qualitative change. *Pesticide biochemistry and physiology*, 121, 88–96. doi:10.1016/j.pestbp.2014.12.016
- da Silva, M. B., Fraga, R. E., Nishiyama, P. B., da Silva, I. S., Costa, N. L., de Oliveira, L. A. y Juncá, F. A. (2020). Leukocyte profiles in *Odontophrynus carvalhoi* (Amphibia: Odontophrynidae) tadpoles exposed to organophosphate chlorpyrifos pesticides. *Water, Air, & Soil Pollution* 231(372), 1–11. doi:10.1007/s11270-020-04726-4
- David, M., Marigoudar, S. R., Patil, V. K. y Halappa, R. (2012). Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). *Pesticide biochemistry and physiology*, 103(2), 127–134. doi:10.1016/j.pestbp.2012.04.009
- Davis, A. K., Maney, D. L. y Maerz, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22(5), 760–772. doi:10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x
- Davis, A. K. y Maney, D. L. (2018). The use of glucocorticoid hormones or leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: what's the difference? *Methods in Ecology and Evolution*, 9(6), 1556–1568. doi:10.1111/2041-210X.13020
- Del Vecchio, G., Rodríguez-Fuentes, G., Rosas, C. y Mascaró, M. (2024). Thermoregulatory response in juvenile *Hippocampus erectus*: Effect of magnitude

- and rate of thermal increase on metabolism and antioxidative defence. *Ecology and evolution*, 14(2), e10977. doi:10.1002/ece3.10977
- Delnat, V., Verborgt, J., Janssens, L. y Stoks, R. (2021). Daily temperature variation lowers the lethal and sublethal impact of a pesticide pulse due to a higher degradation rate. *Chemosphere*, 263, 128114. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128114
- Dzul-Caamal, R., Domínguez-López, M. L., García-Latorre, E. y Vega-López, A. (2012). Implications of cytochrome 450 isoenzymes, aryl-esterase and oxonase activity in the inhibition of the acetylcholinesterase of *Chiostoma jordani* treated with phosphorothionate pesticides. *Ecotoxicology and environmental safety*, 84, 199–206. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.07.008
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr., V. y Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7, 88–95. doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9
- Elnitsky, M. A. y Claussen, D. L. (2006). The effects of temperature and inter-individual variation on the locomotor performance of juvenile turtles. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 176(6), 497–504. doi:10.1007/s00360-006-0071-1
- Gavel, M. J., Young, S. D., Dalton, R. L., Soos, C., McPhee, L., Forbes, M. R. y Robinson, S. A. (2021). Effects of two pesticides on northern leopard frog (*Lithobates pipiens*) stress metrics: Blood cell profiles and corticosterone concentrations. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 235, 105820. doi:10.1016/j.aquatox.2021.105820
- Giddings, J. M., Williams, W. M., Solomon, K. R. y Giesy, J. P. (2014). Risks to aquatic organisms from use of chlorpyrifos in the United States. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 231, 119–162. doi:10.1007/978-3-319-03865-0\_5
- Gordillo, L., Quiroga, L., Ray, M. y Sanabria, E. (2024). Changes in thermal sensitivity of *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae) exposed to sublethal concentrations of different pesticide fractions (Lorsban® 75WG). *Journal of thermal biology*, 120, 103816. doi:10.1016/j.jtherbio.2024.103816
- Gordon, C. J. y Leon, L. R. (2005). Thermal stress and the physiological response to environmental toxicants. *Reviews on environmental health*, 20(4), 235–263. doi:10.1515/reveh.2005.20.4.235
- Green, S. L. (2009). *The Laboratory XENOPUS sp.* Taylor & Francis Group.
- Greenspan, S. E., Bower, D. S., Webb, R. J., Berger, L., Rudd, D., Schwarzkopf, L. y Alford, R. A. (2017). White blood cell profiles in amphibians help to explain disease

- susceptibility following temperature shifts. *Developmental and comparative immunology*, 77, 280–286. doi:10.1016/j.dci.2017.08.018
- Gutiérrez, J. S., Sabat, P., Castañeda, L. E., Contreras, C., Navarrete, L., Peña-Villalobos, I. y Navedo, J. G. (2019). Oxidative status and metabolic profile in a long-lived bird preparing for extreme endurance migration. *Scientific reports*, 9(1), 17616. doi:10.1038/s41598-019-54057-6
- Havird, J. C., Neuwald, J. L., Shah, A. A., Mauro, A., Marshall, C. A. y Ghalambor, C. K. (2020). Distinguishing between active plasticity due to thermal acclimation and passive plasticity due to Q<sub>10</sub> effects: Why methodology matters. *Functional Ecology*, 34, 1015–1028. doi:10.1111/1365-2435.13534
- Hoffmann, M.; Hilton-Taylor, C.; Angulo, A.; Böhm, M.; Brooks, T.M.; Butchart, S.H.; Carpenter, K.E.; Chanson, J.; Collen, B.; Cox, N.A.; et al. (2010). The Impact of Conservation on the Status of the World's Vertebrates. *Science*, 330(6010), 1503–1509. doi:10.1126/science.1194442
- Hooper, M. J., Ankley, G. T., Cristol, D. A., Maryoung, L. A., Noyes, P. D. y Pinkerton, K. E. (2013). Interactions between chemical and climate stressors: a role for mechanistic toxicology in assessing climate change risks. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(1), 32–48. doi:10.1002/etc.2043
- International Union for Conservation of Nature. (2022). *The IUCN red list of threatened species*. Recuperado de: <https://www.iucnredlist.org/>
- Janssens, L. y Stoks, R. (2017). Chlorpyrifos-induced oxidative damage is reduced under warming and predation risk: Explaining antagonistic interactions with a pesticide. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 226, 79–88. doi:10.1016/j.envpol.2017.04.012
- Johnstone, C. P., Reina, R. D. y Lill, A. (2012). Interpreting indices of physiological stress in free-living vertebrates. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 182(7), 861–879. doi:10.1007/s00360-012-0656-9
- Kazmi, S. S., Yu Lin Wang, Y., Cai, Y. y Wang, Z. (2022). Temperature effects in single or combined with chemicals to the aquatic organisms: An overview of thermochemical stress. *Ecological indicators*, 143, 109354. doi:10.1016/j.ecolind.2022.109354
- Kern, P., Cramp, R. L. y Franklin, C. E. (2014). Temperature and UV-B-insensitive performance in tadpoles of the ornate burrowing frog: an ephemeral pond specialist. *The Journal of experimental biology*, 217(Pt 8), 1246–1252. doi:10.1242/jeb.097006

- Kern, P., Cramp, R. L. y Franklin, C. E. (2015). Physiological responses of ectotherms to daily temperature variation. *The Journal of experimental biology*, 218(Pt 19), 3068–3076. doi:10.1242/jeb.123166
- Kiss, A. C. I., de Carvalho, J. E., Navas, C. A. y Gomes, F. R. (2009). Seasonal metabolic changes in a year-round reproductively active subtropical tree-frog (*Hypsiboas prasinus*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 152, 182–188. doi:10.1016/j.cbpa.2008.09.011
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Colussi, C. L., & Martinuzzi, C. S. (2018). Blood biomarkers of common toad *Rhinella arenarum* following chlorpyrifos dermal exposure. *Interdisciplinary toxicology*, 11(2), 148–154. doi:10.2478/intox-2018-0011
- Liendro, N., Ferrari, A., Mardirosian, M., Lascano, C. I. y Venturino, A. (2015). Toxicity of the insecticide chlorpyrifos to the South American toad *Rhinella arenarum* at larval developmental stage. *Environmental toxicology and pharmacology*, 39(2), 525–535. doi:10.1016/j.etap.2014.12.022
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M. E. y Schettino, T. (2013). Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed research international*, 2013, 321213. doi:10.1155/2013/321213
- Litmer, A. R., Freake, M. y Murray, C. M. (2020). Neutrophil: Lymphocyte Ratios as a Measure of Chronic Stress in Populations of the Hellbender (*Cryptobranchus alleganiensis*) across a Habitat Quality Gradient. *Copeia*, 108(2), 403–415. doi:10.1643/CP-19-265
- Liu, Y., Zhang, H., Qiao, C., Lu, X. y Cui, F. (2011). Correlation between carboxylesterase alleles and insecticide resistance in *Culex pipiens* complex from China. *Parasites & vectors*, 4, 236. doi:10.1186/1756-3305-4-236
- Livingstone, D. R., Lemaire, P. Matthews, A., Peters, L., Bucke, D. y Law, R. J. (1993). Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of Dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Marine Pollution Bulletin*, 26(11), 602–606. doi:10.1016/0025-326X(93)90498-9
- Lobos, G. y Jaksic, F. M. (2005). The ongoing invasion of African clawed frogs (*Xenopus laevis*) in Chile: causes of concern. *Biodiversity & Conservation*, 14(2), 429–439. doi:10.1007/s10531-004-6403-0
- Lobos, G., Vidal, M., Correa, C., Labra, A., Díaz-Páez, H., Charrier, A., Rabanal, F., Díaz, S. y Tala, C. (2013). *Anfibios de Chile, un desafío para la conservación*. Ministerio

del Medio Ambiente, Fundación Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y Red Chilena de Herpetología.

- Lockridge, O. y Masson, P. (2000). Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology*, *21*(1-2), 113–126.
- Lorrain-Soligon, L., Bichet, C., Robin, F. y Brischoux, F. (2022). From the Field to the Lab: Physiological and Behavioural Consequences of Environmental Salinity in a Coastal Frog. *Frontiers in physiology*, *13*, 919165. doi:10.3389/fphys.2022.919165
- Louppe, V., Courant, J., Videlier, M. y Herrel, A. (2018). Differences in standard metabolic rate at the range edge versus the center of an expanding invasive population of *Xenopus laevis* in the West of France. *Journal of Zoology*, *305*(3), 163–172. doi:10.1111/jzo.12548
- Marchand, A., Porcher, J. M., Turies, C., Chadili, E., Palluel, O., Baudoin, P., Betoulle, S. y Bado-Nilles, A. (2017). Evaluation of chlorpyrifos effects, alone and combined with lipopolysaccharide stress, on DNA integrity and immune responses of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, *145*, 333–339. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.07.025
- Marchetti, J. R., Beard, K. H., Virgin, E. E., Lewis, E. L., Hess, S. C., Ki, K. C., Sermersheim, L. O., Furtado, A. P. y French, S. S. (2023). Invasive frogs show persistent physiological differences to elevation and acclimate to colder temperatures. *Journal of thermal biology*, *114*, 103590. doi:10.1016/j.jtherbio.2023.103590
- McNamara, S., Wlizla, M. y Horb, M. E. (2018). Husbandry, General Care, and Transportation of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1865*, 1–17. doi:10.1007/978-1-4939-8784-9\_1
- Measey, G. J., Rödder, D., Green, S. L., Kobayashi, R., Lillo, F., Lobos, G., Rebelo, R. y Thirion, J. M. (2012). Ongoing invasions of the African clawed frog, *Xenopus laevis*: a global review. *Biol. Invasions*, *14*, 2255–2270. doi:10.1007/s10530-012-0227-8
- Mestre, A. P., Amavet, P. S., Vanzetti, A. I., Moleón, M. S., Parachú Marcó, M. V., Poletta, G. L. y Siroski, P. A. (2019). Effects of cypermethrin (pyrethroid), glyphosate and chlorpyrifos (organophosphorus) on the endocrine and immune system of *Salvator merianae* (Argentine tegu). *Ecotoxicology and environmental safety*, *169*, 61–67. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.10.057
- Mora, M., Pons, D. J., Peñafiel-Ricaurte, A., Alvarado-Rybak, M., Lebuy, S. y Soto-Azat, C. (2019). High abundance of invasive African clawed frog *Xenopus laevis* in

- Chile: Challenges for their control and updated invasive distribution. *Management of Biological Invasions*, 10(2), 377–388. doi:10.3391/mbi.2019.10.2.11
- Muff, S., Nilsen, E. B., O'Hara, R. B., & Nater, C. R. (2022). Rewriting results sections in the language of evidence. *Trends in ecology & evolution*, 37(3), 203–210. doi:10.1016/j.tree.2021.10.009
- Narváez, C., Ríos, J. M., Píriz, G., Sanchez-Hernandez, J. C. y Sabat, P. (2016). Subchronic exposure to chlorpyrifos affects energy expenditure and detoxification capacity in juvenile Japanese quails. *Chemosphere*, 144, 775–784. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.09.060
- Narváez, C., Sabat, P. y Sanchez-Hernandez, J. C. (2022). Synergistic effects of pesticides and environmental variables on earthworm standard metabolic rate. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 260, 109404. doi:10.1016/j.cbpc.2022.109404
- Niehaus, A. C., Wilson, R. S., Seebacher, F. y Franklin, C. E. (2011). Striped marsh frog (*Limnodynastes peronii*) tadpoles do not acclimate metabolic performance to thermal variability. *The Journal of experimental biology*, 214(Pt 11), 1965–1970. doi:10.1242/jeb.054478
- Noyes, P. D., McElwee, M. K., Miller, H. D., Clark, B. W., Van Tiem, L. A., Walcott, K. C., Erwin, K. N. y Levin, E. D. (2009). The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. *Environment international*, 35(6), 971–986. doi:10.1016/j.envint.2009.02.006
- Ohkawa, H., Ohishi, N. y Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351–358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3
- Paaijmans, K. P., Heinig, R. L., Seliga, R. A., Blanford, J. I., Blanford, S., Murdock, C. C. y Thomas, M. B. (2013). Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. *Global change biology*, 19(8), 2373–2380. doi:10.1111/gcb.12240
- Patra, R. W., Chapman, J. C., Lim, R. P., Gehrke, P. C. y Sunderam, R. M. (2015). Interactions between water temperature and contaminant toxicity to freshwater fish. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(8), 1809–1817. doi:10.1002/etc.2990
- Peña-Villalobos, I., Narváez, C. y Sabat, P. (2016). Metabolic cost of osmoregulation in a hypertonic environment in the invasive African clawed frog *Xenopus laevis*. *Biology open*, 5(7), 955–961. doi:10.1242/bio.016543
- Philippe, C., Thoré, E. S. J., Verbesselt, S., Grégoir, A. F., Brendonck, L. y Pinceel, T. (2022). Combined effects of global warming and chlorpyrifos exposure on the

- annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 248, 114290. doi:10.1016/j.ecoenv.2022.114290
- Phillips, T., Summerfelt, R. y Atchison, G. (2002). Environmental, Biological, and Methodological Factors Affecting Cholinesterase Activity in Walleye (*Stizostedion vitreum*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43(1), 75–80. doi:10.1007/s00244-002-1134-2
- Polazzo, F., Roth, S. K., Hermann, M., Mangold-Döring, A., Rico, A., Sobek, A., Van den Brink, P. J. y Jackson, M. C. (2022). Combined effects of heatwaves and micropollutants on freshwater ecosystems: Towards an integrated assessment of extreme events in multiple stressors research. *Global change biology*, 28(4), 1248–1267. doi:10.1111/gcb.15971
- Quiroga, L. B., Gordillo, L. F., Aragon-Traverso, J. H., Iribas, F. J. y Sanabria, E. A. (2024). Thermal sensitivity of *Rhinella arenarum* tadpole at low concentrations of dimethoate pesticides. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 279, 109884. doi:10.1016/j.cbpc.2024.109884
- Quiroga, L. B., Sanabria, E. A., Fornés, M. W., Bustos, D. A. y Tejedó, M. (2019). Sublethal concentrations of chlorpyrifos induce changes in the thermal sensitivity and tolerance of anuran tadpoles in the toad *Rhinella arenarum*? *Chemosphere*, 219, 671–677. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.12.059
- Raffel, T. R., Rohr, J. R., Kiesecker, J. M. y Hudson, P. J. (2006). Negative effects of changing temperature on amphibian immunity under field conditions. *Functional Ecology*, 20(5), 819–828. doi:10.1111/j.1365-2435.2006.01159.x
- Reed, B. (2005). *Guidance on the housing and care of the African clawed frog Xenopus laevis*. Research Animals Department - RSPCA.
- Romanova, E. B. y Romanova, O. Yu. (2003). Peculiarities of Leukocytic Formula of Peripheral Blood of Green Frogs under Conditions of Anthropogenic Load. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 39, 480–484. doi:10.1023/B:JOEY.0000010246.27310.85
- Roussel, D., Salin, K., Dumet, A., Romestaing, C., Rey, B. y Voituron, Y. (2015). Oxidative phosphorylation efficiency, proton conductance and reactive oxygen species production of liver mitochondria correlates with body mass in frogs. *The Journal of experimental biology*, 218(20), 3222–3228. doi:10.1242/jeb.126086
- Ruiz, G., Rosenmann, M. y Veloso, A. (1989). Altitudinal distribution and blood values in the toad, *Bufo spinulosus* Wiegmann. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology*, 94(4), 643–646. doi:10.1016/0300-9629(89)90609-9
- Rutkoski, C. F., Macagnan, N., Folador, A., Skovronski, V. J., do Amaral, A. M. B., Leitemperger, J., Costa, M. D., Hartmann, P. A., Müller, C., Loro, V. L. y Hartmann,

- M. T. (2020). Morphological and biochemical traits and mortality in *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles exposed to the insecticide chlorpyrifos. *Chemosphere*, 250, 126162. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126162
- Sabat, P., Riveros, J. M. y López-Pinto, C. (2005). Phenotypic flexibility in the intestinal enzymes of the African clawed frog *Xenopus laevis*. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 140(1), 135–139. doi:10.1016/j.cbpb.2004.11.010
- Salinas, Z. A., Babini, M. S., Bionda, C., Martino, A. L. y Lajmanovich, C. R. (2024). Agroecosystems under conventional and organic management: hematological analysis of anuran for environmental health assessment. *Environmental Advances*, 15, 100508. doi:10.1016/j.envadv.2024.100508
- Sanchez-Hernandez, J. C., Mazzia, C., Capowiez, Y. y Rault, M. (2009). Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco)toxicological implications. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 150(4), 503–511. doi:10.1016/j.cbpc.2009.07.009
- Sanchez-Hernandez, J. C., Narváez, C., Cares, X. A., Sabat, P. y Naidu, R. (2023). Predicting the bioremediation potential of earthworms of different ecotypes through a multi-biomarker approach. *The Science of the total environment*, 862, 160547. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.160547
- Sanchez-Hernandez, J. C. y Wheelock, C. E. (2009). Tissue distribution, isozyme abundance and sensitivity to chlorpyrifos-oxon of carboxylesterases in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environmental pollution*, 157(1), 264–272. doi:10.1016/j.envpol.2008.06.041
- Sandoval-Herrera, N., Mena, F., Espinoza, M. y Romero, A. (2019). Neurotoxicity of organophosphate pesticides could reduce the ability of fish to escape predation under low doses of exposure. *Scientific reports*, 9(1), 10530. doi:10.1038/s41598-019-46804-6
- Shapira, M., Seidman, S., Livni, N. y Soreq, H. (1998). In vivo and in vitro resistance to multiple anticholinesterases in *Xenopus laevis* tadpoles. *Toxicology letters*, 102-103, 205–209. doi:10.1016/s0378-4274(98)00308-7
- Servicio Agrícola y Ganadero. (2019). Declaración de ventas de plaguicidas de uso agrícola año 2019. Recuperado de: [https://www.sag.cl/sites/default/files/declaracion\\_de\\_ventas\\_de\\_plaguicidas\\_an\\_o\\_2019\\_0.pdf](https://www.sag.cl/sites/default/files/declaracion_de_ventas_de_plaguicidas_an_o_2019_0.pdf)
- Sih, A., Bell, A. M. y Kerby, J. L. (2004). Two stressors are far deadlier than one. *Trends in ecology & evolution*, 19(6), 274–276. doi:10.1016/j.tree.2004.02.010

- Silvestre F. (2020). Signaling pathways of oxidative stress in aquatic organisms exposed to xenobiotics. *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological and integrative physiology*, 333(6), 436–448. doi:10.1002/jez.2356
- Slein, M. A., Bernhardt, J. R., O'Connor, M. I. y Fey, S. B. (2023). Effects of thermal fluctuations on biological processes: a meta-analysis of experiments manipulating thermal variability. *Proceedings. Biological sciences*, 290(1992), 20222225. doi:10.1098/rspb.2022.2225
- Sparling, D. W. y Fellers, G. M. (2009). Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environmental toxicology and chemistry*, 28(8), 1696–1703. doi:10.1897/08-336.1
- Stefanidou, M., Athanasis, S. y Spiliopoulou, H. (2009). Butyrylcholinesterase: biomarker for exposure to organophosphorus insecticides. *Internal medicine journal*, 39(1), 57–60. doi:10.1111/j.1445-5994.2008.01779.x
- Steyermark, A. C., Miamen, A. G., Feghahati, H. S. y Lewno, A. W. (2005). Physiological and morphological correlates of among-individual variation in standard metabolic rate in the leopard frog *Rana pipiens*. *The Journal of experimental biology*, 208(Pt 6), 1201–1208. doi:10.1242/jeb.01492
- Terrell, K. A., Quintero, R. P., Murray, S., Kleopfer, J. D., Murphy, J. B., Evans, M. J., Nissen, B. D. y Gratwicke, B. (2013). Cryptic impacts of temperature variability on amphibian immune function. *The Journal of experimental biology*, 216(Pt 22), 4204–4211. doi:10.1242/jeb.089896
- Terry, A. V. Jr (2012). Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacology & therapeutics*, 134(3), 355–365. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.03.001
- Thompson, H.M. (1999). Esterases as Markers of Exposure to Organophosphates and Carbamates. *Ecotoxicology*, 8, 369–384. doi:10.1023/A:1008934505370
- Thosapornvichai, T., Huangteerakul, C., Jensen, A. N. y Jensen, L. T. (2022). Mitochondrial dysfunction from malathion and chlorpyrifos exposure is associated with degeneration of GABAergic neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 96, 104000. doi:10.1016/j.etap.2022.104000
- Ural M. Ş. (2013). Chlorpyrifos-induced changes in oxidant/antioxidant status and haematological parameters of *Cyprinus carpio carpio*: ameliorative effect of lycopene. *Chemosphere*, 90(7), 2059–2064. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.12.006
- Vasseur, D. A., DeLong, J. P., Gilbert, B., Greig, H. S., Harley, C. D., McCann, K. S., Savage, V., Tunney, T. D. y O'Connor, M. I. (2014). Increased temperature

- variation poses a greater risk to species than climate warming. *Proceedings. Biological sciences*, 281(1779), 20132612. doi:10.1098/rspb.2013.2612
- Verheyen, J., Cuypers, K. y Stoks, R. (2023). Adverse effects of the pesticide chlorpyrifos on the physiology of a damselfly only occur at the cold and hot extremes of a temperature gradient. *Environmental pollution*, 326, 121438. doi:10.1016/j.envpol.2023.121438
- Verheyen, J., Delnat, V. y Theys, C. (2022). Daily temperature fluctuations can magnify the toxicity of pesticides. *Current opinion in insect science*, 51, 100919. doi:10.1016/j.cois.2022.100919
- Verheyen, J. y Stoks, R. (2019). Current and future daily temperature fluctuations make a pesticide more toxic: Contrasting effects on life history and physiology. *Environmental pollution*, 248, 209–218. doi:10.1016/j.envpol.2019.02.022
- Wagener, C., Kruger, N. y Measey, J. (2021). Progeny of *Xenopus laevis* from altitudinal extremes display adaptive physiological performance. *The Journal of experimental biology*, 224(7), jeb233031. doi:10.1242/jeb.233031
- Watson, F. L., Schmidt, H., Turman, Z. K., Hole, N., Garcia, H., Gregg, J., Tilghman, J. y Fradinger, E. A. (2014). Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and decrease locomotor activity and heart rate in *Danio rerio* and *Xenopus laevis*. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(6), 1337–1345. doi:10.1002/etc.2559
- Weis, J. S. y Candelmo, A. (2012). Pollutants and fish predator/prey behavior: A review of laboratory and field approaches. *Current Zoology*, 58(1), 9–20. doi:10.1093/czoolo/58.1.9
- Wheelock, C. E., Eder, K. J., Werner, I., Huang, H., Jones, P. D., Brammell, B. F., Elskus, A. A. y Hammock. B. D. (2005). Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. *Aquat. Toxicol.*, 74(2), 172–192. doi:10.1016/j.aquatox.2005.05.009
- Willming, M. M., Qin, G. y Maul, J. D. (2013). Effects of environmentally realistic daily temperature variation on pesticide toxicity to aquatic invertebrates. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(12), 2738–2745. doi:10.1002/etc.2354
- Willming, M. M. y Maul, J. D. (2016). Direct and indirect toxicity of the fungicide pyraclostrobin to *Hyalella azteca* and effects on leaf processing under realistic daily temperature regimes. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 211, 435–442. doi:10.1016/j.envpol.2015.11.029

- Withers P. C. (1977). Measurement of  $VO_2$ ,  $VCO_2$ , and evaporative water loss with a flow-through mask. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*, 42(1), 120–123. doi:10.1152/jappl.1977.42.1.120
- Young, V. K. y Gifford, M. E. (2013). Limited capacity for acclimation of thermal physiology in a salamander, *Desmognathus brimleyorum*. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 183(3), 409–418. doi:10.1007/s00360-012-0717-0
- Zhevel, Z., Minchev, D. y Angelov, M. (2024). Blood parameters of adult marsh frogs *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) in rice paddies subjected to intense agrochemical use. *Environmental science and pollution research international*, 31(1), 1368–1381. doi:10.1007/s11356-023-30974-y

## ANEXOS

**Tabla S1.** Resultados del ANOVA (g.l. = 1, 16) factorial para los parámetros corporales, metabólicos, respuesta locomotora, estado oxidativo y actividad enzimática de las esterasas en *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. Los valores de SMR (16 y 30°) son resultados de un ANCOVA (g.l. = 1, 15) con la masa como covariable. T: tratamiento térmico y P: exposición al pesticida.

Variables	Factores					
	Variabilidad térmica		Pesticida		T x P	
	F	p	F	p	F	p
<b>Mb</b> (g)	0,119	0,548	0,204	0,099	1,001	0,674
<b>SVL</b> (mm)	0,448	0,513	0,385	0,543	1,115	0,307
<b>RE a 16°</b> (s <sup>-1</sup> )	1,938	0,183	6,444	<b>0,022</b>	3,971	0,064
<b>RE a 23°</b> (s <sup>-1</sup> )	5,669	<b>0,030</b>	70,83	<b>&lt;0,001</b>	4,170	0,058
<b>RE a 30°</b> (s <sup>-1</sup> )	0,357	0,558	1,836	0,194	0,046	0,832
<b>SMR a 16°</b> (mL O <sub>2</sub> /h)	0,116	0,739	0,325	0,577	3,657	0,075
<b>SMR a 30°</b> (mL O <sub>2</sub> /h)	0,01	0,939	6,85	<b>0,019</b>	0,08	0,775
<b>Q<sub>10</sub></b>	0,27	0,611	6,97	<b>0,018</b>	10,48	<b>0,005</b>
<b>TAC</b> (mM UE Trolox)	4,26	0,056	3,43	0,083	4,58	<b>0,048</b>
<b>TBARS</b> (MDA mM)	3,42	0,083	0,16	0,693	32,26	<b>&lt;0,001</b>
<b>TBARS/TAC</b>	0,32	0,577	2,91	0,108	19,54	<b>&lt;0,001</b>
<b>AChE</b> (μmol/min mg proteína)	2,846	0,111	0,506	0,487	0,807	0,382
<b>BChE</b> (μmol/min mg proteína)	0,77	0,394	15,48	<b>0,001</b>	0,44	0,515
<b>CbE 1NA</b> (μmol/min mg proteína)	0,902	0,356	3,298	0,088	1,384	0,257
<b>CbE 4-NPA</b> (μmol/min mg proteína)	0,042	0,839	0,397	0,537	4,049	0,061

**Tabla S2.** Resultados del ANOVA (g.l. = 1, 16) factorial para el perfil leucocitario en *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. T: tratamiento térmico y P: exposición al pesticida.

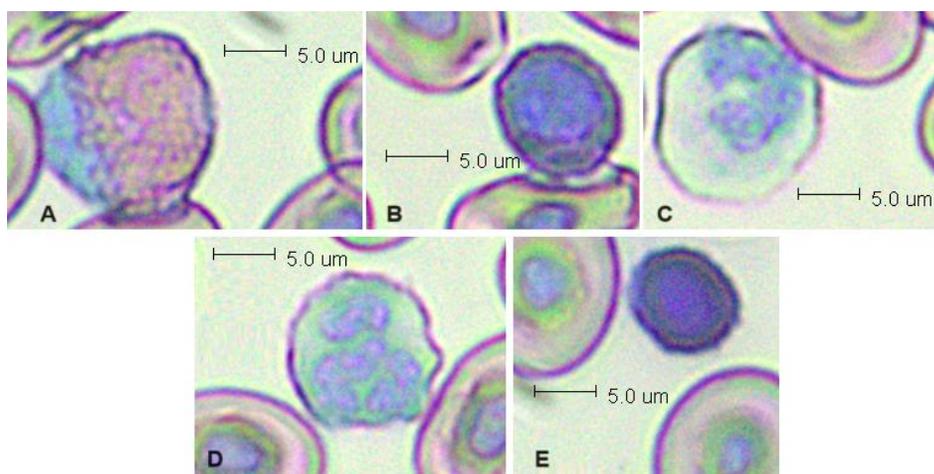
Perfil Leucocitario	Factores					
	Variabilidad térmica		Pesticida		T x P	
	F	p	F	p	F	p
<b>Eosinófilos</b> (%)	0,316	0,582	0,161	0,693	2,329	0,147
<b>Basófilos</b> (%)	0,004	0,951	4,861	<b>0,042</b>	0,321	0,579
<b>Monocitos</b> (%)	0,969	0,339	0,061	0,809	0,242	0,629
<b>Neutrófilos</b> (%)	14,67	<b>0,001</b>	37,94	<b>&lt; 0,001</b>	1,27	0,276
<b>Linfocitos</b> (%)	9,894	<b>0,006</b>	11,67	<b>0,001</b>	0,003	0,957
<b>N/L</b>	10,32	<b>0,005</b>	19,37	<b>&lt;0,001</b>	0,213	0,651

**Tabla S3.** Medidas de resumen (media  $\pm$  DE) del perfil leucocitario de *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. TC: temperatura constante, TV: temperatura variable, NP: no expuesto al pesticida y P: expuesto al pesticida. Superíndices muestran diferencias entre grupos mediante la prueba de Fisher *a posteriori*.

Tratamientos	TC/NP	TC/P	TV/NP	TV/P
n	5	5	5	5
<b>Eosinófilos</b> (%)	3,6 $\pm$ 3,36	1,2 $\pm$ 1,64	2,4 $\pm$ 1,82	3,8 $\pm$ 3,7
<b>Basófilos</b> (%)	5,8 $\pm$ 4,44	1,4 $\pm$ 0,89	4,8 $\pm$ 5,26	2,2 $\pm$ 1,48
<b>Monocitos</b> (%)	1,2 $\pm$ 1,64	1,0 $\pm$ 1,22	1,6 $\pm$ 1,34	2,2 $\pm$ 2,68
<b>Neutrófilos</b> (%)	19 $\pm$ 5,83 <sup>a</sup>	38,4 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>	32,2 $\pm$ 3,19 <sup>c</sup>	45,6 $\pm$ 8,14 <sup>b</sup>
<b>Linfocitos</b> (%)	70,4 $\pm$ 9,69 <sup>a</sup>	58 $\pm$ 5,7 <sup>b</sup>	59 $\pm$ 8,49 <sup>b</sup>	46,2 $\pm$ 8,58 <sup>b</sup>

**Tabla S4.** Prueba de comparaciones múltiples *a posteriori* de Fisher entre cada grupo experimental para las puntuaciones de los componentes principales en *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. T: tratamiento térmico y P: exposición al pesticida.

Comparación				Componentes principales	
Variabilidad térmica	Pesticida	Variabilidad térmica	Pesticida	PC 1	PC 2
TC	NP	-	TC	<b>0,008</b>	0,238
		-	TV	<b>0,006</b>	0,397
		-	TV	<b>0,035</b>	<b>0,026</b>
	P	-	TV	0,883	0,052
		-	TV	0,460	0,239
TV	NP	-	TC	0,378	<b>0,004</b>



**Figura S1.** Leucocitos identificados bajo microscopía óptica mediante tinción May-Grunwald Giemsa en frotis sanguíneos de *X. laevis* expuestos a tratamientos agudos con variaciones contrastantes de temperatura y clorpirifós. Eosinófilo (A), Basófilo (B), Monocito (C), Neutrófilo (D) y Linfocito (E).