

Tesis de Posgrado

Equilibrio hidromineral de larvas de Bufo arenarum : respuestas compensatorias al "stress" osmótico y al cadmio

Ferrari, Lucrecia

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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

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

Cita tipo APA:

Ferrari, Lucrecia. (1995). Equilibrio hidromineral de larvas de Bufo arenarum : respuestas compensatorias al "stress" osmótico y al cadmio. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2744_Ferrari.pdf

Cita tipo Chicago:

Ferrari, Lucrecia. "Equilibrio hidromineral de larvas de Bufo arenarum : respuestas compensatorias al "stress" osmótico y al cadmio". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2744_Ferrari.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas

EQUILIBRIO HIDROMINERAL DE LARVAS DE
Bufo arenarum:
RESPUESTAS COMPENSATORIAS AL "STRESS"
OSMOTICO Y AL CADMIO

AUTORA: Lic. LUCRECIA FERRARI

DIRECTOR: Prof. Dr. ALFREDO SALIBIAN

LABORATORIO DEL PROGRAMA DE ECOFISIOLOGIA APLICADA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LUJAN, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS

A Verónica y Nahuel

INDICE TEMATICO

página

-Agradecimientos _____	1
- Abreviaturas _____	2
- Resumen _____	3
- Abstract _____	5
- Resumé _____	7

CAPITULO I LINEAMIENTOS GENERALES

- HIPOTESIS Y OBJETIVOS EXPERIMENTALES _____	9
--	---

INTRODUCCION GENERAL

I-a.1)-Consideraciones generales acerca del medio acuático como factor estresante: selección de solutos osmóticamente activos _____	11
I-a.2)-Problemas de la osmoregulación _____	12
I-a.3)-La osmoregulación en los anfibios _____	13
I-a.4)-Modalidad de análisis para el estudio de balance hidromineral en anfibios _____	16
I-a.5)-Consideraciones acerca del cadmio como agente contaminante: su acción sobre los organismos _____	17
I-a.6)-Efectos del cadmio en la homeostasis de animales acuáticos _____	19

MATERIALES Y METODOS

página

I-b.1) Obtención y mantenimiento de los animales de experimentación _____	21
I-b.2) Experiencias para la evaluación cuantitativa del balance hídrico en larvas expuestas a diferentes osmolaridades _____	22
I-b.2.a) Diseño experimental _____	22
I-b.2.b) Parámetros evaluados _____	22
I-b.2.c) Preparación de soluciones _____	24
I-b.2.d) Condiciones experimentales _____	24
I-b.2.e) Procesamiento estadístico _____	25
I-b.3) Experiencias para la determinación de concentración letal media (CL50) _____	27
I-b.3.a) Exposición a elevadas osmolaridades electrolíticas y no electrolíticas en presencia y ausencia de «stress» por densidad de organismos _____	27
I-b.3.b) Experiencias para determinar la concentración letal media (CL50) de cadmio para larvas jóvenes y prometamórficas a dos temperaturas de ensayo _____	28
I-b.3.c) Procesamiento Estadístico _____	29
I-b.4) Experiencias para evaluar el efectos del cadmio sobre el balance hídrico _____	29
I-b.4.a) Condiciones generales de experimentación _____	29
I-b.4.b) Efecto protector de los iones sobre la toxicidad del cadmio _____	30
I-b.4.b.1) Procesamiento estadístico _____	30
I-b.4.c) Cambios en la epidermis de larvas incubadas en soluciones de diferente composición química conteniendo cadmio _____	30
I-b.4.d) Contenidos catiónicos intralarvales _____	31
I-b.a.d.1) Procesamiento estadístico _____	32

CAPITULO II

RESULTADOS: PRIMERA PARTE.

EVALUACION CUANTITATIVA DEL BALANCE HIDROMINERAL EN LARVAS JOVENES DE Bufo arenarum EXPUESTAS A SOLUCIONES DE DIFERENTE OSMOLARIDAD Y COMPOSICION QUIMICA:

	página
II-a. Evaluación de la supervivencia de larvas jóvenes de <u>Bufo arenarum</u> en soluciones de elevada osmolaridad, electrolítica (ClNa) y no electrolítica (manitol) en presencia y ausencia de «stress» provocado por la densidad de organismos (CL50) _____	33
II-b. Exposición a soluciones no electrolíticas (manitol) de 0 a 270 mOsm en condiciones agudas _____	40
II.b.1) Análisis de regresión para cada parámetro considerado _____	40
II.b.2) Análisis discriminante múltiple _____	48
a) Análisis discriminante para cada solución ensayada _____	48
b) Análisis discriminante para cada uno de los tiempo muestreados ____	51
II-c. Exposición a soluciones electrolíticas (ClNa) de 70 a 270 mOsm en condiciones agudas _____	55
II-c.1) Análisis de regresión para cada parámetro considerado _____	56
II-c.2) Análisis discriminante múltiple _____	63
a) Análisis discriminante para cada una de las soluciones ensayadas ____	63
b) Análisis discriminante para cada uno de los tiempo muestreados ____	65
II-d. Exposición de larvas jóvenes a soluciones electrolíticas (ClNa) y no electrolíticas (D-manitol) de osmolaridad creciente en condiciones de aclimatación _____	69

II-d.1) Análisis de regresión para cada parámetro considerado _____	69
II-d.2) Análisis discriminante múltiple _____	79
a) Análisis discriminante para cada una de las soluciones _____	79
b) Análisis discriminante para cada tiempo muestreado, entre las distintas soluciones _____	81
II-e. Exposición a soluciones de diferente salinidad de 0 a 30 mOsm en condiciones de exposición prolongada _____	84
II-e.1) Análisis de regresión para cada parametro considerado _____	84
II-e.2) Análisis discriminante múltiple _____	92
a) Análisis discriminante para cada una de las soluciones ensayadas ____	92
b) Análisis discriminante para cada uno de los tiempos muestreados ____	95

CAPITULO III

RESULTADOS: SEGUNDA PARTE

EFFECTO DEL CADMIO SOBRE LA SOBREVIVENCIA Y EL BALANCE HIDRICO DE LARVAS DE Bufo arenarum

III-a. Concentración letal media (CL50) de cadmio en larvas jóvenes y prometamórficas de <u>Bufo arenarum</u> : Efecto de la edad larval y de la temperatura de incubación _____	98
III-b. Evaluación cuantitativa del efecto de una concentración subletal de cadmio sobre el balance hídrico en larvas jóvenes de <u>Bufo arenarum</u> bajo condiciones de «stress» osmótico: Efecto protector de los iones _____	105
a) Análisis discriminante para cada una de las soluciones ensayadas	
b) Análisis discriminante múltiple entre las distintas soluciones, para cada tiempo muestreado _____	111

III-c. Efectos del cadmio sobre la epidermis de larvas de <u>Bufo arenarum</u> expuestas a soluciones de diferente composición química y osmolaridad _____	114
III-d. Evaluación de los contenidos catiónicos intralarvales de <u>Bufo arenarum</u> expuestos a soluciones de diferente osmolaridad y composición química en presencia y ausencia de cadmio: experimentos preliminares _____	126

CAPITULO IV DISCUSION

PRIMERA PARTE: BALANCE HIDROMINERAL DE LARVAS DE <u>Bufo arenarum</u> _____	132
IV-a) Evaluación de la supervivencia de larvas jóvenes en condiciones de «stress» osmótico a dos densidades diferentes _____	132
IV-b) Evaluación cuantitativa del balance hidromineral _____	133
SEGUNDA PARTE: IMPACTO DEL CADMIO SOBRE LA SUPERVIVENCIA Y EL BALANCE HIDRICO EN LARVAS DE <u>Bufo arenarum</u> _____	141

CAPITULO V

CONCLUSIONES _____	148
BIBLIOGRAFIA CITADA _____	151
Comunicaciones de los resultados presentados en esta tesis _____	161

INDICE DE TABLAS

(Se indican los títulos abreviados).

página

- Tabla 1: Valores de CL50 (mOsm) de manitol en larvas jóvenes de <u>Bufoarenarum</u> _____	36
- Tabla 2: Valores de CL50 (mOsm) de ClNa en larvas jóvenes de <u>Bufo arenarum</u> _____	38
- Tabla 3: Valores de x, ds, coef. var., valor mín. y máx. para cada parámetro analizado en larvas expuestas en forma aguda de manitol _____	40
- Tabla 4: Ecuaciones de regresión múltiple para PH, PS, CA y H en larvas expuestas en forma aguda de manitol _____	41
- Tabla 5: Respuesta integrada de las larvas en función del tiempo a la exposición aguda de manitol: análisis discriminante múltiple _____	49
- Tabla 6: Respuesta integrada de las larvas expuestas a diferentes concentraciones de manitol para cada tiempo muestreado: análisis discriminante múltiple _____	52
- Tabla 7: Valores de x, ds, coef. var., valor mín. y máx. para cada parámetro analizado en larvas expuestas en forma aguda a ClNa _____	55
- Tabla 8: Ecuaciones de regresión múltiple para PH, PS, CA y H en larvas expuestas en forma aguda a ClNa _____	56
- Tabla 9: Respuesta integrada de las larvas en función del tiempo a la exposición aguda de ClNa: análisis discriminante múltiple _____	63
- Tabla 10: Respuesta integrada de las larvas expuestas a diferentes concentraciones de ClNa para cada tiempo muestreado: análisis discriminante múltiple _____	66
- Tabla 11: Valores de PH, PS, CA y H en larvas expuestas a MAN y ClNa en condiciones de aclimatación _____	70
- Tabla 12: Ecuaciones de regresión lineal para PH,PS, CA y H y resultados del ANCOVA de larvas expuestas a MAN y ClNa en condiciones de aclimatación _____	72
- Tabla 13: Resultados correspondientes al ANOVA para PH, PS, CA y H ente y dentro de los distintos tratamientos en larvas expuestas a MAN y ClNa en condiciones de aclimatación _____	73
- Tabla 14: Respuesta integrada de las larvas en función del tiempo expuestas MAN y ClNa en condiciones de aclimatación _____	81

- Tabla 15: Respuesta integrada de las larvas expuestas a MAN y ClNa en condiciones de aclimatación en cada tratamiento _____	82
- Tabla 16: Valores de $\bar{x}$, ds, coef.var., valor min y máx. para cada parámetro analizado en larvas expuestas a soluciones de diferente salinidad: exposición prolongada _____	84
- Tabla 17: Ecuaciones de regresión múltiple para PH, PS, CA y H en larvas expuestas a soluciones de diferente salinidad: exposición prolongada _____	85
- Tabla 18: Respuesta integrada de larvas en función del tiempo a la exposición prolongada a soluciones de diferente salinidad: análisis discriminante múltiple _____	93
- Tabla 19: Respuesta integrada de las larvas expuestas a diferentes salinidades en forma prolongada, para cada tiempo muestreado: análisis discriminante múltiple _____	97
- Tabla 20: Valores de CI50 de Cd en larvas jóvenes incubadas a 20 °C _____	101
- Tabla 21: Valores de CI50 de Cd en larvas jóvenes incubadas a 25 °C _____	102
- Tabla 22: Valores de CI50 de Cd en larvas prometamórficas incubadas a 20 °C _____	103
- Tabla 23: Valores de CI50 de Cd en larvas prometamórficas incubadas a 25 °C _____	103
- Tabla 24: Rango de valores medios de PH, PS, CA y H para larvas en soluciones de diferente composición química en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd _____	108
- Tabla 25: Respuesta integrada de las larvas en función del tiempo a la exposición a soluciones de diferente composición química en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd _____	109
- Tabla 26: Respuesta integrada de las larvas para cada tiempo muestreado cuando las larvas son expuestas a soluciones de diferente composición química en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd _____	112
- Tabla 27: Contenidos intralarvales de cationes en larvas expuestas a ADA 5 mOsm en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd _____	126
- Tabla 28: Contenidos intralarvales de cationes en larvas expuestas a ADA 30 mOsm en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd _____	127
- Tabla 29: Contenidos intralarvales de cationes en larvas expuestas a ClNa 141 mOsm en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd _____	128
- Tabla 30: Contenidos de cationes intralarvales en larvas expuestas a MAN 141 mOsm y ADE en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd _____	129

INDICE DE FIGURAS

(se indican los titulos abreviados)

página

-Figura 1: Diseño experimental: diagrama de flujo _____	23
-Figura 2: CL50 de MAN para larvas jóvenes a una densidad de 1 larva/ 4 ml solución ____	34
-Figura 3: CL50 de MAN para larvas jóvenes a una densidad de 1 larva/ 20 ml solución ____	34
-Figura 4: Porcentaje de supervivencia en función del tiempo para larvas expuestas a distintas osmolaridades de manitol a dos densidades de ensayo _____	35
-Figura 5: CL50 de ClNa para larvas jóvenes a una densidad de 1 larva/ 4 ml solución ____	37
-Figura 6: CL50 de ClNa para larvas jóvenes a una densidad de 1 larva/ 20 ml solución ____	37
-Figura 7: Porcentaje de supervivencia en función del tiempo para larvas expuestas a distintas osmolaridades de ClNa a las dos densidades de ensayo _____	38
-Figura 8: CL50 de ClNa y MAN para larvas jóvenes en dos condiciones de ensayo _____	39
-Figura 9: Valores medios experimentales y esperados de PH en larvas a diferentes osmolaridades de manitol _____	44
-Figura 10: Valores medios experimentales y esperados de PS en larvas expuestas a diferentes osmolaridades de manitol _____	45
-Figura 11: Valores medios experimentales y esperados de CA en larvas expuestas a diferentes osmolaridades de manitol _____	46
-Figura 12: Valores medios experimentales y esperados de H en larvas expuestas a diferentes osmolaridad de manitol _____	47
-Figura 13: Análisis discriminante múltiple para cada una de las soluciones de manitol ____	50
-Figura 14: Análisis discriminante múltiple para cada uno de los tiempos muestreados en el ensayo de larvas expuestas a manitol _____	53
-Figura 15: Valores medios experimentales y esperados de PH en larvas expuestas a diferentes osmolaridades de ClNa _____	57
-Figura 16: Valores medios experimentales y esperados de PS en larvas expuestas a diferentes osmolaridad de ClNa _____	59
-Figura 17: Valores medios experimentales y esperados de CA en larvas expuestas a diferentes osmolaridades de ClNa _____	61
-Figura 18: Valores medios experimentales y esperados de H en larvas expuestas a diferentes osmolaridades de ClNa _____	62

	página
-Figura 19: Análisis discriminante múltiple para cada una de las soluciones de ClNa _____	64
-Figura 20: Análisis discriminante múltiple para cada uno de los tiempos muestreados en el ensayo de larvas expuestas a ClNa _____	67
-Figura 21: Recta de regresión para PH en lavas expuesta a soluciones de diferente osmolaridad electrolítica y no electrolítica en condiciones de aclimatación _____	75
-Figura 22: Recta de regresión para PS en lavas expuesta a soluciones de diferente osmolaridad electrolítica y no electrolítica en condiciones de aclimatación _____	76
-Figura 23: Recta de regresión para CA en lavas expuesta a soluciones de diferente osmolaridad electrolítica y no electrolítica en condiciones de aclimatación _____	77
-Figura 24: Recta de regresión para H en lavas expuesta a soluciones de diferente osmolaridad electrolítica y no electrolítica en condiciones de aclimatación _____	78
-Figura 25: Análisis discriminante múltiple para las distintas soluciones (electrolíticas y no electrolíticas) en condiciones de aclimatación _____	80
-Figura 26: Análisis discriminante múltiple para los distintos tiempos muestreados cuando las larvas son expuestas a soluciones electrolíticas y no electrolíticas en condiciones de aclimatación _____	83
-Figura 27: Valores medios experimentales y esperados de PH en larvas expuestas en forma prolongada a soluciones de diferente osmolaridad _____	87
-Figura 28: Valores medios experimentales y esperados de PS en larvas expuestas en forma prolongada a soluciones de diferente osmolaridad _____	88
-Figura 29: Valores medios experimentales y esperados de CA en larvas expuestas en forma prolongada a soluciones de diferente osmolaridad _____	90
-Figura 30: Valores medios experimentales y esperados de H en larvas expuestas en forma prolongada a soluciones de diferente osmolaridad _____	91
-Figura 31: Análisis discriminante múltiple para cada una de las soluciones de ADA _____	94
-Figura 32: Análisis discriminante múltiple para cada uno de los tiempos muestreados en el ensayo de larvas expuestas a ADA de diferente osmolaridad en forma prolongada _____	96
-Figura 33: CL50 de Cd para larvas jóvenes de incubadas a 20 y 25 °C (se indican 4 protocolos experimentales) _____	99
-Figura 34: CL50 de Cd para larvas prometamórficas incubadas a 20 y 25 °C (se indican 4 protocolos experimentales) _____	99

	página
-Figura 35: Porcentaje de supervivencia en función del tiempo en larvas jóvenes expuestas a diferentes concentraciones de Cd a 20 y 25 °C _____	101
-Figura 36: Porcentaje de supervivencia en función del tiempo en larvas prometamórficas expuestas a diferentes concentraciones de Cd a 20 y 25 °C _____	102
-Figura 37: CL50 de Cd en función del tiempo para larvas jóvenes y prometamórficas a 20 y 25°C _____	104
-Figura 38: Valores medios de PH en función del tiempo en larvas jóvenes expuestas a «stress» osmótico en presencia y ausencia de 1 ppm de C _____	106
-Figura 39: Valores medios de PS en función del tiempo en larvas jóvenes expuestas a «stress» osmótico en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd _____	106
-Figura 40: Valores medios de CA en función del tiempo en larvas jóvenes expuestas a «stress» osmótico en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd _____	107
-Figura 41: Valores medios de H en función del tiempo en larvas jóvenes expuestas a «stress» osmótico en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd _____	107
-Figura 42: Análisis discriminante múltiple para cada una de las soluciones ensayadas en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd _____	110
-Figura 43: Análisis discriminante múltiple para cada tiempo muestreado, entre soluciones cuando las larvas son expuestas a medios de diferente composición química en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd _____	113
-Figura 44: Aspecto de la epidermis de larvas expuestas a 4 ppm de Cd en ADA 5 mOsm _____	119
-Figura 45: Aspecto de la epidermis de larvas expuestas a MAN-141 mOsm en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd _____	120
-Figura 46: Aspecto de la epidermis de larvas expuestas a MAN-141 mOsm en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd _____	121
-Figura 47: Aspecto de la piel abdominal de larvas expuestas a MAN-141 mOsm con y sin 1 ppm de Cd _____	122
-Figura 48: Aspecto de piel abdominal de larvas jóvenes expuestas a ADE con y sin 1 ppm de Cd _____	123
-Figura 49: Aspecto de piel abdominal de larvas jóvenes expuestas a ADE con y sin 1 ppm de Cd _____	124
-Figura 50: Aspecto de piel abdominal de larvas expuestas durante 24 hs a soluciones iónicas en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd _____	125

Agradecimientos

A mi Director de Tesis: Dr Alfredo Salibián por su inapreciable participación en el desarrollo de este trabajo, en mi formación profesional y por su confianza en mi.

A la Comisión de Investigaciones de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por los subsidios recibidos que hicieron posible la realización del trabajo.

A la Universidad Nacional de Luján por el apoyo institucional y económico.

Al Lic. Rubén Lombardo por su importante participación en la elaboración de los procedimientos estadísticos utilizados y por su amistad.

A la Lic. Claudia Muíño por su colaboración en parte de las experiencias realizadas.

Al Sr. Javier Katz y especialmente al Sr. Roberto Yoshihara por la asistencia técnica y por su total disposición a colaborar.

A los Sres. Dante Giménez, Héctor Chiochio y Angel Fusaro del Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido, dependiente del CONICET, por su asistencia técnica.

A la Dra. Graciela Esnal, como consejera de estudios en la carrera de doctorado, por su calidez y disposición permanentes.

A Mabel Tudino, Jorge Stripeikis y Liliana d’Huickue del Laboratorio de Análisis de Trazas de la FCEyN-UBA por la determinación de los cationes intralarvales.

A mis compañeros de trabajo: Carolina Loez, Mirta Topalián, Patricia Castaño, María Gabriela Rovedatti, Fernando de la Torre, Sandra Demichelis y María Eugenia García por su estímulo constante y por hacer del laboratorio un ámbito agradable de permanencia y particularmente a Patricia Castaño por su actitud solidaria en esta última etapa.

A Carolina Loez por la traducción del resumen al francés.

A mi esposo, Ricardo Lemi por su comprensión y aliento. A mis hijos Verónica y Nahuel por su tiempo y por su paciencia.

A mi madre, Rosa Arcuri quien de manera incondicional apoyó moral y económicamente mis estudios y jamás puso escollos al desarrollo de mi vocación.

Abreviaturas utilizadas en el texto:

ADA: agua dulce artificial 5 mOsm.

PH: peso húmedo (mg).

PS: peso seco (mg).

CA: contenido de agua expresado como mg agua/mg PS.

H : contenido de agua expresado como % de agua.

ADE: agua destilada.

MAN: Soluciones de manitol en agua destilada.

ANOVA: Análisis de varianza.

ANCOVA: Análisis de covarianza.

MANOVA: Análisis de varianza múltiple.

ADM: Análisis discriminante múltiple.

VC: variable canónica.

RESUMEN

Las larvas de anfibios se enfrentan con un medio hipotónico en relación a sus fluidos corporales, viviendo en contacto con cuerpos de agua temporales muchas veces cambiantes en su concentración y composición. Por ello los mecanismos para responder al «stress» osmótico son importantes para su sobrevivencia y comprenden la regulación acoplada del intercambio de agua y de solutos.

Nuestros objetivos fueron: 1) determinar la capacidad de sobrevivencia de la larvas de Bufo arenarum en medios de osmolaridades diferentes a la de su ambiente natural;

2) cuantificar la respuesta de los animales al «stress» osmótico; 3) predecir dicha respuesta mediante la confección de modelos de regresión múltiple para cada parámetro analizado; 4) evaluar la respuesta a «stress» osmótico en medio contaminado por cadmio y analizar sus efectos.

Para evaluar la sobrevivencia de las larvas en medios de osmolaridades superiores a las de su ambiente natural, se determinó la Osmolaridad Letal media (OL50) de manitol y ClNa. No se hallaron diferencias en la supervivencia ni por composición química ni por «stress» de densidad, estableciéndose la OL50 144hs en 220 mOsm y OL50 48 hs a 279 mOsm.

Con la finalidad de cuantificar la respuesta al «stress» osmótico, las larvas se expusieron en forma aguda y con aclimatación a soluciones de diferente osmolaridad y composición química (desde 0 a 271 mOsm) y en forma prolongada a soluciones de agua dulce artificial concentrada y a agua destilada. La respuesta de los animales se evaluó utilizando MANOVA, análisis discriminante múltiple y regresiones múltiples.

Independientemente de la composición química del medio de incubación, las larvas no fueron capaces de osmorregular por encima de 200 mOsm. Este resultado no se modificó con aclimatación previa. En todos los casos la respuesta de las larvas es de deshidratación gradual. Se comprobó que los estadíos jóvenes de desarrollo de Bufo arenarum son capaces de sobrevivir durante aproximadamente un mes en agua destilada y en medio salino de 30 mOsm sin indicios de alteraciones en su equilibrio hídrico.

Analizando en forma integrada, la respuesta fisiológica de los animales a diferentes osmolaridades, el peso seco surge como principal parámetro de la función discriminante, en la mayor parte de los casos, hecho que se manifiesta cuando el medio de incubación es superiores a 200 mOsm.

Se evaluó mortalidad por Cd en larvas jóvenes y prometamórficas (CL50) a dos temperaturas de ensayo.

Se estableció para larvas jóvenes, tanto a 20 como a 25°C un intervalo de CL50 (de 24 a 96 hs de exposición) entre 3.5 y 2 ppm y para larvas prometamórficas entre 5 y 3 ppm a 20°C y entre 10 y 6

ppm a 25°C. Se comprobó un efecto protector de la temperatura sobre la intoxicación por cadmio en larvas prometamórficas.

Se verificó que la presencia de Cd en concentración subletal (1 ppm) en medios de incubación de diferente composición química no modifica la respuesta de las larvas al «stress» osmótico ni altera la sobrevivencia. Sin embargo en medios carentes de iones se produce un 100 % de mortalidad en pocas horas, independientemente de la osmolaridad del medio. Se concluye que existe un efecto protector de los iones sobre la toxicidad por cadmio.

Se comprobó que la mortalidad en medio iónico en presencia de concentración subletal de Cd se halla asociada a importantes alteraciones de la estructura epidérmica semejante a las encontradas en larvas expuestas a concentraciones letales de Cd en medio iónico.

Se efectuaron determinaciones referidas a la incorporación de Cd desde diferentes soluciones.

ABSTRACT

The amphibian larvae are exposed to a hypotonic environment in relation to their corporal fluids, and live in contact with temporal water bodies which often change their concentration and composition. For this reason the mechanisms to respond to osmotic stress are important for their survival and comprise the coupled regulation of water and solutes exchanges.

Our aims were:

1) to determine the survival capacity of the Bufo arenarum larvae in media of different osmolarities from those of their natural environment; 2) to quantify the response the animals give to osmotic stress; 3) to predict the above mentioned response by means of multiple regression models for each analyzed parameter; 4) to evaluate the response to osmotic stress in a cadmium polluted medium and to analyze the effects of the metal.

In order to evaluate the survival of the larvae in media of osmolarities higher than those found in their natural environment, the mean Lethal Osmolarity (OL50) of mannitol and ClNa solutions was determined. Differences in the survival were found neither for the chemical composition nor for stress due to density; the OL50-144 hrs and the LO50-48 hrs resulted to be 220 mOsm and 279 mOsm respectively.

In order to quantify the response to osmotic stress, the larvae were exposed acutely, with acclimation to solutions of different osmolarity and chemical composition (from 0 to 271 mOsm) and for an extended period of time to concentrated artificial fresh water media and to distilled water. The response from the animals was evaluated by using MANOVA, multiple discriminating analysis and multiple regressions.

Independently of the chemical composition of the incubation media, the larvae were not capable of osmoregulating above 200 mOsm. This result was not modified with previous acclimation. In all cases the larvae showed gradual dehydration. It was proved that the Bufo arenarum young stages can survive approximately for a month in distilled water and in an ionic medium of 30 mOsm without showing signs of alterations in its water balance.

The physiological response from the animals to different osmolarities analyzed in an integrated way showed that the dry weight was the main parameter of the discriminating function, which, in the majority of cases, manifests itself when the incubation medium is higher than 200 mOsm.

Mortality due to cadmium in young and prometamorphic larvae (LC50) at two assay temperatures was evaluated.

For young tadpoles, both at 20 and 25°C, an interval of LC50 (for 24 to 96 hrs of exposure) between 3.5 and 2 ppm was established and, for prometamorphic larvae between 5 and 3 ppm at 20°C and between 10 and 6 ppm at 25°C. A protective effect of temperature over cadmium toxicity in prometamorphic larvae was verified.

It was confirmed that the presence of Cd in sublethal concentration (1 ppm) in the incubation media of different chemical composition neither modifies the response from the larvae to osmotic stress nor alters their survival. However, in media lacking in ions, a 100% mortality is produced in a few hours, independently of the osmolarity of the medium. As a conclusion, there exists a protective effect of the ions over cadmium toxicity.

It was verified that mortality in a non-ionic medium in presence of sublethal concentration of cadmium is associated to important alterations in the epidermic structure similar to those found in larvae exposed to lethal concentration of Cd in ionic medium.

The incorporation of cadmium into the larvae from different solutions was made.

Résumé

Les larves des amphibiens affrontent un milieu hypotonique en relation à leurs fluides corporeux, en vivant en contact avec des corps d'eau temporaires changeant à plusieurs reprises, en concentration et composition. C'est pour cela que les mécanismes pour répondre au «stress» osmotique sont importants pour leur survie; ceux-ci comprennent la régulation accouplée de l'échange d'eau et d'éléments solubles.

Nos objectifs ont été: 1) déterminer la capacité de survie des larves de Bufo arenarum dans des milieux d'osmolarités différentes à celles de leur milieu naturel; 2) quantifier la réponse des animaux au «stress» osmotique; 3) prédire cette réponse grâce à la confection de modèles de régression multiple pour chaque paramètre analysé; 4) évaluer la réponse au «stress» osmotique dans un milieu pollué par du cadmium et analyser ses effets.

Pour évaluer la survie des larves dans des milieux d'osmolarités supérieures à celles de leur milieu naturel, on a déterminé l'osmolarité létale moyenne (OL 50) du manitol et du ClNa. Nous n'avons pas trouvé de différences dans la survie ni par composition chimique ni par «stress» de densité, d'où l'on a établi la OL50 144 hs en 220 mOsm et la OL50 48 hs en 279 mOsm.

Pour quantifier la réponse au «stress» osmotique, les larves ont été exposées de façon aiguë et avec une acclimation dans des solutions de différente osmolarité et de composition chimique (de 0 à 271 mOsm), et de façon prolongée dans des solutions d'eau douce artificielle concentrée et dans de l'eau distillée. La réponse des animaux a été évaluée en utilisant une MANOVA, une analyse discriminante multiple et des regressions multiples.

Indépendamment de la composition chimique du milieu d'incubation, les larves n'ont pas été capables d'osmoréguler au delà de 200 mOsm. Ce résultat n'a pas été modifié avec l'acclimation préalable. Dans tous les cas la réponse des larves a été une deshidratation graduelle. Nous avons confirmé que les premiers stades de développement de Bufo arenarum sont capables de survivre pendant aproximativement un mois en eau distillée et en milieu salin concentré de 30 mOsm sans indices d'altérations dans leur équilibre hydrique.

En analysant de façon intégrée la réponse physiologique des animaux à différentes osmolarités, le poids sec est le principal paramètre de la fonction discriminante, dans la plupart des cas, ce fait se manifeste quand le milieu d'incubation est supérieur à 200 mOsm.

La mortalité due au cadmium (CL50) chez des larves jeunes et chez des larves protamorphiques a été évaluée à deux températures d'essai.

On a établi, pour des larves jeunes, aussi bien à 20 qu'à 25°C, un intervalle de CL50 (de 24 à 96 hs d'exposition) entre 3.5 et 2 ppm, et pour les larves prométamorphiques entre 5 et 3 ppm à 20°C et entre 10 et 6 ppm à 25°C. On a aussi constaté un effet protecteur de la température sur l'intoxication par le cadmium chez les larves prométamorphiques.

On a constaté que la présence de Cd en concentration sublétales (1 ppm) dans des milieux d'incubation de différente composition chimique ne modifie pas la réponse des larves au «stress» osmotique ni altère la survie. Pourtant dans des milieux sans ions, il se produit 100% de mortalité en peu d'heures, indépendamment de l'osmolarité du milieu. De façon que nous concluons qu'il existe un effet protecteur des ions sur la toxicité du cadmium.

Il a été constaté que la mortalité en milieu anionique en présence de concentration sublétales de Cd est associée à d'importantes altérations de la structure épidermique, similaire à celles trouvées chez des larves exposées à des concentrations létales de Cd en milieu ionique.

On a effectué des déterminations rapportées à l'incorporation de Cd depuis de différentes solutions.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

EXPERIMENTALES

La respuesta fisiológica de las larvas jóvenes de Bufo arenarum al "stress" osmótico depende de la naturaleza química del medio externo, es cuantificable y predecible en términos de parámetros de balance hídrico mensurables tales como peso húmedo, peso seco y contenido de agua.

Nos proponemos demostrar que existen diferencias entre las distintas variables utilizadas como parámetros evaluadores del balance hídrico y estimar la magnitud de éstas, aislando aquéllos caracteres cuyas diferencias entre varias muestras los hacen más importantes en la contribución al "test" de significación global.

La presencia de concentraciones subletales de cadmio en el medio de incubación debe alterar la respuesta fisiológica de las larvas sumergidas en medios osmóticamente desfavorables. Dicho efecto se debe a alteraciones estructurales y bioquímicas de los órganos involucrados en la regulación hidromineral.

Consecuentemente, los objetivos experimentales fueron los siguientes:

- Determinar la CL50 en larvas jóvenes de Bufo arenarum expuestas en forma aguda a soluciones electrolíticas y no electrolíticas concentradas.
- Evaluar el efecto de la densidad de organismos sobre la mortalidad causada por soluciones de osmolaridad elevada.
- Analizar la cinética de la respuesta integrada del peso húmedo (PH), peso seco (PS) y contenido de agua (CA y H) en larvas expuestas a soluciones de 0 a 271 mOsm y diferente composición química, durante tiempos variables.

- Determinar la CL50 en larvas de Bufo arenarum expuestas en forma aguda a cadmio.
- Evaluar el efecto de la edad larval y de la temperatura de incubación sobre la intoxicación aguda con cadmio.
- Analizar la cinética de la respuesta integrada del PH, PS y CA en larvas expuestas a soluciones de diferente osmolaridad electrolítica y no electrolítica en presencia de una concentración subletal de cadmio.
- Explorar el impacto de alteraciones de la composición del medio externo sobre los contenidos catiónicos intralarvales.
- Estudiar las alteraciones morfológicas en la epidermis de larvas expuestas a osmolaridades elevadas (electrolíticas y no electrolíticas) en presencia y ausencia de cadmio.

CAPITULO I

LINEAMIENTOS GENERALES

INTRODUCCION GENERAL

I-a.1) Consideraciones generales acerca del medio acuático como factor estresante: selección de solutos osmóticamente activos

Puesto que la mayoría de las células contienen un porcentaje elevado de agua, es lógico suponer que el estado de la misma y todo factor ambiental que afecte su actividad, estructura o estado físico intracelular constituya una amenaza para la vida. El "stress" causado por cambios en la composición y estado del agua presenta una amplia gama de variables, por ejemplo, la salinidad de la solución externa en animales acuáticos, la desecación en animales terrestres debido a temperaturas elevadas o baja humedad, riesgo de congelamiento por causa de bajas temperaturas. A pesar de la diversidad de organismos y la variedad y complejidad de factores ambientales estresantes que afectan la relación de los organismos con el agua, en casi todos los casos se conocen sólo un pequeño número de estrategias adaptativas fundamentales. Así, para la preservación de una solución intracelular fisiológicamente apropiada para los procesos metabólicos y estructura de macromoléculas, se conocen las siguientes alternativas en términos de composición de solutos osmóticamente activos: alcoholes, aminoácidos y sus derivados (taurina, B-alanina), B-dimetilsulfonopropanato (DMSP), metilaminas, urea y azúcares, (Yancey et al., 1982).

Entender las bases de la selección evolutiva de los osmolitos es comprender una de las propiedades fundamentales que gobiernan la relación termodinámica de la fase acuosa de los

sistemas macromoleculares (Somero, 1992). Probablemente la selección evolutiva del grupo particular de osmolitos mencionado arriba, se basa en la sensibilidad que presentan las células a determinados solutos. Por ejemplo, concentraciones salinas elevadas del medio alteran, entre otros efectos, la catálisis enzimática, la compartimentalización de proteínas, la interacción entre la bicapa de fosfolípidos y las proteínas periféricas de membrana. Cada una de estas propiedades de los sistemas macromoleculares puede ser afectada cuando la concentración salina intracelular alcanza valores alejados de los normales. Entre las adaptaciones básicas más comunes, que han permitido retener la actividad metabólica en condiciones de elevada osmolaridad intracelular, se encuentra la utilización de solutos compatibles con el mantenimiento de la actividad de proteínas intracelulares. Entre los osmolitos orgánicos frecuentes en elevada concentración en diferentes animales se encuentra la urea, cuya presencia puede hallarse ligada a la co-ocurrencia de un segundo tipo de osmolito orgánico como las metilaminas (Yancey y Somero, 1978).

Resumiendo: la selección de moléculas que actúan como osmolitos parece haber seguido alguna de las siguientes estrategias: 1) no afectar específicamente ningún proceso celular, 2) no tener carga eléctrica de modo de no alterar el balance eléctrico de los componentes celulares, 3) actuar como estructuras proteicas propias, excluyendo el contacto con los componentes celulares. Las moléculas que cumplen estas premisas son: azúcares, glicerol, muchos polioles, aminoácidos y sus derivados (Timasheff, 1992).

I-a.2) Problemas de la osmorregulación

Los mecanismos iónico y osmorreguladores son los que mantienen las diferencias de concentraciones iónicas entre el compartimento intra y extracelular y entre el espacio extracelular y el medio externo.

La evolución de estos mecanismos tuvo efectos trascendentes en varios aspectos de la especiación animal. La capacidad de sobrevivir en un medio osmótico desfavorable ha sido posible en los grupos animales más avanzados, por la evolución de un medio interno estable, que actúa amortiguando las variaciones del medio externo. Uno de los requerimientos de la regulación del medio interno es el de retener una cantidad apropiada de agua; otro es la presencia, en las concentraciones necesarias, de distintos solutos, como sales y macromoléculas; ello puede efectuarse a través de órganos de transporte tales como branquias, intestino, vejiga urinaria y epitelios y sistemas renales. Por lo tanto, la regulación osmótica no trata solo el intercambio de agua, sino también la regulación de sales (Eckert, 1990). Los animales osmorreguladores dependen casi por completo de la regulación osmótica del líquido extracelular, en tanto que, en general, los osmoconformadores pueden incrementar la osmolaridad intracelular.

En el caso particular de los vertebrados de agua dulce, éstos deben prevenir la ganancia neta de agua y la pérdida neta de sales, lo que se logra a través de las siguientes estrategias fundamentales: 1) produciendo una orina muy diluida en relación al medio interno, 2) reabsorbiendo sales a través de los epitelios y 3) reteniendo osmolitos orgánicos.

I-a.3) La osmorregulación en los anfibios

Los anfibios son considerados animales típicamente de agua dulce, no tolerando concentraciones salinas externas mayores que las de su ambiente natural. Esto es debido a la elevada permeabilidad al agua que caracteriza a su epidermis, lo cual los hace más vulnerables al "stress" osmótico que otros vertebrados terrestres. Sin embargo se ha demostrado que un número considerable de especies de anuros y urodelos son capaces de sobrevivir en aguas salobres (Duellman y Trueb, 1986). Para unas

pocas especies de anuros se ha establecido tolerancia a osmolaridades entre 600-1000 mOsm (Balinsky 1981).

En el caso particular de las larvas de anuros y urodelos se ha registrado tolerancia a salinidades externas mayores que las habituales en sus medios naturales, pero el rango de tolerancia es significativamente menor que en los adultos, debida principalmente a movimientos del ClNa. Las larvas mueren cuando su medio interno se hace hipoosmótico con respecto al externo salvo en Rana cancrivora que responde como teleósteo marino bebiendo agua salada y eliminando ClNa a través de las branquias. Rana kimmacharis en estadio larval puede sobrevivir en agua de mar diluida de 280 mOsm y Ambystoma tigrinum en Ringer de 250 mOsm; el medio interno de ambas especies permanece hiperosmótico con respecto al medio externo. Experimentalmente las larvas de Xenopus laevis se han adaptado a soluciones de 330 mOsm. No obstante ninguna de las larvas mencionadas se adapta al medio salino por incremento de la síntesis de urea (Balinsky, 1981).

Para comprender los mecanismos por los cuales las larvas de anfibios se adaptan a un medio hiperosmótico se debe responder a dos cuestiones fundamentales :1) cuáles son los estímulos primarios que provocan la respuesta de los animales? y 2) qué mecanismos internos de control emplea el animal para lograr esa adaptación?

La primera respuesta de las larvas a un medio hiperosmótico con respecto a sus fluidos, es el influjo neto de electrolitos y la pérdida de agua. El efecto de diferentes soluciones hiperosmóticas no salinas en las larvas, produce respuestas en corto tiempo que son similares, pero no idénticas, a aquellas causadas por soluciones salinas. Algunas de ellas parecen depender de la elevada concentración externa de sodio.

Con respecto a la tolerancia a soluciones de menor osmolaridad que la de agua dulce, muchos autores han demostrado que las larvas de anfibio tienen la capacidad de sobrevivir por largos períodos de tiempo sumergidas en agua destilada (Bentley, 1971; Salibián, 1977). En el caso particular de Bufo

arenarum se ha demostrado que sus embriones y larvas también son capaces de sobrevivir en agua destilada (Castañé et al. 1987; Minotti et al. 1983).

Todas estas evidencias sugieren la existencia de un comportamiento dual para anfibios, que resultan tolerantes tanto a ambientes de elevada salinidad como capaces de sobrevivir en medio aiónico sin mostrar signos de alteraciones importantes. Esta flexibilidad en el intervalo de tolerancia salina hace suponer la existencia de mecanismos que los hacen potencialmente capaces de colonizar medios diferentes o de soportar cambios estacionales dentro de su propio ambiente.

Balinsky (1981) describe dos tipos de respuesta compensatoria de las larvas de anfibios a elevada osmolaridad, la primera fue observada en experimentos cortos en los cuales la concentración de la solución externa se incrementó rápidamente en forma aguda, involucrando cambios importantes en balance hídrico y electrolítico. La segunda se observó en animales sometidos a medios hiperosmolares durante un período más prolongado y con aclimatación. En este caso se reportaron cambios metabólicos los que se reflejaron en modificaciones de los mecanismos de degradación de las proteínas e incremento de compuestos osmoticamente activos en sus fluidos (Gasser y Miller, 1986; Schrock y Hanke, 1979; Schrock et al. 1980).

La capacidad de los anfibios para tolerar salinidades externas elevadas depende casi enteramente de su capacidad para incrementar y mantener su plasma hiperosmótico con respecto a la solución externa (Katz, 1987). La habilidad para mantener y acumular elevadas concentraciones de urea plasmática en condiciones de aclimatación salina es un mecanismo que provee el medio para incrementar la osmolaridad plasmática sin elevar la concentración de electrolitos. Sin embargo, pocos anfibios anuros adultos pueden tolerar elevada osmolaridad plasmática y concentración de urea; sólo las pocas especies que son capaces de elevar su concentración de urea a través de su reabsorción tubular y síntesis neta pueden aclimatarse a soluciones de concentración alta de ClNa (Shpun et al. 1992).

La composición química del medio no es indiferente a las larvas. Como ellas no tienen capacidad de

incrementar la osmolaridad plasmática por síntesis de osmolitos orgánicos, la respuesta compensatoria cuando se hallan en medio externo hiperosmótico depende casi por completo de incrementos en la concentración de ClNa plasmático. La regulación del equilibrio hídrico es posible pero cuando el plasma se hace hiperosmótico con respecto al medio se produce la muerte por hipernatremia (Balinsky, 1981). Si el medio externo es no electrolítico no es posible la regulación hídrica y se comportan como osmoconformadores limitados (Katz, 1987).

I-a.4) Modalidad de análisis para el estudio de balance hidromineral en anfibios

El balance hídrico en anfibios ha sido estudiado principalmente desde la perspectiva de mecanismos realimentados. Así, ante cambios del medio interno tales como la deshidratación intracelular o extracelular, se ponen en funcionamiento mecanismos compensatorios que reestablecen dicha variable a su valor de referencia. Tales estudios se han encarado analizando diferentes aspectos, en larvas pero fundamentalmente en adultos de anfibios, tanto "in vitro" como "in vivo" a nivel de regulación neuroendócrina, etológica, bioquímica y estrategias adaptativas, entre otros enfoques (Ardizzone y Lippe, 1985; Degani, 1985; Degani y Nevo, 1986; Gasser y Miller, 1986; Katz, 1987; Katz y Hoffman, 1989; Rebores, 1987; Shpun *et al.*, 1992; Warburg y Rosenberg, 1990).

En los trabajos citados se evaluaron distintas variables tales como niveles de hormonas, enzimas, productos de excreción, osmolitos y electrolitos plasmáticos, y variaciones de contenido de agua en diferentes condiciones, generalmente como respuestas a tratamientos de regulación hidromineral en condiciones de "stress" osmótico.

En todos los casos los resultados se analizaron en forma univariada, contrastando el efecto del tratamiento sobre cada una de las variables consideradas, con las respuestas de un control no tratado.

Si no se toma al organismo como una unidad integrada, donde las variables están interrelacionadas e interdependientes, se estará sobreestimando la dimensionalidad de la variación entre distintos tratamientos. Las técnicas univariadas, como el test "t" de Student, no tienen sensibilidad para detectar diferencias entre muestras o grupos cuando éstas son el resultado de interacciones entre múltiples variables y hay superposiciones parciales de las muestras en relación a cada variable bajo estudio. Por lo expuesto, el enfoque correcto para cuantificar la incertidumbre de la inferencia inductiva debe ser necesariamente multivariado, considerando la covariación simultánea de las variables en estudio. Los métodos multivariados se basan en el álgebra matricial. El problema de clasificación de individuos en un determinado grupo, basándose en varias mediciones efectuadas, se debe enfocar matemáticamente como un problema de reducción de dimensionalidad. La posición de los individuos en el espacio de n dimensiones, definida por las n variables evaluadas, puede proyectarse sobre cada una de estas variables para obtener distintos grados de superposición de los grupos sobre cada una de ellas. El problema consiste en encontrar una línea de ese espacio n -dimensional tal que el área de superposición, formada por la proyección de los distintos grupos sobre esa línea, sea minimizado. Ella se puede calcular matemáticamente como una variable que es una combinación lineal de las variables en estudio y es la de máximo poder discriminante entre grupos. En este trabajo nos proponemos cuantificar la respuesta de las larvas jóvenes de Bufo arenarum al "stress" osmótico, analizándola desde un punto de vista multivariado.

I-a.5 Consideraciones acerca del cadmio como agente contaminante: su acción sobre los organismos

El cadmio es un metal pesado muy abundante en la naturaleza, cuyos efectos sobre las funciones

biológicas son aún muy discutidas (Page et al. 1986.; Ravera, 1984). Se lo halla en depósitos de zinc, plomo y cobre, con los que coexiste en pequeñas cantidades. La contribución del cadmio a la contaminación ambiental es consecuencia del amplio espectro de usos que encuentra en la actualidad (baterías, pinturas, centrales nucleares, etc). La incorporación de Cd a los ecosistemas es el resultado del vuelco indiscriminado de los desechos industriales y de la ausencia de medidas para evitar o neutralizar dicha incorporación, la que se ha acrecentado en el curso de los últimos años (Niriagu et al., 1988).

En agua dulce el cadmio puede existir como ión Cd^{2+} , complejoado como $\text{Cd}(\text{OH})_2$ y CdCO_3 y en varios complejos orgánicos dependiendo del pH y del material orgánico soluble del medio (Bewers et al., 1987).

El cadmio podría comprometer la sobrevivencia de los ecosistemas, principalmente por bioamplificación que alcanza, en el nivel de los consumidores primarios, valores 13-15 veces mayores que en los productores (Dmowsky y Karolewsky, 1979)

Los efectos deletéreos del cadmio fueron descriptos tanto para organismos autótrofos (Dogmann y Nürnberg, 1982) como heterótrofos (Smith et al., 1982; Cheng et al., 1979; Manson y O'Flaherty, 1978; Martoja et al., 1981), incluido el hombre (U.S. Dept. Health and Human Serv., 1993).

Los principales órganos blanco en vertebrados adultos son hígado y riñón, aunque si la intoxicación es crónica casi todos los sistemas son afectados (Foulkes, 1986).

La detoxificación de este metal se efectúa mediante las metalotioninas, proteínas de bajo peso molecular, con elevada afinidad por el metal y cuya síntesis es inducida principalmente en los Organos blanco (Danielson et al., 1982; Jacobson y Turner, 1980; Ouellette et al., 1982).

El Cd presenta una variedad de efectos tóxicos sobre la fauna acuática, entre ellos los teratogénicos, que incluyen malformaciones del esqueleto, desórdenes de comportamiento, retardo del crecimiento y reducción del tamaño corporal (Sprague, 1987).

Cabe mencionar que los anfibios son ampliamente utilizados como indicadores de contaminación ambiental (Bandó, 1976) y como animales prueba de plaguicidas (Cooke, 1981, Salibián, 1992). Este grupo es muy sensible en etapas tempranas de su desarrollo (Herkovits y Fernandez, 1979) por lo que es de interés estudiar el impacto del cadmio sobre los primeros estadios de vida. La exposición continua a Cd desde el estadio de 2 células produce disociación celular, alteraciones en los tejidos ectodérmicos y en la formación de branquias y miembros. El grado de malformaciones parece ser dependiente de la temperatura (Pérez Coll et al, 1986).

En la comprensión de los efectos tóxicos de los metales pesados sobre los sistemas biológicos se ha hecho evidente que a nivel de organismo, es esencial entender los mecanismos fisiológicos que controlan la metabolización de estos metales y sus efectos a nivel subcelular.

Estudios recientes sobre la toxicidad del Cd en organismos acuáticos han indicado en forma consistente que la misma depende de su biodisponibilidad. (Sprague, 1987). La toxicidad del Cd ha demostrado estar relacionada con el catión divalente y su concentración está determinada por la concentración total del metal disuelto y por el grado de su complejamiento con ligantes (Thorpe y Costlow, 1989).

I-a.6 Efectos del cadmio en la homeostasis de animales acuáticos

En mamíferos y en animales acuáticos se han identificado, numerosos compartimentos celulares utilizables para disminuir el nivel de metales tóxicos disponibles. La elevada afinidad de los metales por proteínas ligantes, lisosomas e inclusiones o concreciones minerales juega un rol importante en la homeostasis intracelular de los metales. La extensión en la cual cada uno de estos compartimentos se halla involucrado en el complejamiento de los metales, parece depender de una variedad de

factores entre los que se incluyen modalidad de administración del metal, interacción con otros metales, tipo de célula, órgano, especie y etapa del ciclo de vida. Además existe intercambio entre los diferentes compartimentos (Fowler, 1987).

La exposición de animales acuáticos al Cd disuelto en agua es conocida como causa de un amplio espectro de efectos tóxicos. Peces expuestos al mismo devienen hipocalcémicos y sufren disturbios en la ionorregulación, lo cual tiene una implicancia fundamental en la toxicidad del metal (Giles, 1984; Roch y Maly, 1979;). En estudios efectuados con piel abdominal de anfibio "in vitro", Hayashi et al. (1977) hallaron que el Cd produce aumento de la concentración de sodio de las células epiteliales, inhibición de la (Na+K)-ATPasa y cambios en la morfología y en las uniones entre células epidérmicas; evidentemente estos efectos han de perturbar el normal funcionamiento de la regulación hídrica y electrolítica de los animales.

MATERIALES Y METODOS

I-b.1) OBTENCION Y MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Las larvas se obtuvieron por fecundación artificial. La ovulación de las hembras se indujo mediante la inyección en la cavidad celómica o en los sacos linfáticos dorsales, de un macerado de hipófisis homóloga (Pisanó, 1956) en solución de Holtfreter al 10 %. Los oocitos maduros obtenidos del ovisaco, fueron fecundados "in vitro" con una suspensión de espermatozoides preparada macerando testículos en solución fisiológica del Holtfreter al 10% (Hamburger, 1969). Los embriones obtenidos se mantuvieron en la misma solución en cajas de Petri, se efectuó la remoción de los embriones muertos o inviables y se renovó la solución cada 12 horas hasta el comienzo del desarrollo larval, momento en el cual las larvas fueron transferidas a agua dulce artificial (ADA) con la siguiente composición química (en mM): ClNa, 1.3; Cl₂Ca, 0.8; ClK, 0.1 y CO₃HNa, 0.2 (Alvarado y Johnson, 1966). Las larvas permanecieron en esta solución, con renovación diaria, en recipientes de poliestireno hasta el comienzo de las experiencias; fueron alimentadas diariamente con alimento balanceado para peces molido, cuya composición contenía un 35% de proteínas, y se mantuvieron a temperatura de laboratorio con fotoperíodo natural.

Para el diagnóstico de estadios embrionarios se siguió la tabla de Del Conte y Sirlin (1951); para estadios larvales se utilizó la tabla de Echeverría y Fiorito de López (1981).

Para los experimentos se utilizaron ejemplares del primer estadio larval (26), los que se caracterizan por presentar un desarrollo incipiente de los miembros posteriores.

I-b.2) EXPERIENCIAS PARA LA EVALUACION CUANTITATIVA DEL BALANCE HIDRICO EN LARVAS EXPUESTAS A DIFERENTES OSMOLARIDADES

I-b.2.a)Diseño experimental:

Todas las experiencias se efectuaron en cámara de incubación Ghilon TC 120 a temperatura y fotoperíodo constantes de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y 12 hs día/12 hs noche. Estas condiciones se establecieron 48 hs antes del comienzo de las experiencias (período de aclimatación). Con excepción del experimento de exposición crónica de 27 días de duración, en el resto de los ensayos no se suministró alimento a partir del comienzo del período de aclimatación.

Todas las experiencias se realizaron por duplicado. La densidad de organismos fue siempre de 1 larva/4 ml de solución y se mantuvo constante durante todo el bioensayo; las soluciones se renovaron diariamente. Los recipientes utilizados para cada condición experimental y réplica fueron de vidrio. Cada muestra se compuso de 4 larvas, las que se colocaron en un cono de papel de aluminio, rotulado para su posterior identificación. El criterio de utilizar 4 larvas por muestra se adoptó a fin de disminuir el error de pesada, a causa del escaso peso de estos animales en el estadio utilizado. Para cada condición experimental, en los tiempos establecidos para cada experimento, se tomaron 4 muestras por réplica (que corresponde a 16 larvas).

I-b.2.b)Parámetros evaluados:

El peso húmedo (PH; mg) se determinó pesando cada muestra luego de eliminar el exceso de agua. Para obtener el peso seco (PS; mg) las muestras se expusieron a 100°C durante un lapso no inferior a 12 hs y luego se pesaron. A partir de PH y PS se calculó el contenido de agua (CA); obtenido a partir de la ecuación $CA = PH - PS/PS$, expresado como $(\text{mg H}_2\text{O} \cdot \text{mg PS}^{-1})$; también se lo expresó como porcentaje de la masa corporal (H), calculado a partir de la ecuación $H = (PS/PH \cdot 100)$.

Para pesar las muestras se utilizó una balanza analítica Mettler (± 0.01 mg). En la Figura 1 se representa mediante diagrama de flujo, el diseño experimental seguido.

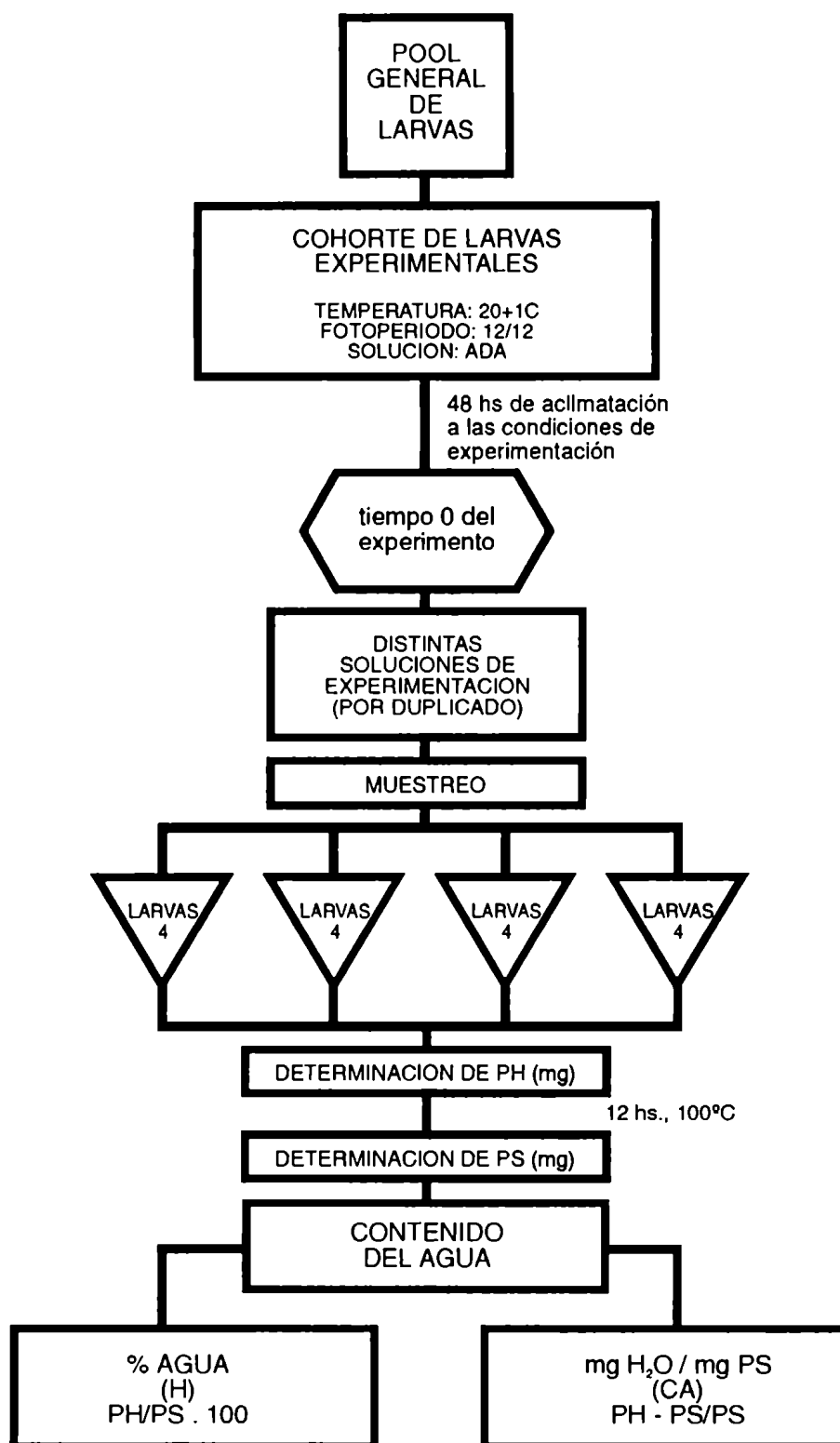


Figura 1: Diagrama de flujo ilustrando el diseño experimental de los ensayos de balance hídrico.

I-b.2.c) Preparación de las soluciones

Todas las soluciones se prepararon por diluciones a partir de soluciones madre y todos los reactivos utilizados fueron Mallinkrodt grado p.a. .

La solución madre de manitol fue de 0.5 M y la de ClNa de 2.7M. A las soluciones de ensayo se les midió la osmolaridad en un osmómetro Fiske. En todos los casos se efectuó un control de ADA. En el siguiente cuadro se listan todas las soluciones y osmolaridades ensayadas:

osmolaridad (mOsm)	solución/es
0	agua destilada (ADE)
5	agua dulce artificial (ADA)
10	ADA 10, dilución 2:100
20	ADA 20, dilución: 4:100
30	ADA 30, dilución: 6:100
5	manitol (0.91 g/l)
70	manitol (12.75 g/l) o ClNa (2.13 g/l)
141	manitol (25.50 g/l) o ClNa (4.27 g/l)
176	manitol (30.97 g/l)
204	manitol (36.07 g/l) o ClNa (6.41 g/l)
247	manitol (43.72 g/l) o ClNa (7.48 g/l)
271	manitol (47.92 g/l) o ClNa (8.54 g/l)

I-b.2.d) Condiciones experimentales

Se efectuaron bioensayos en cuatro condiciones experimentales:

1-Exposición aguda a soluciones no electrolíticas (D-manitol) desde 0 a 271 mOsm .

2-Exposición aguda a soluciones electrolíticas (ClNa) desde 70 a 271 mOsm.

3-Exposición con aclimatación a soluciones electrolíticas (ClNa) y no electrolíticas (D-manitol) de osmolaridad creciente desde 70 hasta 271 mOsm.

4- Exposición crónica a agua destilada y a soluciones de agua dulce artificial desde 5 a 30 mOsm.

Para la condición 1 el experimento se prolongó durante 10 días con muestreo diario hasta el séptimo día y una última muestra al décimo. Se corrieron 3 controles: ADA, MAN 5 mOsm y ADE y las siguientes osmolaridades (en mOsm): 70, 141, 176, 204, 247 y 271.

Para la condición 2 se ensayó solamente control de ADA y las siguientes soluciones experimentales (en mOsm): 70, 141, 204, 247 y 271. La experiencia se prolongó durante 5 días.

Para la condición 3 la exposición de las larvas a osmolaridad creciente se efectuó de acuerdo con el siguiente cronograma: 0-24 hs: 70 mOsm, 24-48 hs: 141 mOsm, 48-72 hs: 204 mOsm, 72-96 hs: 247 mOsm. Previamente al cambio de osmolaridad se tomó la muestra correspondiente. El ensayo se extendió por 5 días.

Para la condición 4 la experiencia duró durante 27 días, con renovación diaria de soluciones, en los cuales se tomó muestra cada 5 días y se ofreció alimento a las larvas durante 30 minutos luego de la extracción de muestra y después se procedió al cambio de soluciones.

En todas las experiencias se tomó una muestra a tiempo 0 que representa las condiciones de las larvas al final del período de aclimatación, en el cual no existió control de densidad y las larvas se encontraban en recipientes de poliestireno con ADA 5 mOsm, a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperíodo 12/12.

I-b.2.e) Procesamiento estadístico

El efecto del tiempo de incubación y la concentración sobre cada variable fue evaluada usando análisis de la varianza (ANOVA).

Para cada variable considerada se efectuó análisis de regresión. Con excepción de la condición experimental 3 (aclimatación) se aplicó análisis de regresión múltiple. Este método fue seleccionado puesto que para cada variable dependiente (Y) existe más de una variable independiente (X) medidas en forma simultánea (Zar, 1984), obteniéndose una ecuación del tipo:

$$Y = a + b^1X^{1j} + b^2X^{2j} + \dots + b^mX^{mj}$$

donde a: ordenada al origen, b^1 a b^m son los coeficientes de regresión parciales de las X^1 a X^m variables independientes, cada una de las cuales tiene j observaciones.

Una ecuación como la planteada define un plano en tres dimensiones. En este caso en particular, las variables dependientes fueron PH, PS, CA y H y las independientes tiempo (hr), osmolaridad y eventualmente interacción entre ambas.

Para seleccionar el modelo de regresión de mejor ajuste, en cada caso se consideraron cuatro alternativas: 1) con y sin escala logarítmica para la osmolaridad y 2) con y sin interacción tiempo-osmolaridad. También se evaluó el término cuadrático para el tiempo.

Para optar por un modelo determinado se consideraron las siguientes condiciones: el mejor coeficiente de correlación (R), el mejor cuadrado medio residual y la significatividad estadística de cada término de la ecuación.

En la condición experimental 3 (aclimatación) se ajustó para cada variable un análisis de regresión lineal, para control y experimental separadamente, y se obtuvo una ecuación de regresión del tipo:

$$Y = a + bX$$

donde la variable dependiente Y es el PH, PS, CA o H; a la ordenada al origen b la pendiente y la variable independiente X es el tiempo de exposición de las larvas a las soluciones de osmolaridad creciente.

Para evaluar diferencias entre control y experimental, se realizó análisis de covarianza (ANCOVA), comparándose las pendientes (b). En caso de no existir diferencias estadísticamente significativas, se compararon las medias ajustadas para cada grupo. El ANCONA se probó por transformación angular de las cuatro variables; pero al no existir diferencias con los datos no transformados, se optó por utilizarlos sin transformación.

Todas las variables morfológicas fueron consideradas simultáneamente dentro de un contexto multivariado.

La respuesta fisiológica al período de incubación y a la osmolaridad (concentración) se evaluó a través de un análisis de varianza múltiple (MANOVA) (Morrison, 1976). Para aislar aquellos caracteres cuyas diferencias entre muestras son de

mayor importancia por contribuir al "test" de significación global, se utilizaron comparaciones múltiples multivariadas.

El examen de la respuesta integral de los animales a las condiciones experimentales se efectuó utilizando análisis discriminante múltiple (ADM) (Dixon, 1981). La función discriminante representa la mejor forma de combinar linealmente todas las variables medidas en los individuos para que los grupos presenten el máximo de diferencia. Este análisis es una extensión de la función discriminante de Fisher. La misma permite discriminar entre varios grupos y clasificar individuos en los que se han cuantificado diversas variables, que pueden ser medidas en distintas unidades. Asimismo puede representarse gráficamente la posición y orientación de la respuesta de la larva tomada como unidad compuesta por el conjunto de variables en estudio, comparando para cada tiempo las distintas osmolaridades y para cada osmolaridad los distintos tiempos. El ADM también permite encontrar la variable con mejor capacidad discriminante para detectar diferencias significativas en la respuesta de los animales, tanto en función del tiempo como de la osmolaridad.

I-b.3) EXPERIENCIAS PARA LA DETERMINACION DE CONCENTRACION LETAL MEDIA (CL50)

I-b.3.a) Exposición a elevadas osmolaridades electrolíticas y no electrolíticas en presencia y ausencia de "stress" por densidad de organismos

Para estos bioensayos se mantuvieron las mismas condiciones experimentales, descriptos en el punto I-b.2.a en cuanto a temperatura, fotoperíodo y aclimatación.

Las dos densidades utilizadas fueron de 1 larva/4 ml (igual a la de todos los experimentos de equilibrio hídrico) y de 1 larva/20 ml, equivalente a la densidad utilizada en bioensayos para organismos de agua dulce recomendada por APHA (1992) Tanto para las soluciones electrolíticas (ClNa) como no electrolíticas (Manitol) se ensayaron las siguientes osmolaridades: 141, 204, 247 y 271 mOsm y control de ADA (5 mOsm). Cada bioensayo se corrió por duplicado y se efectuó al menos en dos oportunidades. El número de larvas por concentración fue en todos los casos de 40.

Se efectuaron las siguientes series experimentales:

- Osmolaridad electrolítica (1 larva/4 ml)
- Osmolaridad electrolítica (1 larva/20 ml)
- Osmolaridad no electrolítica (1 larva/4 ml)
- Osmolaridad no electrolítica (1 larva/20 ml)

I-b.3.b) Experiencias para determinar la concentración letal media (CL50) de cadmio para larvas jóvenes y prometamórficas a dos temperaturas de ensayo.

Los ensayos se efectuaron con larvas de dos estadios: 26 o jóvenes (caracterizado por desarrollo incipiente de los miembros posteriores) y 28/29 o prometamórficas (caracterizado por la presencia de articulación entre stilopodio y pseudopodio y 5 dígitos en los miembros posteriores). Las temperaturas fueron de 20 y 25 °C y el fotoperíodo de 12/12 hs. El tiempo de aclimatación a las condiciones experimentales fue de 48 hs previas al comienzo de los ensayos.

Las diferentes soluciones de Cd ensayadas se prepararon por dilución de una solución madre de $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ de 8.12 g.l⁻¹. EL pH de todas las soluciones utilizadas osciló entre 6.5 y 7.

Se corrieron las siguientes series experimentales:

- 1) Estadio 26, 20°C: 1, 2 y 4 ppm de Cd (n= 40 larvas por concentración).
- 2) Estadio 26, 25°C: 1, 2 y 4 ppm de Cd (n= 40 larvas por concentración).
- 3) Estadios 28/29, 20°C: 1, 2 y 4 ppm de Cd (n= 20 larvas por concentración).
- 4) Estadios 28/29, 20°C: 2, 4 y 8 ppm de Cd (n= 20 larvas por concentración).
- 5) Estadios 28/29, 25°C: 4, 8 y 16 ppm de Cd (n= 30 larvas por concentración).
- 6) Estadios 28/29, 25°C: 4, 8 y 16 ppm de Cd (n=20 larvas por concentración).

En todos los casos se efectuaron controles de ADA-5 mOsm y todas las series experimentales fueron realizadas por duplicado con renovación diaria de las soluciones.

Las experiencias se efectuaron siguiendo las recomendaciones de APHA (1992) para bioensayos semiestáticos .

En los ensayos con larvas jóvenes, el 100% de éstas correspondió al estadio 26; en cambio en los

ensayos con larvas prometamórficas, se emplearon larvas en estadio 28III, 28IV y 29 en partes aproximadamente iguales. Esta condición es muy difícil de eliminar a causa de la modalidad de crecimiento poblacional en cautiverio de las larvas.

I-b.3.c. Procesamiento estadístico

Las CL50 se estimaron por el método Probit. Mediante este programa, que incluye el ajuste de Abbott, se calculan los límites fiduciales por el teorema de Fieller y se aplica el test de X^2 para probar alejamiento del comportamiento lineal (Finney, 1971).

Las CL50 se calcularon para cada serie experimental; aquéllos ensayos de condiciones semejantes, entre los cuales se comprobó superposición de límites fiduciales, se unificaron y se recalcularon las CL 50, con el objeto de tener un valor único para cada condición.

I-b.4. EXPERIENCIAS PARA EVALUAR EL EFECTO DEL CADMIO SOBRE EL BALANCE HIDRICO

I-b.4.a) Condiciones generales de experimentación:

El diseño experimental, los parámetros evaluados y la preparación de soluciones fue la misma que para las experiencias de evaluación cuantitativa del balance hídrico en larvas expuestas a diferentes osmolaridades externas (punto 1-b.2).

De la determinación de la CL50 para larvas jóvenes a 20°C se seleccionó la concentración de 1 ppm de Cd como subletal. Se ensayaron las siguientes soluciones en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd:

- 1) Agua destilada (ADE-0 mOsm) pH:5.3
- 2) Agua dulce artificial (ADA-5 mOsm) pH:6.7.
- 3) Agua dulce artificial concentrada (ADA 30 mOsm) pH:6.8.
- 4) ClNa en ADE (141 mOsm) pH: 6.8.
- 5) Manitol en ADE (MAN-141 mOsm) pH: 5.4.

I-b.4.b) Efecto protector de los iones sobre la toxicidad del cadmio

Los experimentos se efectuaron por duplicado en grupos de 120 larvas (n= 240 larvas por solución). Los muestreos se efectuaron cada 24 hs durante 4 días para cada condición experimental y fueron procesadas con la técnica descrita en I-b.2.b.

I-b.4.b.1) Procesamiento estadístico

A cada uno de los parámetros evaluados y a cada solución experimental se efectuó ANOVA de dos factores para comprobar la existencia de diferencias estadísticamente mensurables en cada solución por la presencia de Cd en función del tiempo (Cappelletti, 1983; Snedecor y Cochran, 1969). Además, todas las variables morfológicas fueron analizadas simultáneamente dentro de un contexto multivariado mediante MANOVA y ADM con el mismo procedimiento que el seguido para las experiencias de equilibrio hídrico y descriptos detalladamente en el punto I-b.2.e). Se evaluó tanto cada solución en función del tiempo, como todas las soluciones para cada tiempo de muestreo.

I-b.4.c) Cambios en la epidermis de larvas incubadas en soluciones de diferente composición química conteniendo cadmio.

Al cabo del tiempo de incubación preestablecido, las larvas se fijaron en glutaraldehído 2.5% durante 24 hs, luego se pasaron a buffer fosfato 0.1 M) para su conservación y posteriormente se deshidrataron por serie de alcoholes y la técnica de punto crítico de acuerdo con el siguiente cronograma:

- 1) alcohol 70°24 hs
- 2) alcohol 90°2 hs
- 3) alcohol 96°2 hs
- 4) alcohol 100°-acetona pura :a)3:13 hs
 - b)1:12 hs
 - c)1:32 hs

5) acetona pura.....3 hs

6) punto crítico de desecación.

Luego se procedió a su montaje y metalizado con oro-paladio de 200 Å de espesor (Echeverría y Fiorito de López, 1992).

El material así procesado se observó con microscopio electrónico de barrido JOEL JSM-U3 operado entre 5 y 15 Kw.

Se fijaron larvas procedentes de la incubación en :

1) ADA-5 mOsm con y sin (c/s) 1 ppm Cd durante 24 hs de exposición.

2) ADA-5 mOsm con 4 ppm de Cd durante 24 hs de exposición.

3) ADA-30 mOsm c/s 1 ppm de Cd durante 48 hs de exposición.

4) ClNa-141 mOsm c/s 1 ppm de Cd durante 48 hs de exposición.

5) ADE-0 mOsm c/s Cd durante 5 hs de exposición.

6) MAN-141 mOsm c/s Cd durante 5 hs de exposición.

I-b.4.d. Contenidos catiónicos intralarvales

Todo el material de vidrio utilizado se lavó sucesivamente con NO_3H 50 % y ClH 50 % durante tres días y luego se enjuagó con agua destilada hasta eliminación total de ácido.

Para cada uno de los tiempos considerados, se tomaron muestras por triplicado de cada una de las soluciones. Se efectuaron tres réplicas para cada tratamiento que integraron las 3 muestras para cada solución. Estas se sometieron a 3 lavados con agua destilada, de 1 minuto cada uno. Las muestras se colocaron en tubos de centrifuga Eppendorf y se llevaron a estufa a 100°C por un lapso no menor de 12 hs para la determinación de peso seco. Posteriormente las muestras fueron mineralizadas con mezcla de ácidos sulfúrico y nítrico (1:2). Las soluciones obtenidas, después que se eliminó el exceso de ácido nítrico hasta la aparición de humos de azufre, fueron llevadas a 10 ml con agua de baja conductancia (MiliQ).

Luego se procedió a la lectura de Na, Ca, Mg, K y Cd en espectrofotómetro de absorción atómica, con llama de aire-acetileno (en los casos de muestras de mayor concentración) y con atomización electrotérmica (para las muestras de Cd, con niveles de ultravestigios).

Se utilizó un equipo de absorción atómica Varian Techtron AA 5R. Para el atomizador electro térmico Varian CRA 63 se utilizó un programa de atomización en modo "STEP" en las condiciones: secado a 100°C (5 seg); calcinación a 500°C (15 seg); atomización a 1800°C (2.5 seg). Los volúmenes de inyección fueron de 1 µl. Cada inyección de patrón y muestra se repitió cuatro veces.

I-b.4.d.1. Procesamiento Estadístico

Las diferencias entre los diferentes tratamientos y tiempos fueron evaluadas mediante el "test" de Kruskal-Wallis, y "test" de comparaciones múltiples, sobre la base de un diseño de un factor con grupos de desigual número de datos.

CAPITULO II

RESULTADOS: PRIMERA PARTE

**EVALUACION CUANTITATIVA DEL BALANCE HIDROMINERAL EN LARVAS
JOVENES DE *Bufo arenarum* EXPUESTAS A SOLUCIONES DE DIFERENTE
OSMOLARIDAD Y COMPOSICION QUIMICA**

II. a - EVALUACION DE LA SUPERVIVENCIA DE LARVAS JOVENES DE Bufo arenarum EN SOLUCIONES DE ELEVADA OSMOLARIDAD, ELECTROLITICA (ClNa) Y NO ELECTROLITICA (MANITOL), EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE "STRESS" PROVOCADO POR LA DENSIDAD DE ORGANISMOS (CL 50).

Tanto en los ensayos en ClNa como en manitol y en las dos densidades ensayadas (1 larva /20 ml y 1 larva/4 ml), la mortalidad en controles (ADA 5 mOsm) fue siempre menor al 5 %.

Manitol: En las Figuras 2 y 3 se representan las curvas de CL50 para cada una de las series experimentales efectuadas, a elevada y baja densidad respectivamente. Puesto que en cada caso, existe superposición de límites fiduciales entre ambas curvas; se unifican las dos series experimentales de acuerdo con la densidad de ensayo. Los resultados que siguen corresponden a este criterio.

En la Figura 4 se observan las curvas de supervivencia en función del tiempo para cada una de las osmolaridades no electrolíticas ensayadas en ambas densidades. El primer resultado que se evidencia es la semejanza entre las curvas obtenidas para las dos densidades. A las 24 hs de exposición, la mortalidad fue menor al 10% en todas las soluciones; a partir de este tiempo la mortalidad se incrementa con la osmolaridad y con el tiempo. En 271 mOsm la disminución de la supervivencia es muy pronunciada entre las 24 y 48 hs y luego disminuye notablemente. En 247 mOsm la supervivencia disminuye en forma continua, con una pendiente cercana a 1, en tanto que en 204 mOsm la mortalidad no supera el 30 % a los 5 días de ensayo.

Los resultados correspondientes a la CL50 para manitol a las dos densidades, se encuentran en la Tabla 1. Para las osmolaridades ensayadas, a las 24 hs no se obtienen valores de CL50. En los tiempos restantes no existen diferencias entre los valores de CL50 entre las dos densidades.

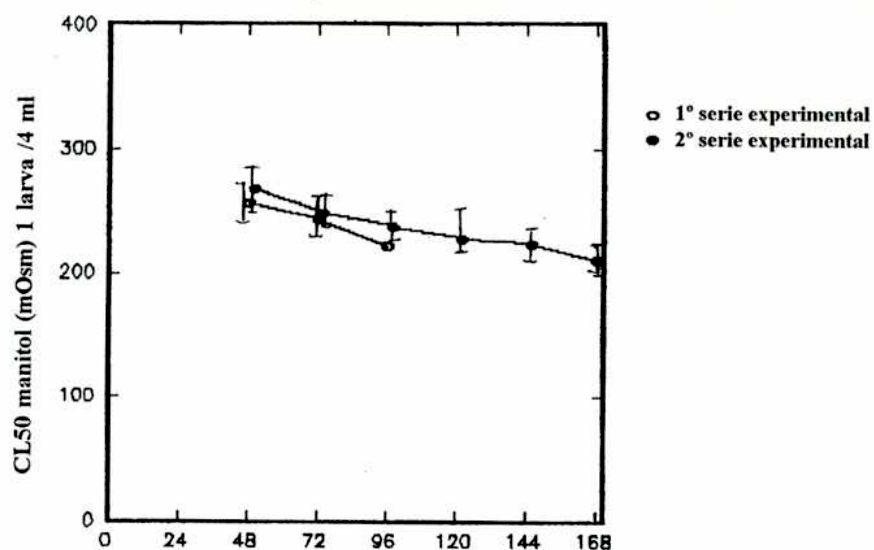


Figura 2: Valores de CL50 (mOsm) de manitol, con sus correspondientes límites fiduciales, en función del tiempo, para larvas jóvenes (estadio 26) de *Bufo arenarum* a 20°C y densidad elevada (1 larva/4 ml de solución).

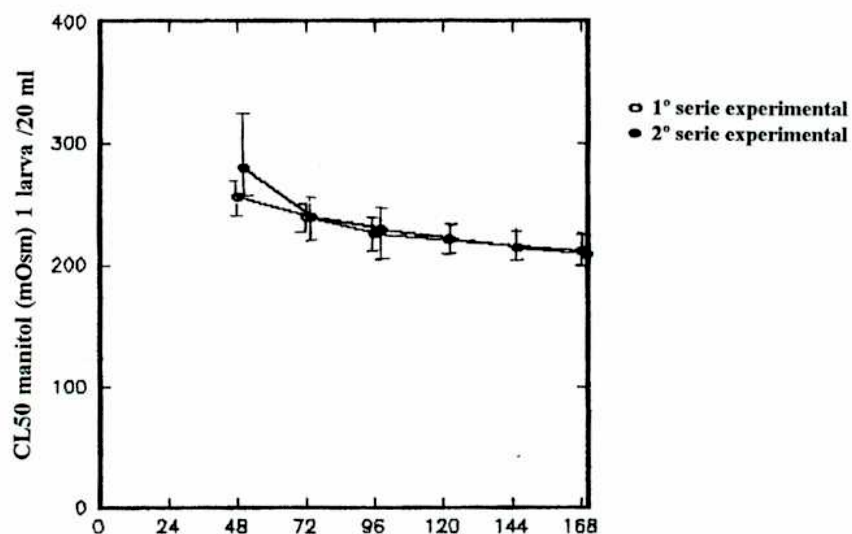


Figura 3: Valores de CL50 (mOsm) de manitol, con sus correspondientes límites fiduciales, en función del tiempo, para larvas jóvenes (estadio 26) de *Bufo arenarum* a 20°C y densidad baja (1 larva/20 ml de solución).

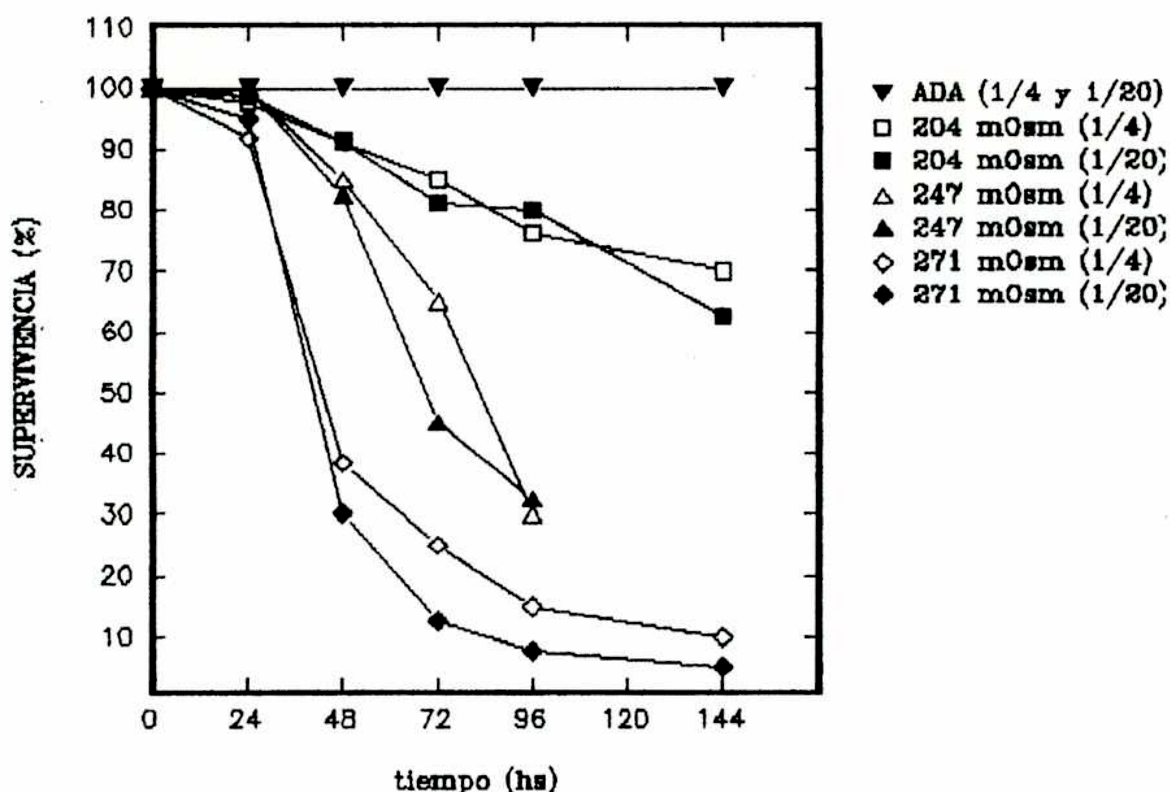


Figura 4: Porcentaje de supervivencia en función del tiempo para larvas jóvenes (estadio 26) de *Bufo arenarum* expuestas a distintas osmolaridades de manitol a 20°C y dos condiciones de densidad. Para la densidad de 1 larva/4 ml ADA y 204 mOsm, n: 80 por solución; 247 mOsm, n:20 larvas y 271 mOsm, n:60 larvas. Para los ensayos de densidad 1 larva/20 ml de solución ADA, 204 y 271 mOsm, n: 80 larvas por solución; 247 mOsm, n: 40 larvas.

CINa: En las Figuras 5 y 6 se representan las curvas de CL50 para cada una de las series experimentales, a elevada y baja densidad respectivamente. En una de las tres series experimentales no se ensayó la osmolaridad de 247 mOsm, por ello la curva de CL50 comienza a las 96 hs. Considerando la superposición de los límites fiduciales entre los distintos bioensayos, se unificaron las series experimentales de acuerdo con la densidad de ensayo. Los resultados que siguen corresponden a este criterio.

Tabla 1: Valores de CL50 (mOsm) de manitol en larvas jóvenes de Bufo arenarum en dos condiciones de densidad (1 larva/4 ml y 1 larva/20 ml) (grados de libertad:3). N=40 larvas/solución.

densidad	tiempo hs)	CL50 (mOsm)	límites fiduciales	b	coef. correl.	X ²
<u>1 larva</u> 4 ml	48	262.9	252.2-278.8	13.14	0.94	4.64
	72	245.8	236.7-256.8	13.42	0.97	2.52
	96	228.7	220.4-237.3	14.28	0.99	0.35
	144	221.5	208.8-233.4	14.64	0.99	0.04
<u>1 larva</u> 20 ml	48	267.4	262.1-274.4	29.20	0.99	0.25
	72	241.2	234.5-247.5	21.23	0.99	0.53
	96	230.1	223.4-236.4	18.8	0.99	0.68
	144	224.6	215.0-234.9	20.16	0.99	0.06

En la Figura 7 se representan las curvas de supervivencia en función del tiempo para cada una de las osmolaridades ensayadas a ambas densidades. También en este caso el efecto sobre la supervivencia se manifiesta a partir de las 48 hs de exposición, y luego de este tiempo la mortalidad se incrementa en forma continua con el tiempo, pero a diferencia de lo observado con manitol, para 247 y 271 mOsm la pendiente de las curvas de supervivencia entre ambas densidades fue diferente para cada una. Sin embargo, al final del bioensayo se obtuvieron valores muy cercanos para las dos densidades. En 204 mOsm la mortalidad final fue de alrededor del 30%.

En la Tabla 2 se hallan los valores de CL50 de ClNa a las dos densidades. A las 24 hs no se obtienen valores de CL50. Existe superposición de límites fiduciales a las 48 y 144 hs pero no en los tiempos intermedios.

En la Figura 8 se representan las curvas de CL50 con sus límites fiduciales, de ClNa y manitol a las dos densidades ensayadas. Es evidente que el efecto sobre la mortalidad es muy semejante entre ambas soluciones para iguales osmolaridades de ensayo y a las dos densidades utilizadas.

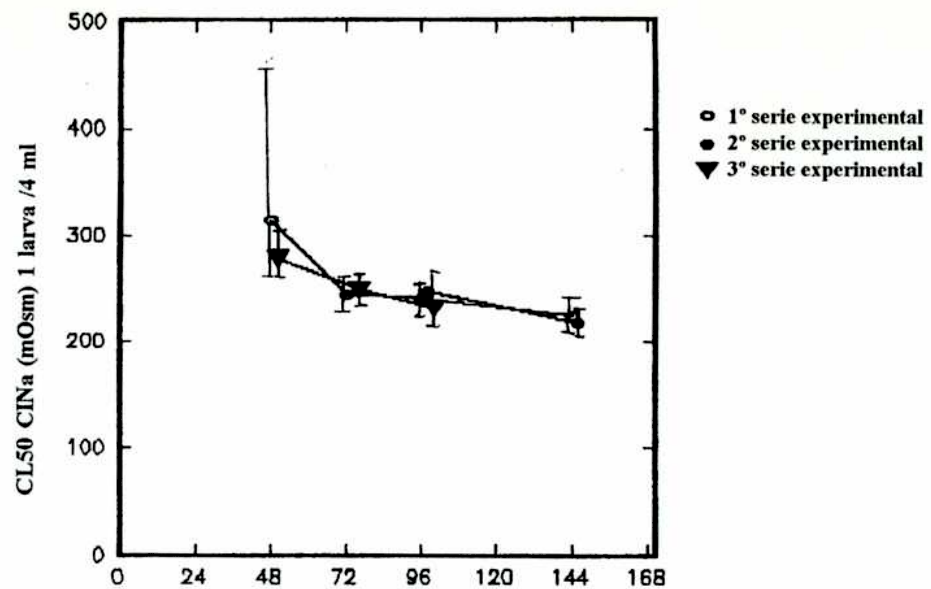


Figura 5: Valores de CL50 (mOsm) de ClNa, con sus correspondientes límites fiduciales, en función del tiempo, para larvas jóvenes (estadio 26) de *Bufo arenarum* a 20°C y densidad elevada (1 larva/4 ml de solución).

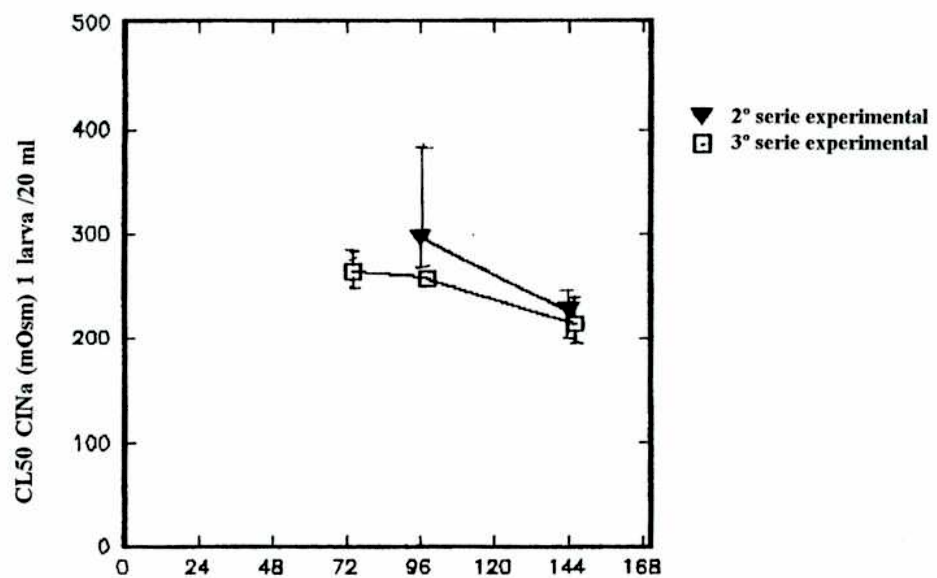


Figura 6: Valores de CL50 (mOsm) de ClNa, con sus correspondientes límites fiduciales, en función del tiempo, para larvas jóvenes (estadio 26) de *Bufo arenarum* a 20°C y densidad baja (1 larva/20 ml de solución).

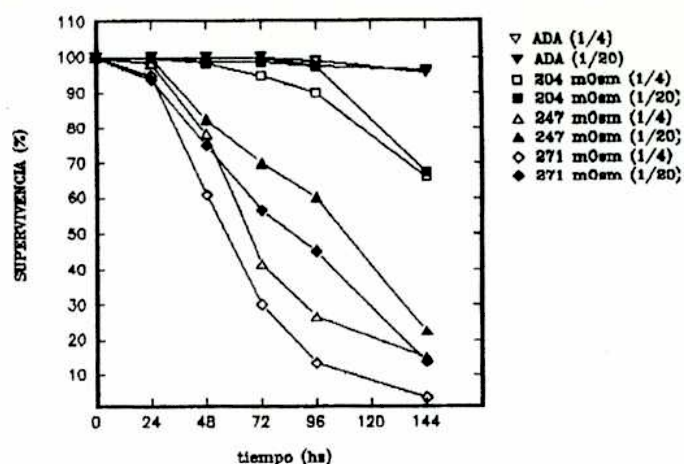


Figura 7: Porcentaje de supervivencia en función del tiempo para larvas jóvenes (estadio 26) de Bufo arenarum expuestas a distintas osmolaridades de ClNa a 20 C y dos condiciones de densidad. Para la densidad de 1 larva/4 ml ADA, n: 118; 204 mOsm y 271 mOsm, n: 120 por solución y 247 mOsm, n: 60 larvas. Para los ensayos de densidad 1 larva/20 ml de solución ADA, 204 y 271 mOsm, n: 80 larvas por solución; 247 mOsm, n:40 larvas.

Tabla 2: Valores de CL50 (mOsm) para ClNa en larvas jóvenes de Bufo arenarum en dos condiciones de densidad (1 larva/4 ml y 1 larva/20 ml) (grados de libertad: 3). N= 80 larvas/solución.

densidad	tiempo (hs)	CL50 (mOsm)	límites fiduciales	b	coef. correl.	X ²
1 larva 4 ml	48	282.2	272.6-297.8	14.76	0.99	0.20
	72	249.4	243.9-255.2	17.46	0.98	4.18
	96	235.3	230.3-240.2	19.78	0.99	2.01
	144	215.1	209.5-220.2	17.94	0.99	6.00
1 larva 20 ml	48	305.6	285.2-364.1	12.01	0.97	0.81
	72	274.8	265.6-289.8	15.83	0.98	1.48
	96	263.7	256.0-273.8	16.35	0.98	1.58
	144	220.6	211.1-228.5	12.83	0.99	0.45

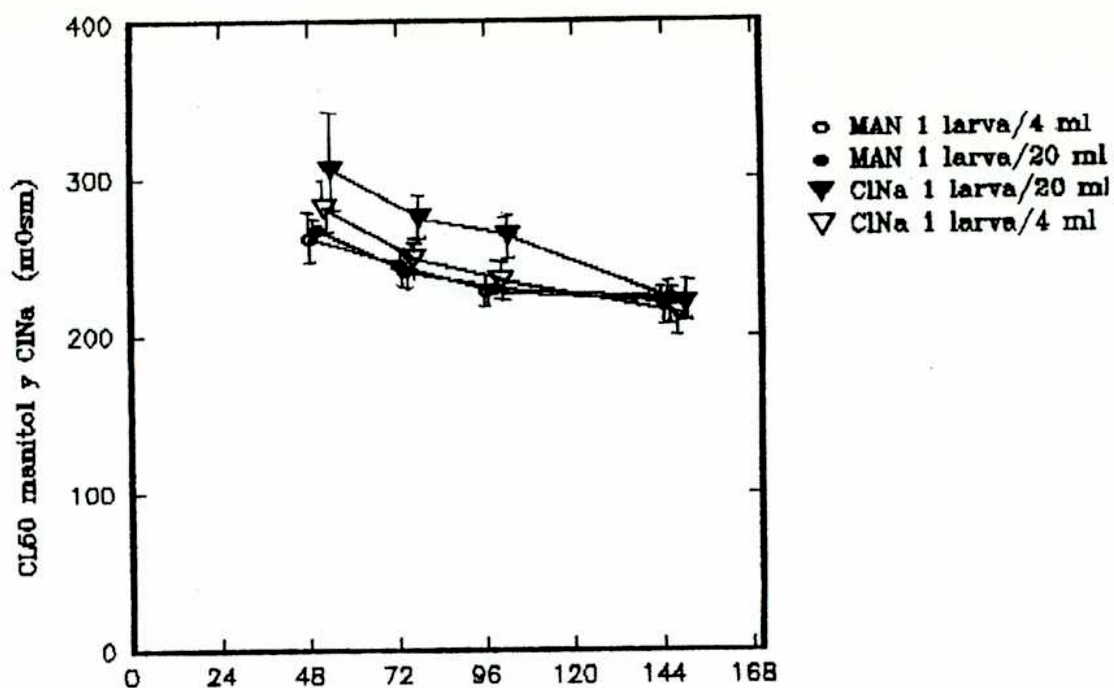


Figura 8: Valores de CL50 (mOsm) con sus correspondientes límites fiduciales para larvas jóvenes de Bufo arenarum expuestas a ClNa y Manitol en dos condiciones de densidad.

Se pueden definir las siguientes osmolaridades letales (expresadas como valor medio $\pm$ ESM en mOsm):

CL50 48 hs = 279 ± 9.62 mOsm y CL50 144 hs = 220.45 ± 1.98 mOsm.

II - b. EXPOSICION A SOLUCIONES NO ELECTROLITICAS (D-MANITOL) DE 0 A 271 mOsm EN CONDICIONES AGUDAS

Con el objeto de obtener una información acerca de la dispersión de valores en la población total de datos de toda la experiencia, en la Tabla 3 se muestra un resumen de valores estadísticos para cada parámetro estudiado.

Tabla 3: Media aritmética (x), desvío estándar (ds), coeficiente de variación experimental (coef. var.), valor mínimo (min) y valor máximo (max) para cada parámetro analizado, considerando todos los valores experimentales. (N= 407)

PH: peso húmedo (mg); PS: peso seco (mg); CA: contenido de agua (mg agua/mg PS); H: humedad (%).

	x	ds	coef.var.	min	ma
PH	27.82	7.43	0.26	14.72	48.97
PS	1.68	0.32	0.19	0.92	2.59
CA	15.95	4.48	0.28	7.61	25.52
H	93.63	1.89	0.02	88.39	96.23

II-b.1- Análisis de regresión para cada parámetro considerado

En la Tabla 4 se presentan las ecuaciones del modelo ajustado por regresión múltiple con el correspondiente coeficiente de correlación para cada una de las variables en estudio así como el intervalo en el cual oscilaron los coeficientes de variación. Para cada parámetro se indica la significatividad estadística de cada uno de los términos de la ecuación.

Tabla 4: Ecuaciones de regresión múltiple para PH, PS, CA y H de larvas jóvenes de Bufo arenarum expuestas a soluciones de diferente concentración de manitol desde 0 (ADE) a 270 mOsm durante 240 hs.

R: coeficiente de correlación; coef var: intervalo en el cual oscilaron los coeficientes de variación experimentales; h: hora; c: concentración de la solución (mOsm); s: significatividad estadística ($p < 0.01$).

Parámetro morfológico	Ecuación	R	coef.var
PH	$34.31 - 0.05 h - 0.09 c$ h:s; c:s;	0.55	0.03-0.22
PS	$1.70 - 0.27E-02 h + 0.49E-02 c$ h:s; c:s;	0.80	0.05-0.20
CA	$18.72 + 0.31E-02 h^2 - 0.09 c$ h:s; c:s;	0.68	0.03-0.22
H	$94.85 + 0.14E-04 h^2 - 0.04 c$ h:s; c:s;	0.70	0.01-0.18

En las Figuras 9 a 12 se presentan los valores medios experimentales y los valores esperados de PH, PS, CA y H respectivamente, calculados de acuerdo con el modelo de regresión múltiple, .

Peso Húmedo (Figura 9,A): En los controles (larvas mantenidas en ADA, ADE y 5 mOsm MAN) el PH disminuye en forma abrupta hasta las 72-96 hs y luego se estabiliza, con la excepción de ADE, en la cual el PH continúa disminuyendo hasta el final del período experimental. El descenso del PH en ADA es menor que en 5 mOsm y ADE ; las larvas de 5 mOsm MAN alcanzan valores muy cercanos a ADA al final del experimento.

Las larvas expuestas a las otras soluciones experimentales sufren una disminución mucho

mayor (superior al 25%) del PH en las primeras 24 hs que los controles. A 70 y 141 mOsm logran estabilizar el PH a partir de las 48-72hs; en tanto que en 204 mOsm el descenso es continuo. En 247 y 272 mOsm las larvas mueren antes de las 48 hs.

Se observa que, en general, las muertes ocurren cuando las larvas alcanzan PH 50% inferiores al correspondiente a larvas en ADA a las 24 hs.

El coeficiente de correlación (R) para el modelo ajustado con regresión múltiple es relativamente bajo, probablemente como consecuencia de la variabilidad del PH. No obstante, analizando los resultados a partir del modelo (Figura 9,B) podemos concluir que, en general, la tendencia del PH es a disminuir con el tiempo de incubación y con el incremento de la osmolaridad, siendo esta última, el factor más importante. Dichas observaciones coinciden con aquéllas experimentales.

Peso Seco: en los controles existe la tendencia a la disminución del PS en función del tiempo (Figura 10,A), la que puede interpretarse como una consecuencia del ayuno. En las larvas expuestas a ADE, dicha tendencia es mucho mas acentuada, especialmente a partir de las 144-168 hs.

En los grupos experimentales, el PS muestra la misma tendencia a disminuir en el tiempo que los controles pero, con excepción de las larvas de 70 mOsm, el PS siempre fue mayor que en estos para todos los tiempos de exposición.

De acuerdo con el modelo de regresión (Figura 10,B) se puede concluir que el PS de las larvas disminuye con el tiempo y que, contrariamente a lo que ocurre con el PH, el PS de las larvas entre 70 y 204 mOsm se incrementa con la osmolaridad externa.

Contenido de agua: los cambios deben interpretarse como el resultado del efecto combinado de PH y PS. La respuesta de las larvas a las condiciones experimentales (Figura 11,A) muestra dos períodos bien claros: el primero corresponde a las 24 hs iniciales en las que se produce un substancial descenso del CA tanto en controles como en experimentales; el segundo se observa a partir de las 96 hs de exposición cuando el CA aumenta, indudablemente como consecuencia del aumento del PH junto a un descenso

proporcionalmente menor del PS.

Los resultados experimentales concuerdan muy bien con los esperados por cálculo a partir de la ecuación de regresión (Figura 11,B) y muestran: a) tendencia a la reducción del CA con la osmolaridad y b) incremento del CA con el tiempo de incubación.

Porcentaje de Humedad: este valor presentó el mismo patrón de variación que el CA (Figura 12,A); sin embargo, si bien la tendencia de la H es a una leve disminución con la osmolaridad y a un leve aumento de ésta con el tiempo de exposición, la incidencia de la osmolaridad entre 141 y 204 mOsm es mucho más importante que la influencia del tiempo de incubación. Estos resultados coinciden con los esperados según el modelo de regresión (Figura 12,B).

En resumen:

- En el grupo de controles, hasta las 168 hs, ADA presenta valores mayores de PH y PS que ADE y 5 mOsm . A partir de 144-168 hs los valores de 5 mOsm convergen con los valores de ADA y los de ADE divergen a causa del descenso del PH y PS hasta el 50% del valor de PH en ADA 24 hs a las 240 hs.
- En 70 mOsm, al comienzo del ensayo, las larvas presentan valores intermedios entre aquellos del grupo de controles y los restantes del grupo de soluciones experimentales para los cuatro parámetros considerados. acercándose paulatinamente a los valores de controles y logran no diferenciarse de éstos al décimo día de exposición (240 hs).
- En 141, 176 y 204 mOsm, a las 24 hs todas las variables presentan valores similares entre sí y cercanos al 50% de los valores correspondientes a ADA 24 hs. En ningún caso logran compensarse hasta los valores de controles.
- En 247 y 271 mOsm, a las 24 hs todas las variables presentaron valores inferiores al 50% de los correspondientes a ADA 24 hs y las larvas no logran sobrevivir hasta las 48 hs de exposición.
- Para los cuatro parámetros, tanto el tiempo como la osmolaridad fueron estadísticamente significativos (Tabla 4)

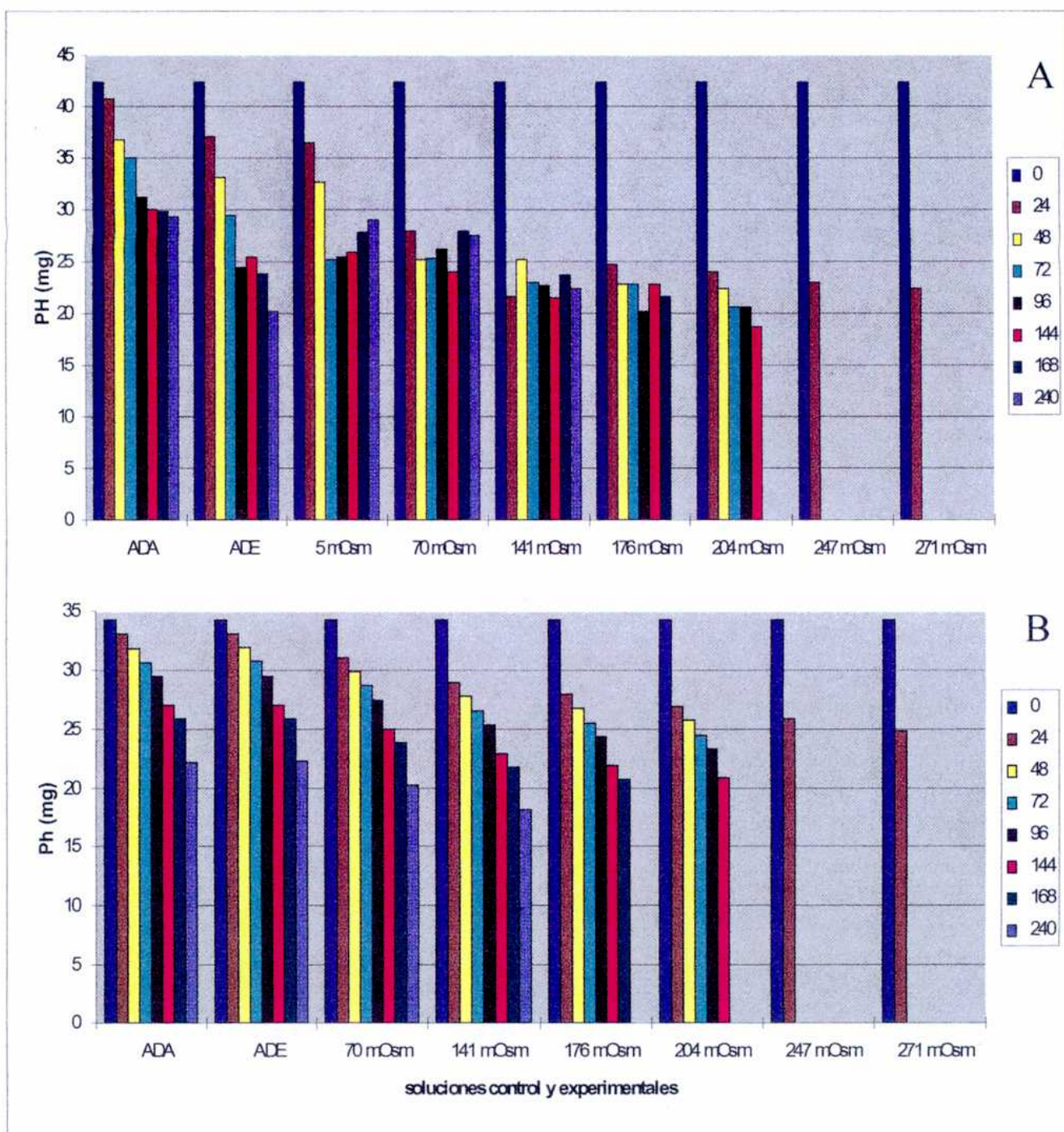


Figura 9: Variación del peso húmedo (PH), de larvas jóvenes de *Bufo arenarum* expuestas a soluciones de diferentes osmolaridades no electrolíticas (D-manitol) en función del tiempo y de la osmolaridad del medio de incubación. A: valores medios experimentales ; B: valores esperados, calculados de acuerdo con la ecuación de regresión múltiple seleccionada.

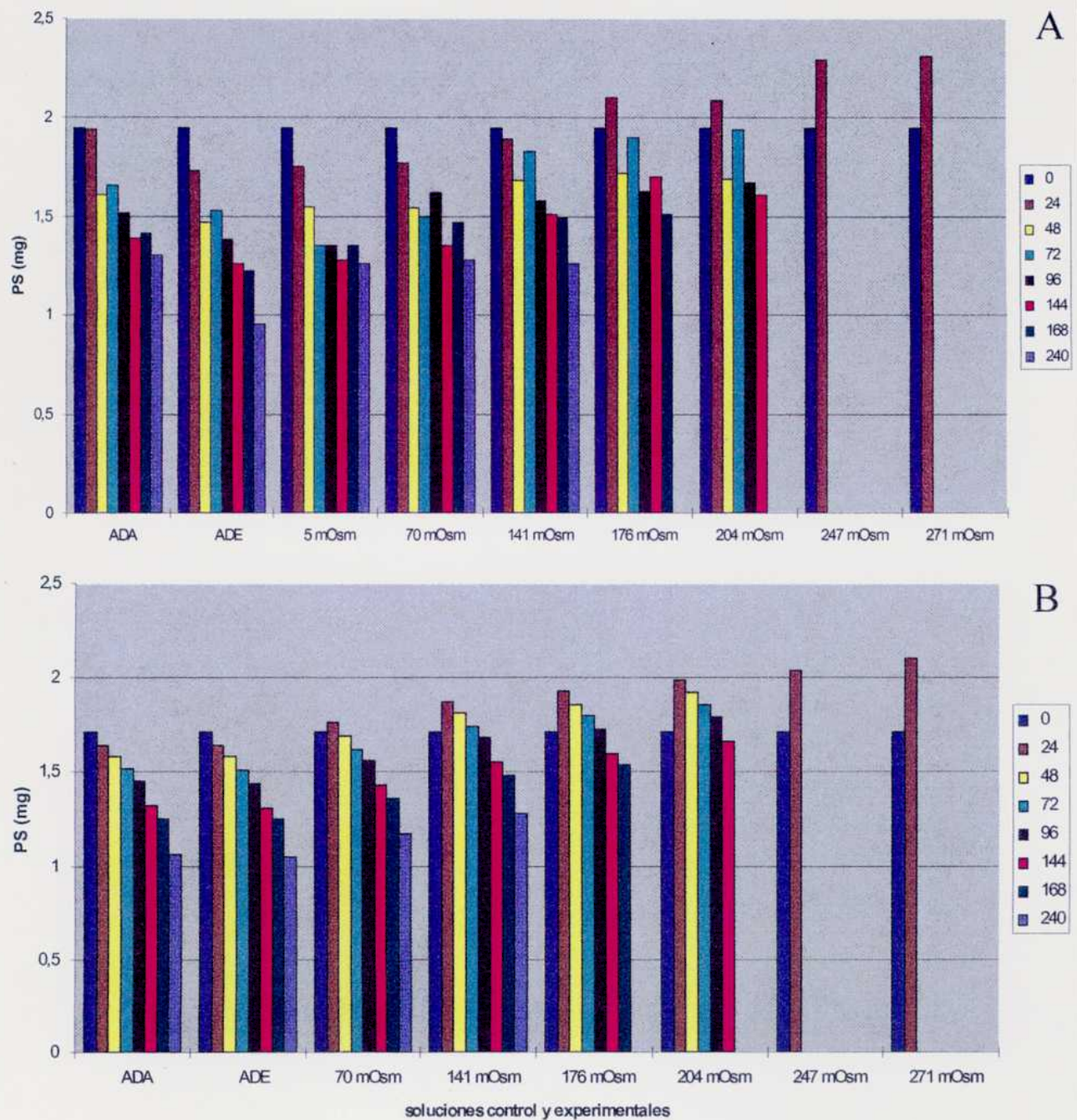


Figura 10: Variaciones del PS en larvas jóvenes de Bufo arenarum expuestas a soluciones de diferentes osmolaridades no electrolíticas (D-Manitol) en función del tiempo y de la osmolaridad del medio de incubación. A: valores medios experimentales; B: valores esperados calculados de acuerdo a la ecuación de regresión múltiple seleccionada.

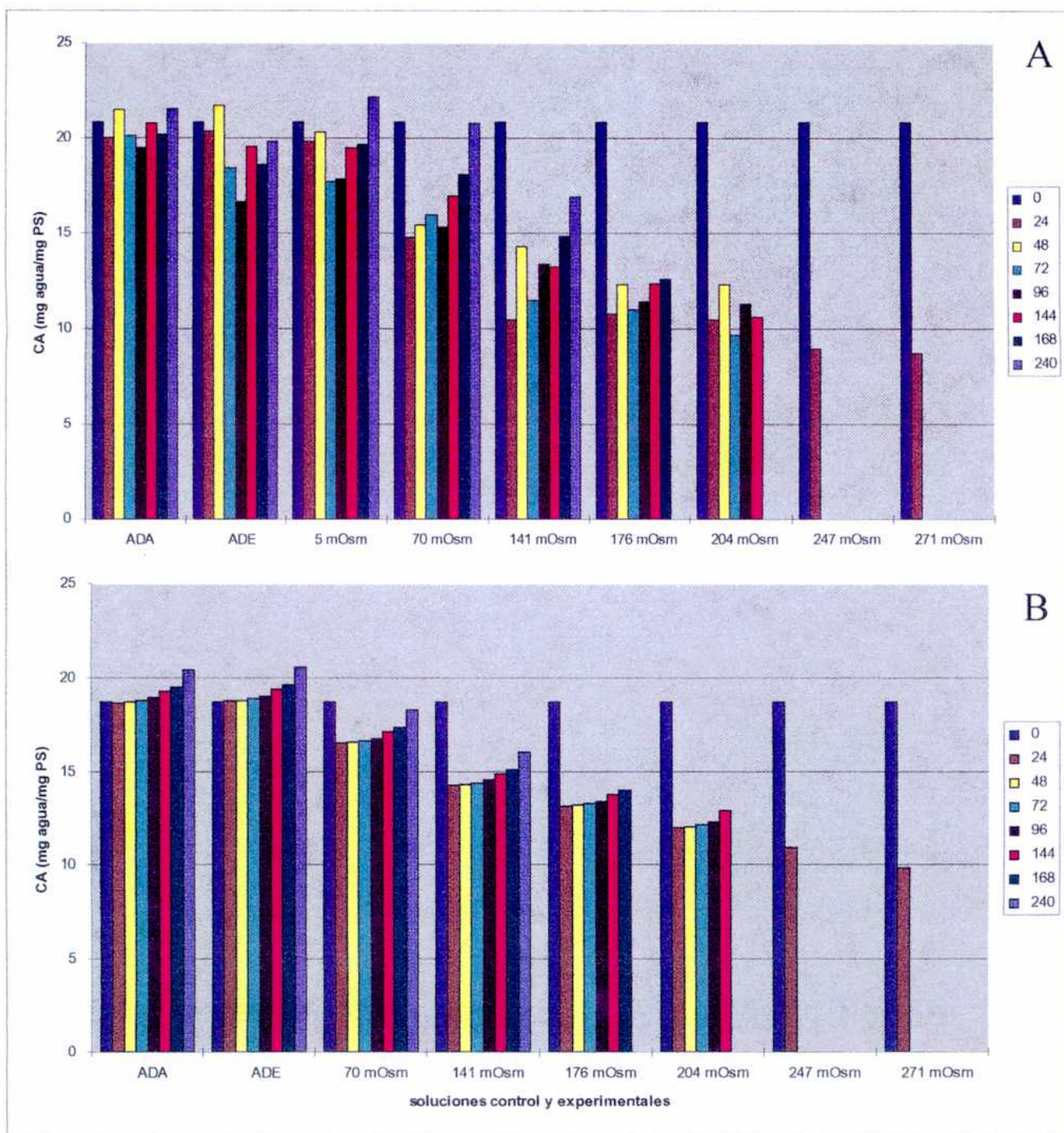


Figura 11: Variaciones del CA en larvas jóvenes de *Bufo arenarum* expuestas a soluciones de diferente osmolaridad no electrolítica (D-Manitol) en función del tiempo y de la osmolaridad del medio de incubación. A: valores medios experimentales; B: valores esperados calculados de acuerdo con la ecuación de regresión múltiple seleccionada.

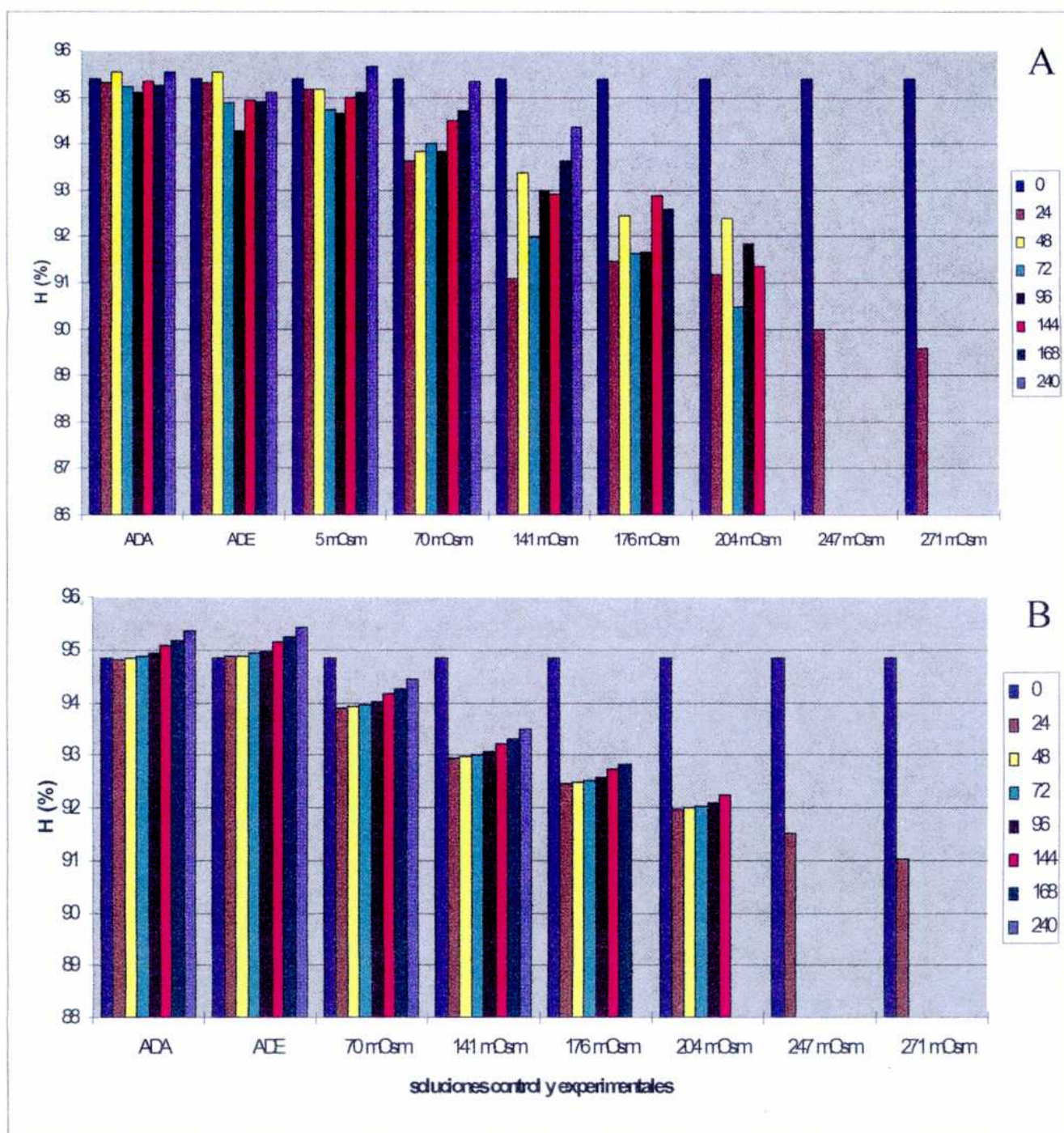


Figura 12: Variaciones de H de larvas jóvenes de Bufo arenarum expuestas a soluciones de diferente osmolaridad no electrolítica (D-manitol) en función del tiempo y de la osmolaridad del medio de incubación. A: valores medios experimentales ; B: valores esperados calculados de acuerdo con la ecuación de regresión múltiple seleccionada

II.b.2- Análisis Discriminante Múltiple

a) Análisis discriminante para cada una de las soluciones ensayadas:

Los valores de autovectores para la primera y segunda variable canónica (VC1 y VC2 respectivamente), así como el porcentaje explicado de la variación experimental total (VAR) se encuentran en la Tabla 5. Para cada VC se indican los autovectores correspondientes a los cuatro parámetros estudiados, siendo el de mayor valor absoluto aquél de más incidencia en la capacidad discriminante.

En las figuras correspondientes a este análisis (Figuras 13 y 14) se representa la posición relativa de los datos, analizados considerando a las cuatro variables en forma integrada, así como el valor medio para cada unidad muestral (encerrado en un círculo). A fin de facilitar la interpretación de los gráficos se esquematiza aparte, para cada condición ensayada, la posición de las medias; en este caso, los números encerrados en círculos indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el "test" de comparaciones múltiples.

Soluciones control:

ADA (Figura 13,A): El comportamiento en conjunto de los parámetros fue relativamente uniforme durante todo el tiempo de exposición, con una inflexión marcada a las 24 hs, debida principalmente a cambios de la H (Tabla 5).

ADE (Figura 13,B): Se observa una diferenciación entre tiempos a causa de modificaciones en el PS y una estabilización temporal entre las 96 y 168 hs.

5 mOsm (Figura 13,C): El comportamiento integrado de las variables es cercano al observado en ADA; en este caso se evidencia una tendencia a equiparar las condiciones experimentales iniciales. A diferencia de ADA el parámetro de mayor capacidad discriminante es el PS (Tabla 5).

Tabla 5: Respuesta integrada de larvas de Bufo arenarum en función del tiempo a la exposición aguda de diferentes concentraciones de manitol, para cada una de las soluciones ensayadas: análisis discriminante múltiple.

ADA: agua dulce artificial; ADE: agua destilada; 5-271 mOsm soluciones de manitol; PH: peso húmedo; PS: peso seco; CA: contenido de agua; H: porcentaje de humedad. Los valores numéricos representan los autovectores para la primera y segunda variable canónica (VC1 y VC2). VAR: porcentaje acumulado de la dispersión total.

soluciones		PH	PS	CA	H	VAR
ADA	VC1	0.21	1.24	-0.78	3.22	0.86
	VC2	0.24	-5.19	-0.63	-1.39	0.95
ADE	VC1	0.46	-1.35	-0.33	-0.22	0.89
	VC2	0.18	-4.47	-0.48	-1.26	0.96
5 mOsm MAN	VC1	0.01	-6.55	-0.35	0.28	0.78
	VC2	1.24	-25.56	-2.08	0.33	0.97
70 mOsm MAN	VC1	-1.39	21.22	0.01	5.43	0.63
	VC2	-0.24	8.97	-0.09	0.64	0.91
141 mOsm MAN	VC1	-1.45	18.44	0.19	3.16	0.83
	VC2	0.25	-0.72	-0.07	-1.39	0.96
176 mOsm MAN	VC1	0.39	2.13	-0.61	0.99	0.84
	VC2	0.02	5.03	-0.12	-0.09	0.97
204 mOsm MAN	VC1	-1.10	10.70	-0.48	2.96	0.94
	VC2	-0.03	4.86	0.34	-0.88	0.99
247 mOsm MAN	VC1	0.41	-4.00	0.37	-0.42	1.00
271 mOsm MAN	VC1	0.36	-2.21	0.49	-0.78	1.00

Soluciones experimentales:

En todos los casos la variable de mayor poder discriminante es el PS. (Figura 13, D-I y Tabla 5).

Se evidencia una tendencia de los animales a restablecer las condiciones iniciales de la

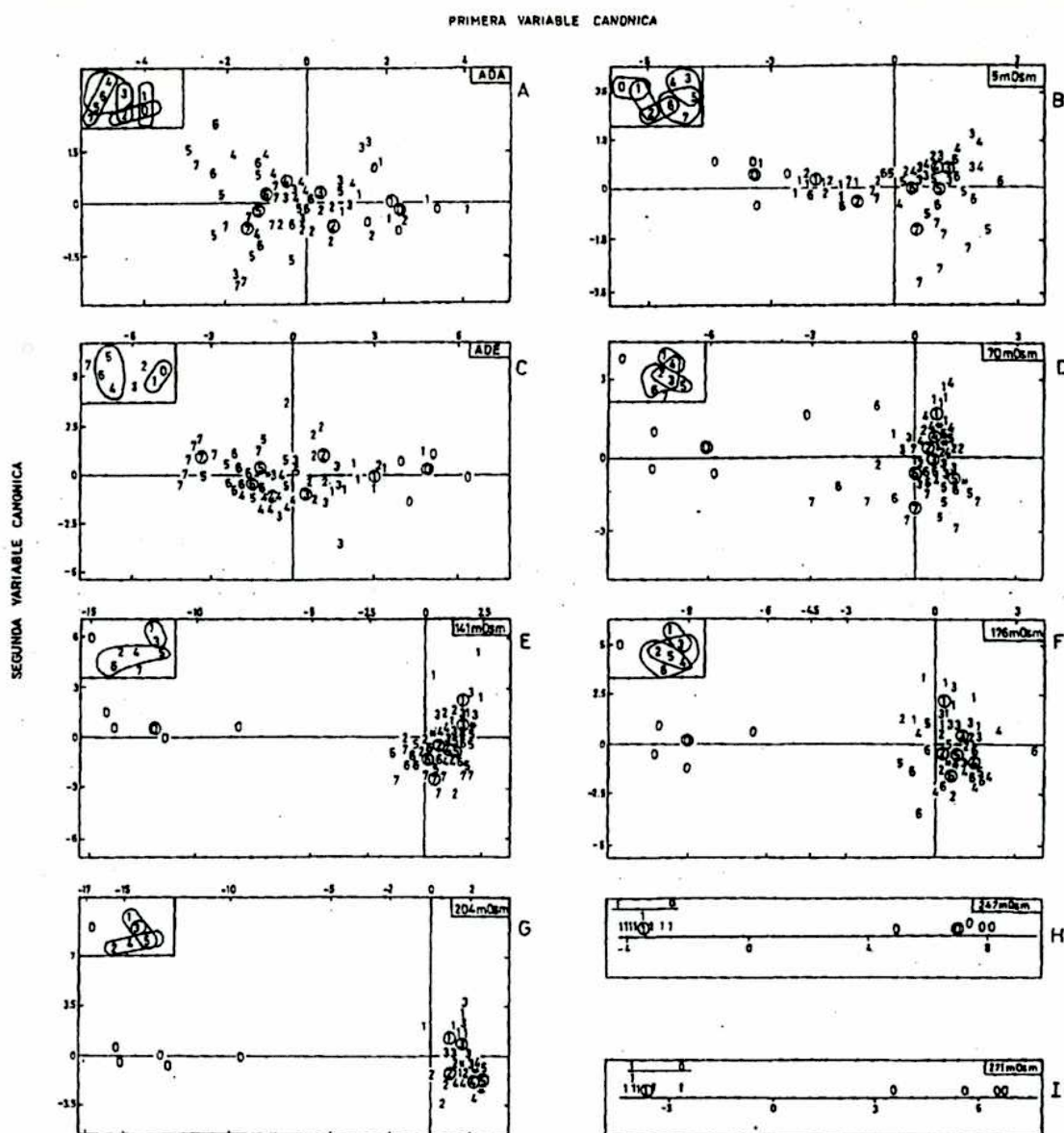


Figura 13: Análisis discriminante para las soluciones controles y de manitol.

0: 0h, 1: 21h, 2: 48h, 3: 72h, 4: 96h, 5: 144h, 6: 168h, 7: 240 h. Los números representan la posición relativa de cada animal para cada tiempo evaluado.

El número encerrado en un círculo representa el valor medio para cada tiempo. En el margen superior izquierdo de cada gráfico se esquematiza la media para cada tiempo: los números encerrados en círculos no presentan diferencias estadísticamente significativas según el test de comparaciones múltiples.

condiciones iniciales de la experiencia, con fluctuaciones intermedias, especialmente pronunciadas a las 24 hs y 72 hs. Entre 70 y 176 mOsm existe imposibilidad de compensación luego del séptimo día de experimentación y desde el sexto para 204 mOsm. A partir de 247 mOsm las larvas no sobreviven a las 48 hs de exposición.

Se puede afirmar que : a) en tanto que en los controles no existen diferencias significativas entre el tiempo 0 y las 24 hs, en las soluciones experimentales esta diferencia aumenta con el incremento de la osmolaridad y b) a partir de 141 mOsm, a las 72 hs los valores observados no difieren significativamente de los de las 24 hs; a las 48 hs no difieren de las horas posteriores.

b) Análisis discriminante para cada uno de los tiempos muestreados:

Considerando que se analiza el comportamiento simultáneo de las variables estudiadas, se denominan grupos a los conjuntos de concentraciones que no muestran diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

En la Tabla 6 se encuentran los valores de autovectores para la VCI y VC2 , así como el porcentaje explicado de la variación experimental total.

24 hs (Figura 14,A): El CA (VC1) discrimina entre controles, 70 mOsm y las concentraciones restantes . La variable de mayor incidencia discriminante entre soluciones superiores a 70 mOsm es el PS (VC2).

48 hs (Figura 14,B): El PS (VC 1 y 2) discrimina en tres grupos bien definidos: controles, osmolaridades intermedias (70 y 141 mOsm) y osmolaridades altas (176 y 204 mOsm)

72 hs (Figura 14,C): En este tiempo ADA se diferencia en PS y H de los dos controles restantes. Setenta mOsm no se diferencia de 5 mOsm y el comportamiento en conjunto de los parámetros a 141 mOsm es similar al observado en 176 mOsm.

96 - 240 hs (Figura 14,D, E, F y G): ADA aún se diferencia de los otros controles. La respuesta integral de las larvas a 141, 176 y 204 mOsm es similar; 70 mOsm no se diferencia de 141 mOsm.

Tabla 6: Respuesta integrada de las larvas de Bufo arenarum expuestas a diferentes concentraciones de manitol para cada uno de los tiempos muestreados, entre todas las soluciones ensayadas: análisis discriminante múltiple.

Para su interpretación remitirse a leyenda de la Tabla 3.

tiempos		PH	PS	CA	H	VAR
24 hs	VC1	-0.11	0.81	1.23	-0.61	0.91
	VC2	0.26	-5.82	-1.27	1.52	0.96
48 hs	VC1	0.28	-2.52	-0.31	-1.34	0.90
	VC2	0.98	-15.70	-0.18	-4.20	0.96
72 hs	VC1	0.44	-5.24	-0.10	0.08	0.82
	VC2	0.37	-1.56	0.47	-2.12	0.97
96 hs	VC1	0.97	-15.58	-0.16	-1.60	0.82
	VC2	1.19	-12.56	-0.93	-1.86	0.94
144 hs	VC1	0.26	-5.83	0.12	0.12	0.86
	VC2	0.66	-17.68	-0.95	-0.76	0.94
168 hs	VC1	-0.04	-0.03	-0.50	3.72	0.88
	VC2	0.19	-1.50	1.36	-4.43	0.95
240 hs	VC1	-0.12	9.01	1.34	-4.17	0.88
	VC2	1.97	41.77	-3.04	4.59	0.98

Para 144 y 168 hs la respuesta integrada es semejante entre el grupo control y 70 mOsm. Las restantes soluciones se diferencian de este grupo y entre sí.

A las 240 hs ADE se separa claramente de las restantes soluciones fundamentalmente debido al PS.

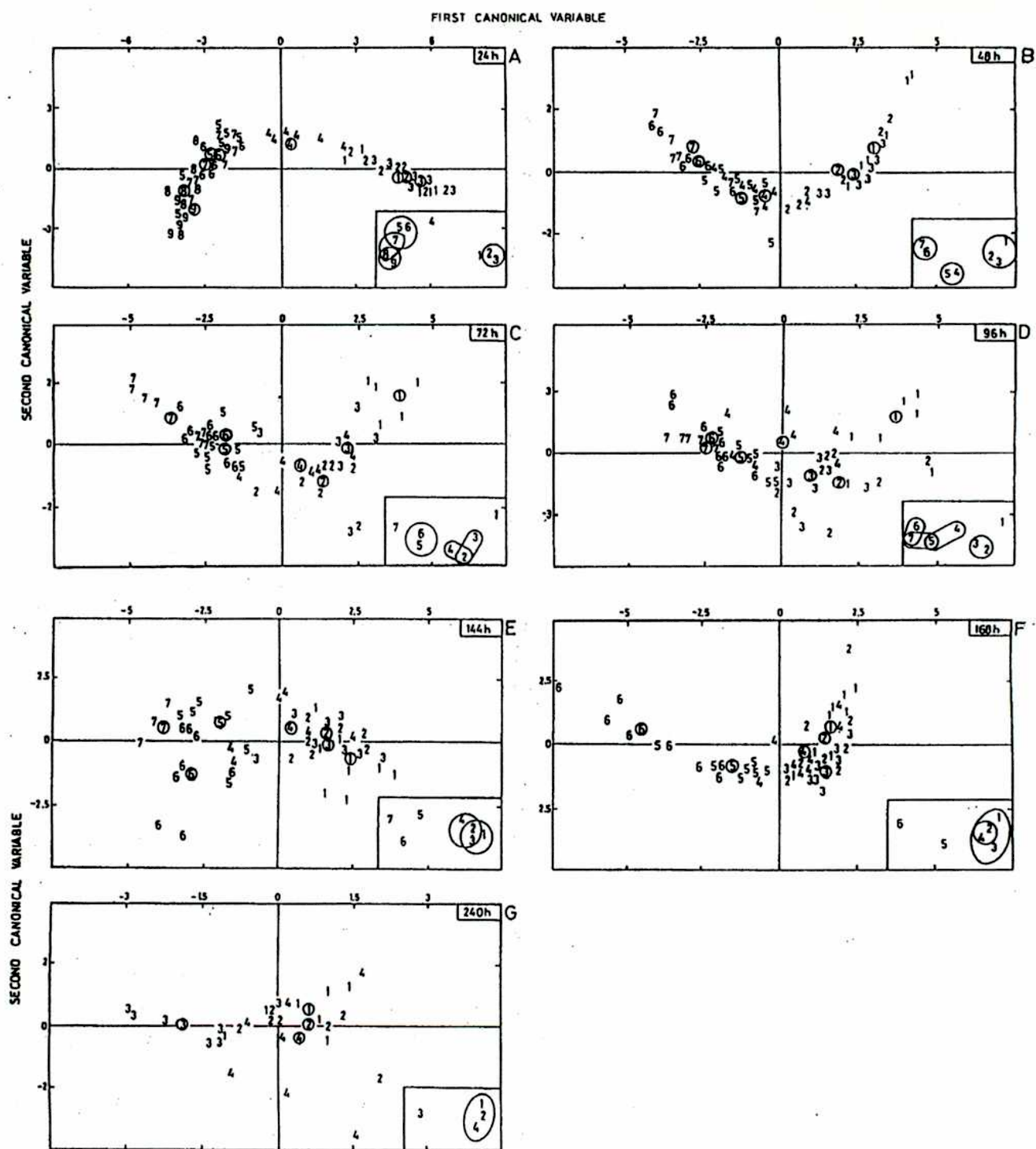


Figura 14: Análisis discriminante múltiple para cada tiempo ensayado entre las distintas soluciones.

1: ADA, 2: ADE, 3: 5 mOsm MAN, 4: 70 mOsm, 5: 141 mOsm, 6: 176 mOsm, 7: 204 mOsm, 8: 247 mOsm, 9: 271 mOsm. Los números representan la posición relativa de las larvas de cada solución para cada tiempo evaluado. Los números encerrados en círculo representan la media para cada solución. En el margen inferior derecho de cada gráfico se esquematizan las medias para cada solución: los números encerrados en círculos no difieren en forma estadísticamente significativa, de acuerdo con el test de comparaciones múltiples.

Resumiendo: En los experimentos en 141, 176 y 204 mOsm, todos los parámetros medidos son similares luego de las 24 hs de incubación (Figuras 13 y 14); se mantienen aproximadamente en 50% de los observados para ADA 5 mOsm a las 24 hs, y no se hallan indicios de compensación alguna (entendiendo por tal el acercamiento de los parámetros medidos a los valores del control). La respuesta a la elevación de la presión osmótica externa es del tipo de deshidratación gradual. Cuando la osmolaridad externa es de 247 mOsm, los parámetros evaluados resultan menores al 50% de los ADA 5 mOsm -24 hs y la supervivencia se reduce a menos de 48 hs. En general las larvas mueren dentro de las 48 hs cuando su PH y CA se reduce a menos del 50% del de control.

II-c. EXPOSICION A SOLUCIONES ELECTROLITICAS (CINa) DE 70 A 270 mOsm EN CONDICIONES AGUDAS

En la Tabla 7 se muestra, para cada variable analizada, la evaluación estadística de la población total de datos experimentales

Tabla 7: Media aritmética(x), desvío estándar (ds), coeficiente de variación experimental (coef var), valor mínimo (min) y valor máximo (max) para cada parámetro analizado, considerando todos los valores experimentales (N= 210).

PH: peso húmedo (mg); PS: peso seco (mg); CA: contenido de agua (mg agua/mg PS); H: humedad (%).

	x	ds	coef.var.	min	máx
PH	38.91	6.40	0.16	24.21	51.81
PS	1.76	0.29	0.17	1.06	2.63
CA	21.65	5.19	0.24	13.80	35.72
H	95.40	0.87	0.01	93.24	97.28

En la Tabla 8 se indican las ecuaciones para el modelo ajustado por regresión múltiple con el correspondiente coeficiente de correlación para cada una de las variables en estudio, así como el intervalo en el cual oscilaron los coeficientes de variación experimentales. Para cada parámetro se indica la significatividad estadística de cada uno de los términos de la ecuación. En las Figuras 15 a 18 se presentan los valores medios experimentales y los esperados de PH,PS,CA y H, calculados de acuerdo co el modelo de regresión múltiple, en función del tiempo y de la osmolaridad.

Tabla 8: Ecuaciones de regresión múltiple para PH, PS, CA y H de larvas jóvenes de Bufo arenarum expuestas a diferentes concentraciones de ClNa desde 70 a 270 mOsm durante 144 hs.

PAR: parámetro morfológico; R: coeficiente de correlación; coef. var.: intervalo en el cual oscilaron los coeficientes de variación experimentales; h: hora; c: concentración de la solución; (hc): interacción hora concentración ; as: altamente significativo ($p < 0.01$); ns: no significativo.

Parámetro morfológico	Ecuación	R	coef.var.
PH	$44.20 - 0.078h + 0.02c - 0.832E-03(hc)$ h:as ; c:ns ; (hc):as	0.70	0.07-0.22
PS	$1.84 - 0.33E-02h - 0.92E-03c + 0.77E-04(hc)$ h:as ; c:ns ; (hc):as	0.37	0.05-0.29
CA	$23.77 + 0.006h + 0.030c - 0.16E-02(hc)$ h:ns ; c:ns ; (hc):as	0.53	0.05-0.29
H	$95.77 - 0.66E-03h + 0.003c - 0.26E-03(hc)$ h:ns ; c:ns ; (hc):as	0.48	0.00-0.01

II-C.1- Análisis de Regresión para cada parámetro considerado:

a) Peso húmedo (Figura 15,A): En las primeras 24 hs de exposición se produce un importante descenso del PH en todas las soluciones experimentales, mayor a mayor osmolaridad siendo para ADA del 16% y para 271 mOsm del 30%. Luego de éste tiempo y hasta las 120 hs de exposición, en ADA, 70 y 141 mOsm continúa el descenso del PH que es del orden del 23 y 20%. 204 y 247 mOsm tienen un comportamiento distinto al expuesto puesto que luego del descenso inicial de las 24 hs, tienden a mantener su PH en valores relativamente cercanos a control, si bien levemente menores a éste. En ADA y en 70 mOsm sobreviven durante todo el período experimental, en 141 mOsm no superan las 120 hs de exposición, en 204 mOsm sobreviven hasta las 72 hs, y en 247 y 271 mOsm no superan las 48 y 24 hs de exposición.

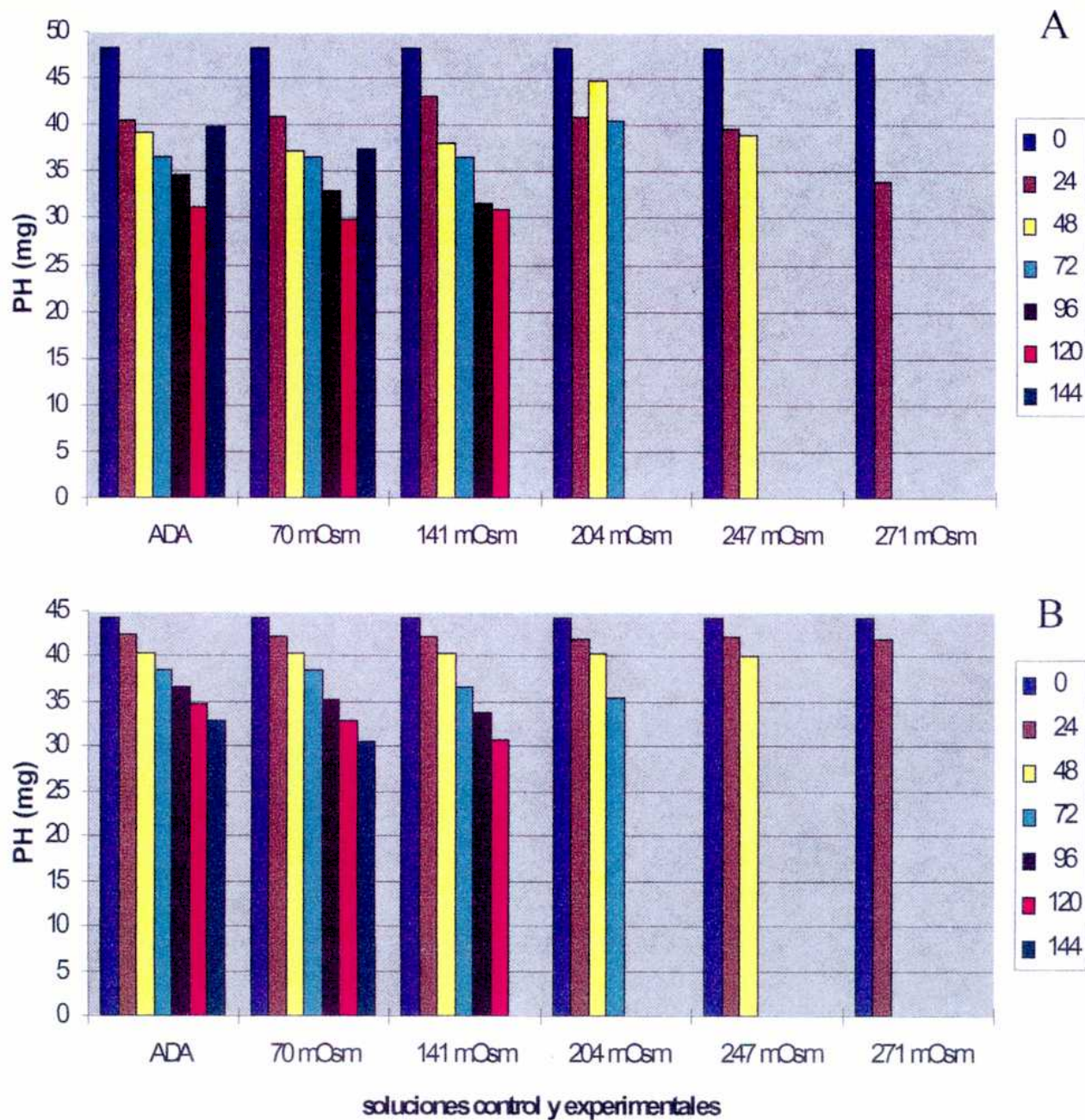


Figura 15: Variación del peso húmedo (PH) de larvas jóvenes de *Bufo arenarum* expuestas a soluciones de diferente osmolaridad electrolítica (ClNa), en función del tiempo y de la osmolaridad del medio de incubación. A: valores medios experimentales; B: valores esperados calculados de acuerdo con la ecuación de regresión.

Según el análisis de regresión múltiple, considerando la significatividad estadística de cada término de la ecuación (Tabla 8), las variaciones del PH se deben al tiempo y a la interacción tiempo concentración, no así a la concentración; es decir que las diferencias halladas entre concentraciones son causadas por el efecto que ejerce el tiempo de exposición sobre las larvas, en cada concentración. La tendencia que muestra el PH de acuerdo con el modelo de regresión múltiple seleccionado (Figura 15,B) es a disminuir con el tiempo y con la osmolaridad, lo que incrementa las diferencias entre concentraciones con el tiempo. Hasta 48 hs prácticamente no existen diferencias entre las distintas soluciones.

b) Peso seco (Figura 16,A): Entre el tiempo 0 y las 24 hs de exposición se produce un incremento del orden del 21 al 25% para todas las soluciones, el que es mayor a menor osmolaridad externa. En este lapso queda establecido un aumento del PS con la osmolaridad, estando todas las concentraciones experimentales por encima del valor de PS del control. A partir de las 24 hs ADA muestra un descenso muy leve pero continuo en el tiempo; 70 y 141 mOsm tienen un comportamiento semejante a controles; 141 mOsm se acerca a los valores de ADA a las 120 hs pero no sobrevive luego de este período, en tanto que 70 mOsm mantiene la diferencia con respecto al control hasta el final del ensayo. En 204 y 247 mOsm conservan su PS en valores relativamente constantes en relación con aquéllos de las 24 hs durante todo el tiempo de supervivencia. En este caso, para el modelo ajustado por regresión múltiple podemos considerar que no existe correlación (Tabla 8). Sin embargo la tendencia que ofrece el modelo para este parámetro ajusta bastante acertadamente con los valores experimentales (Figura 16,B), pero no explica el importante incremento para PS entre las 0 y 24 hs, ni los valores de 70 mOsm inferiores a ADA a partir de las 48 hs. Para este parámetro, se evidencia un descenso del PS en ADA y en 70 mOsm, estabilidad en 141 mOsm y tendencia a incrementarse por encima de 204 mOsm. El término de la concentración no es significativo pero sí lo es el del tiempo y de la interacción (Tabla 8).

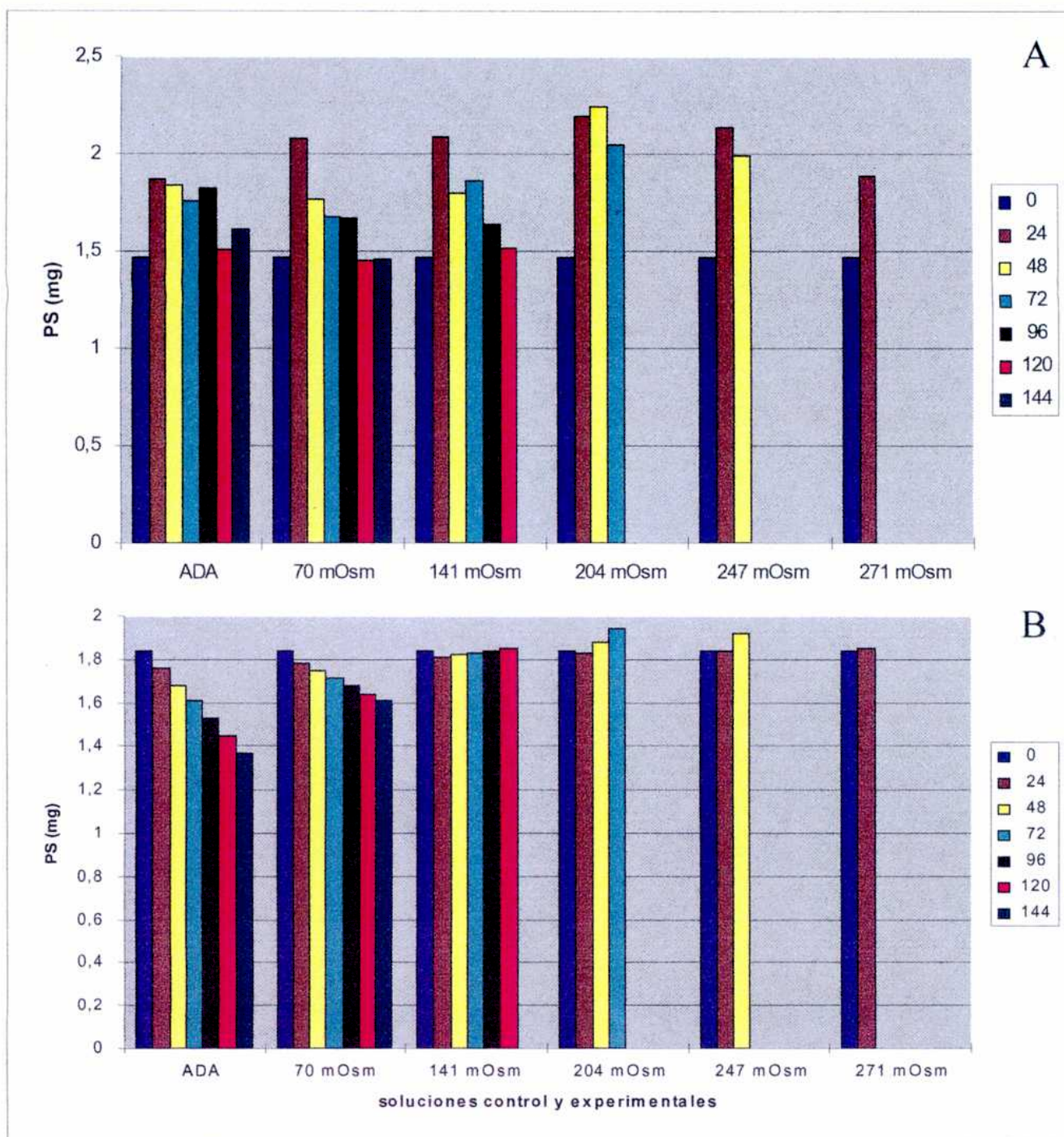


Figura 16: Variaciones del peso seco (PS) en larvas jóvenes de *Bufo arenarum* expuestas a soluciones de diferentes osmolaridades electrolíticas (CINa) en función del tiempo y de la osmolaridad del medio de incubación. A: valores medios experimentales; B: valores esperados calculados de acuerdo con la ecuación de regresión múltiple seleccionada.

c) **Contenido de agua** (Figura 17,A): Para todas las concentraciones se produce un brusco descenso del CA entre las 0 y 24 hs (coincidente con el descenso del PH y el incremento del PS) mayor a mayor osmolaridad, siendo del orden del 20% para ADA y del 50% para 271 mOsm,. A partir de las 24 hs ADA, 70 y 141 mOsm muestran valores muy cercanos entre si y relativamente estables. Si bien con valores inferiores al grupo anterior, 204 y 247 mOsm muestran la misma tendencia a la estabilidad.

El modelo ajustado por regresión múltiple (Figura 17,B) indica para ADA una tendencia a mantenerse constante en el tiempo y un descenso del CA con el incremento de la osmolaridad en función del tiempo para las soluciones experimentales, se acentúa el alejamiento del control con el transcurso del tiempo. El modelo no explica el brusco descenso inicial del CA. El único término de significatividad estadística es el de interacción tiempo-concentración (Tabla 8).

d) **Porcentaje de humedad** (Figura 18,A): El comportamiento de este parámetro es semejante al de CA. pero las variaciones en el tiempo son de menor envergadura. El R es bajo como en el resto de los casos y el único término de significatividad estadística es el de interacción tiempo-concentración (Tabla 8). La tendencia del modelo de regresión es similar a la de CA (aunque de menor envergadura), esto es a disminuir el H en función del tiempo y del incremento de la osmolaridad (Figura 18,B).

En general podemos decir que, comparando con los resultados de manitol, el comportamiento de las variables evaluadas difiere notablemente: en medio electrolítico se incorpora al modelo ajustado por regresión múltiple, el término de interacción tiempo-concentración (Tabla 8), además la correlación para las diferentes variables es bajas (salvo para PH). Esto indica una tendencia a la estabilidad en el tiempo. En 70 y 141 mOsm la tendencia que presentan PH, CA y H es a disminuir en función del tiempo y con el incremento de la osmolaridad del medio. A partir de 204 mOsm la tendencia es a la estabilidad, pero la supervivencia se reduce (Figuras 15, 17 y 18).

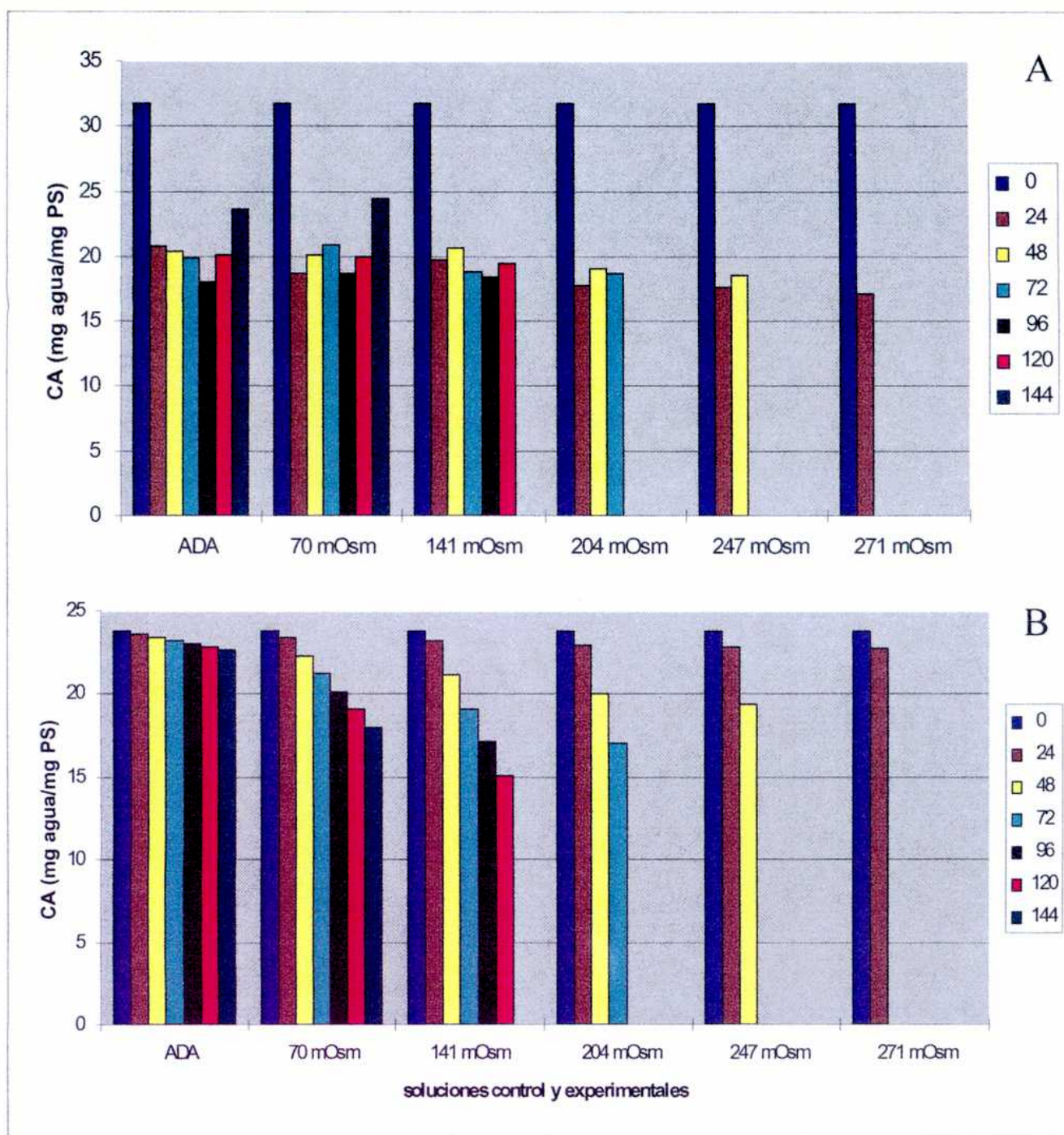


Figura 17: Variaciones del contenido de agua (CA) en larvas jóvenes de *Bufo arenarum* expuestas a soluciones de diferente osmolaridad electrolítica (CINa), en función del tiempo y de la osmolaridad del medio de incubación. A: valores medios experimentales, B: valores esperados calculados de acuerdo con la ecuación de regresión múltiple seleccionada.

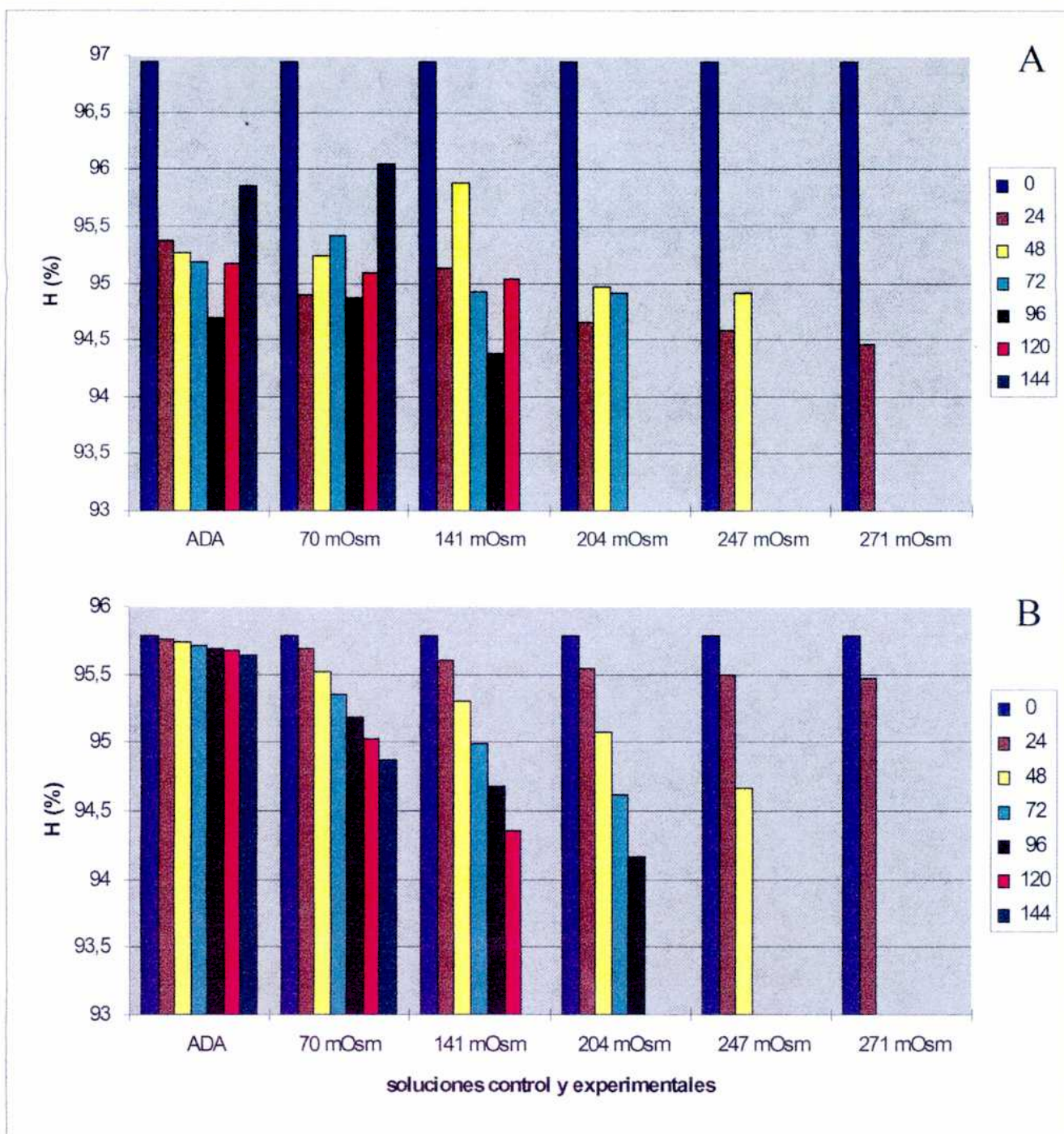


Figura 18: Variaciones de humedad (H) en larvas jóvenes de *Bufo arenarum* expuestas a soluciones de diferente osmolaridad electrolítica (CINa) en función del tiempo y de la osmolaridad del medio de incubación. A: valores medios experimentales; B: valores esperados calculados de acuerdo con el modelo de regresión múltiple seleccionado.

II-c.2-Análisis Discriminante Múltiple

a) Análisis discriminante para cada una de las soluciones ensayadas

Los valores de autovectores para la primera y segunda variable canónica (VC1 y VC2 respectivamente) así como el porcentaje explicado de la variación experimental total se encuentran en la Tabla 9.

Tabla 9: Respuesta integrada de larvas de Bufo arenarum en función del tiempo a la exposición aguda de diferentes concentraciones de ClNa, para cada una de las soluciones ensayadas. Análisis discriminante múltiple.

ADA: agua dulce artificial, 70-271 mOsm: soluciones de ClNa, PH: peso húmedo, PS: peso seco, CA: contenido de agua, H: porcentaje de humedad, VAR: porcentaje acumulado de la dispersión total. Los valores numéricos representan los autovectores para la primera y segunda variable canónica (VC1 y VC2 respectivamente).

soluciones		PH	PS	CA	H	VAR
ADA	VC1	0.87	17.08	0.60	-8.09	0.85
	VC2	-0.06	7.58	-0.30	3.46	0.95
70 mOsm	VC1	0.84	-17.71	0.41	-6.40	0.96
	VC2	-0.44	16.25	0.67	1.25	0.96
141 mOsm	VC1	0.46	-8.09	1.25	-7.02	0.85
	VC2	-0.12	9.20	-0.19	3.38	0.99
204 mOsm	VC1	0.11	-3.10	0.80	-2.24	0.98
	VC2	0.11	4.30	0.35	-1.16	0.99
247 mOsm	VC1	-0.05	1.27	0.66	0.39	0.98
	VC2	0.06	1.27	1.05	-6.30	1.00
271 mOsm	VC	0.08	2.32	0.37	1.83	1.00

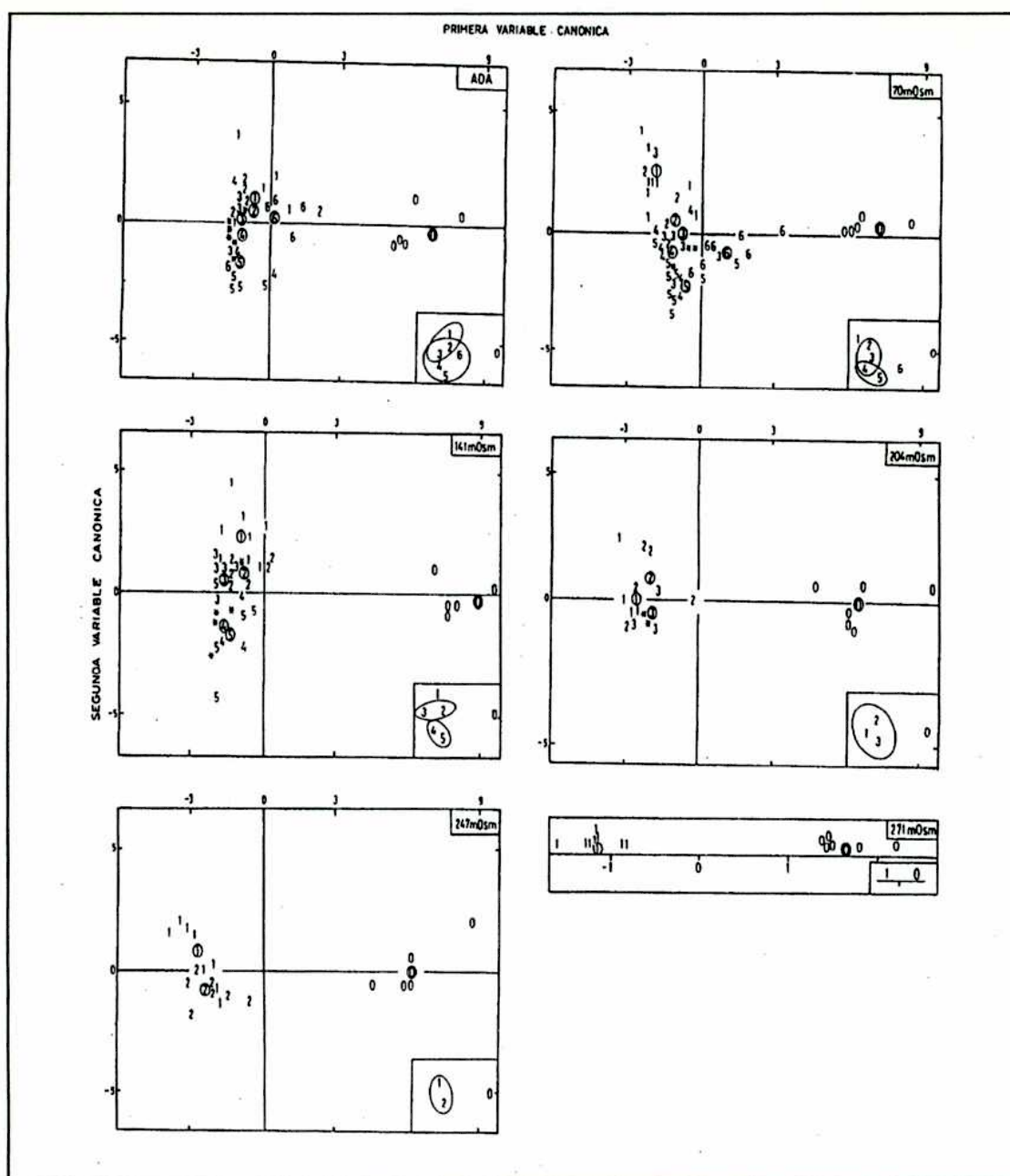


Figura 19: Análisis discriminante para cada solución de CINa ensayada en función del tiempo. Los números representan la posición relativa de cada animal (expresado considerando las cuatro variables en forma integrada) para cada tiempo evaluado.

El número encerrado en círculo representa el valor medio para cada tiempo. 0: 0 h, 1: 24h, 2: 48h, 3: 72h, 4: 96 h, 5: 120 h, 6: 144h. En el margen inferior izquierdo de cada gráfico se esquematiza la media para cada tiempo: los números encerrados en círculos no presentan diferencias estadísticamente significativas según el test de comparaciones múltiples.

Para todas las soluciones existen diferencias altamente significativas entre el tiempo 0 y las 24 hs de exposición. En ADA (Figura 19,A) se observan dos períodos bien definidos en función del tiempo: de 24 a 72 hs y de 48 a 144 hs, dentro de los que no existen diferencias estadísticamente significativas, en tanto que a las 120 hs las variables se alejan del resto de los tiempos; se evidencia una tendencia a volver a las condiciones iniciales; las diferencias están explicadas fundamentalmente por el PS. Las soluciones experimentales (Figura 19,B,C,D,E y F) presentan un comportamiento muy cercano al control y hay una tendencia a un agrupamiento entre todos los tiempos, la que se hace más notable a mayor osmolaridad, siendo en todas las soluciones experimentales el PS, el parámetro de mayor poder discriminante.

Considerando el comportamiento integrado de las cuatro variables podría interpretarse que el efecto que ejerce la osmolaridad sobre las larvas es independiente del tiempo.

b)Análisis Discriminante para cada uno de los tiempos muestreados.

En la Tabla 10 se encuentran los valores de autovectores para la VC1 y VC2, así como el porcentaje explicado de la variación experimental total.

De acuerdo con el resultado del ANOVA, a partir de las 48 hs de exposición el CA y H no presentan diferencias estadísticamente significativas al igual que el PS para las 24 y 144 hs de exposición.

A las 24 hs de exposición (Figura 20,A) las soluciones experimentales se encuentran claramente separadas del control. De acuerdo a los resultados del análisis de comparaciones múltiples, la significatividad estadística de esta diferencia se incrementa con la osmolaridad. Existe agrupación entre osmolaridades sucesivas, así 70 y 141 mOsm se encuentran agrupados y 204 y 247 mOsm también. La relación entre ambos grupos se encuentra dada por la falta de significatividad estadística entre 70, 204 y 247 mOsm; 141 y 204 mOsm difieren con un valor de significatividad del 95%. Las diferencias se explican fundamentalmente por el PS.

Tabla 10: Respuesta integrada de las larvas de Bufo arenarum expuestas a diferentes concentraciones de ClNa para cada tiempo considerado, entre todas las soluciones ensayadas: análisis discriminante múltiple.

Los valores numéricos representan los autovectores para la primera y segunda variable canónica (VC1 y VC2). VAR: porcentaje acumulado de la dispersión total.

tiempos		PH	PS	CA	H	VAR
24 hs	VC1	0.35	-3.42	-0.51	2.72	0.66
	VC2	-1.08	16.45	2.72	-2.25	0.89
48 hs	VC1	0.11	-9.36	-1.54	5.90	0.87
	VC2	0.29	-4.48	1.37	-6.51	0.96
72 hs	VC1	-0.47	-4.73	0.13	0.48	0.74
	VC2	0.40	5.40	-0.57	6.20	0.92
96 hs	VC1	-1.29	32.08	0.78	5.92	0.83
	VC2	2.56	-49.23	-3.16	-4.39	1.00
120 hs	VC1	-2.75	59.01	1.15	12.31	0.72
	VC2	-1.65	29.09	1.30	3.77	1.00
144 hs	VC	-1.01	32.42	4.94	-22.30	1.00

Por el análisis de comparaciones múltiples, a las 48 hs (Figura 20,B) se detectan diferencias entre 204 mOsm y las restantes soluciones, las que se explican, fundamentalmente, por el PS.

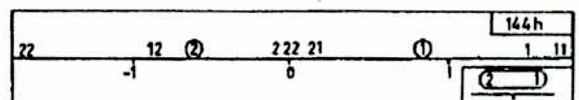
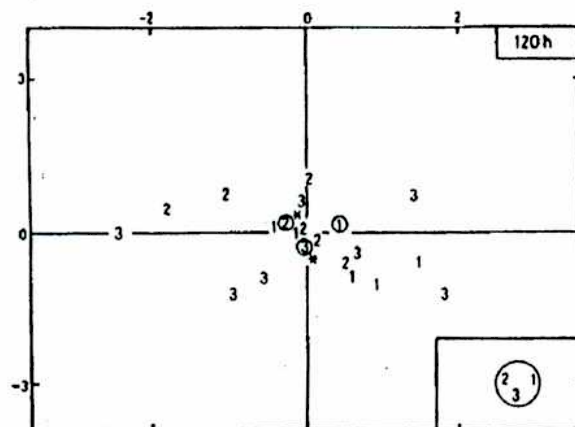
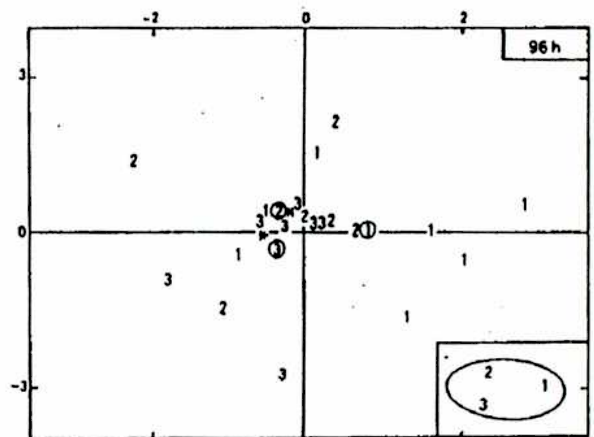
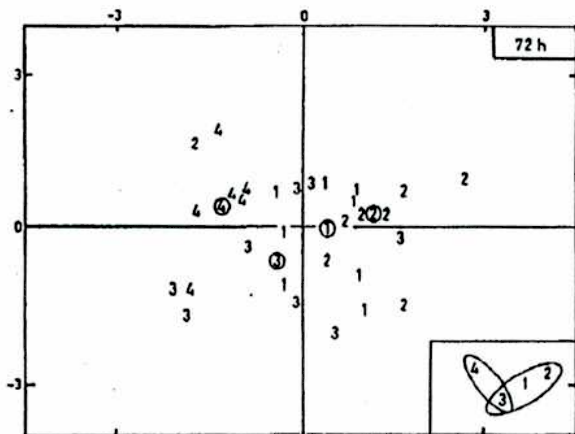
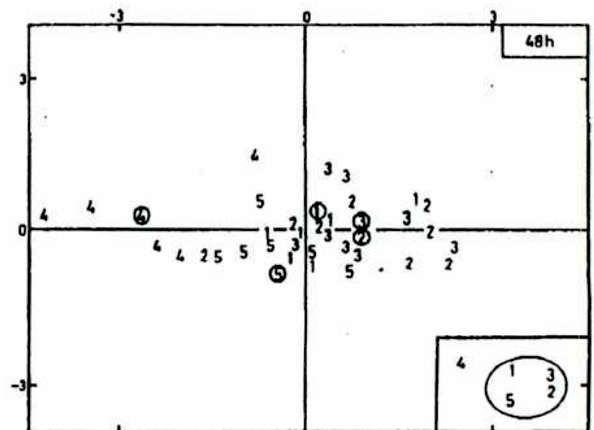
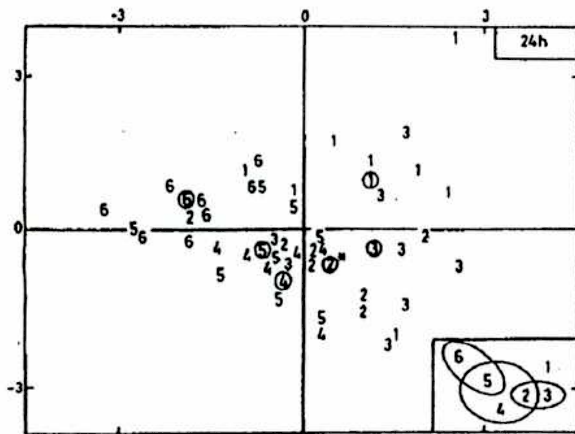
A las 72 hs (Figura 20,C) la respuesta integrada de las larvas se explica principalmente por los cambios en H. Los valores de 204 mOsm se agrupan con los de 141 mOsm. A partir de las 96 hs el parámetro de mayor incidencia en la capacidad discriminante es el PS y no existen diferencias entre las soluciones que aún permanecen en ensayo (Figura 20,D, E y F).

En general podemos considerar que entre 70 y 141 mOsm no existen diferencias estadísticamente significativas para ningún tiempo considerado. Desde las 48 h de exposición se produce un agrupamiento de casi todas las soluciones experimentales con el control. Sin embargo, es importante notar que a medida que el comportamiento compensatorio de los parámetros considerados en las soluciones experimentales se acerca al de control, se produce la muerte. Esto ocurre con 247 mOsm a las 48 hs, en 204 mOsm a las 72 hs, en 141 mOsm a las 120 hs. El esfuerzo fisiológico realizado para lograr tal compensación, debe ser muy elevado y no puede ser mantenido por encima de 70 mOsm.

Figura 20 Análisis discriminante para cada tiempo ensayado entre las distintas soluciones de ClNa. Los números indican la posición relativa de las larvas de cada solución, para cada tiempo evaluado. Los numeros encerrados en círculo representan la media para cada solución y tiempo. 1: ADA, 2: 70 mOsm, 3: 141 mOsm, 4: 204 mOsm, 5: 247 mOsm, 6: 271 mOsm.

PRIMERA VARIABLE CANONICA

SEGUNDA VARIABLE CANONICA



II-d EXPOSICION DE LARVAS JOVENES A SOLUCIONES ELECTROLITICAS (CINa) Y NO ELECTROLITICAS (MANITOL) DE OSMOLARIDAD CRECIENTE EN CONDICIONES DE ACLIMATACION.

II-d.1 Análisis de regresión para cada parámetro considerado

En la Tabla 11 se presentan los valores medios, desvío estándar y coeficiente de variación, de cada parámetro evaluado, para cada tiempo muestreado y en cada tratamiento.

En la Tabla 12 se indican las ecuaciones de regresión con su correspondiente coeficiente de correlación y los resultados del análisis de covarianza para evaluar diferencias entre pendientes.

En la Tabla 13 se presentan los valores de significatividad estadística para cada variable de acuerdo con los resultados del ANOVA.

En las Figuras 21 a 24 se indican las rectas de regresión para cada una de las variables fisiológicas evaluadas y cada tratamiento.

Tabla 11: Variación de peso húmedo (PH), peso seco (PS) y Contenido de agua (CA y H) en función del tiempo para cada uno de los tratamientos.

ADA: agua dulce artificial , control; MAN: soluciones de manitol de osmolaridad creciente; ClNa: soluciones de ClNa de osmolaridad creciente; x: media aritmética; ds: desvío estándar; cv: coeficiente de variación, n: número de muestras para cada tiempo y solución.

		PH			PS		
		ADA	MAN	ClNa	ADA	MAN	ClNa
0hs	x	55.61			3.37		
0 hs	ds	6.7			0.36		
	cv	0.12			0.11		
		n=8			n=8		
24 hs	x	49.01	48.56	49.77	3.27	3.00	2.60
	ds	5.20	6.60	4.10	0.33	0.22	0.13
	cv	0.11	0.13	0.08	0.10	0.09	0.05
		n=7	n=8	n=8	n=7	n=8	n=8
48 hs	x	48.84	41.71	44.21	2.79	2.45	2.74
	ds	7.25	4.22	2.80	0.52	0.27	0.37
	cv	0.15	0.10	0.06	0.18	0.11	0.13
		n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
72 hs	x	49.77	36.69	38.95	2.64	2.57	2.66
	ds	4.13	4.31	3.31	0.30	0.25	0.62
	cv	0.08	0.11	0.08	0.11	0.10	0.23
		n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
96 hs	x	40.07	24.76	31.82	2.35	3.02	2.48
	ds	3.67	5.08	3.16	0.19	0.35	0.28
	cv	0.09	0.20	0.10	0.08	0.12	0.11
		n=8	n=5	n=8	n=8	n=5	n=8

Continuación Tabla 11

		CA			H		
		ADA	MAN	ClNa	ADA	MAN	ClNa
0hs	x	16.42			94.12		
0 hs	ds	2.48			0.85		
	cv	0.16			0.01		
		n=8			n=8		
24 hs	x	14.19	15.33	18.18	93.22	93.72	94.74
	ds	2.66	2.95	1.79	1.33	1.03	0.51
70	cv	0.19	0.19	0.09	0.01	0.01	0.01
		n=7	n=8	n=8	n=7	n=8	n=8
48 hs	x	17.04	16.15	14.48	94.19	94.09	93.77
	ds	4.42	2.23	3.08	1.27	0.70	1.01
141	cv	0.26	0.14	0.20	0.01	0.01	0.01
		n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
72 hs	x	18.05	13.34	14.26	94.67	92.91	93.15
	ds	2.52	1.93	3.36	0.69	1.03	1.58
204	cv	0.14	0.14	0.23	0.07	0.01	0.02
		n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
96 hs	x	16.21	7.26	11.92	93.57	87.45	92.10
	ds	2.63	1.83	1.82	1.56	2.53	1.12
271	cv	0.16	0.25	0.15	0.02	0.03	0.01
		n=8	n=5	n=8	n=8	n=5	n=8

Tabla 12: Análisis de regresión lineal para cada parámetro fisiológico en función del tiempo en larvas control (ADA) y expuestas a osmolaridad creciente en manitol (MAN) y ClNa.

Se indica el valor del coeficiente de correlación (R) y el resultado del análisis de covarianza para comparación de pendientes entre control y tratados y entre tratados .

GL: grados de libertad; **: $p < 0.001$; *: $p < 0.05$; ns: no significativo.

TRAT.	PAR	Ecuación de regresión	R	ANCOVA (GL)	
ADA	PH	$PH = 54.86 - 0.13 \text{ h}$	0.60	ADA	
	PS	$PS = 3.41 - 0.01 \text{ h}$	0.74	vs	11.00**
	CA	$CA = 15.28 + 0.02 \text{ h}$	0.22	MAN	26.24**
	H	$H = 93.76 + 0.003 \text{ h}$	0.09	(1;64)	28.68**
MAN	PH	$PH = 56.60 - 0.31 \text{ h}$	0.84	MAN	0.11 ns
	PS	$PS = 2.77 - 0.60 \text{ h}$	0.05	vs	0.79 ns
	CA	$CA = 19.35 - 0.10 \text{ h}$	0.69	ClNa	0.28 ns
	H	$H = 96.63 - 0.07 \text{ h}$	0.70	(1;57)	0.04 ns
ClNa	PH	$PH = 55.97 - 0.24 \text{ h}$	0.90	ADA	9.32*
	PS	$PS = 2.72 - 0.002 \text{ h}$	0.12	vs	9.95*
	CA	$CA = 19.96 - 0.08 \text{ h}$	0.67	ClNa	21.18**
	H	$H = 95.55 - 0.03 \text{ h}$	0.66	(1;67)	16.37**

Tabla 13: Resultados del ANOVA, para cada parámetro, efectuado entre tratamientos en función del tiempo y entre tratamientos para cada tiempo.

Los valores numéricos indican el valor de F de Fisher para cada ANOVA en cuestión. ns= no significativo; * significativo ($p < 0.05$); ** altamente significativo ($p < 0.01$).

	GL	PH	PS	CA	H
ADA	2,20	2.75 *	4.40 *	1.38 ns	1.36 ns
MAN	2,21	10.81 **	18.23 **	0.21 ns	0.37 ns
CLNa	2,21	11.06 **	14.55 **	2.96 *	3.48 *
24 hs	1,20	0.11 ns	12.72 **	5.13 *	4.64 *
48 hs	1,21	4.01 *	1.68 ns	0.44 ns	0.38 ns
72 hs	1,21	25.19 *	0.09 ns	7.01 ns	5.44 ns
96 hs	1,21	25.24 *	9.78 ns	26.49 *	20.89 *

Peso Húmedo (Figura 21): Tanto en control como en los grupos tratados existe un descenso del PH en función del tiempo, pero en los últimos el descenso es más pronunciado. Existen diferencias entre pendientes para ADA vs MAN y ClNa pero no existen entre MAN vs ClNa (Tabla 12).

Peso Seco (Figura 22): En ADA y ClNa el PS disminuye en función del tiempo en forma paulatina, pero en el caso de MAN se puede observar la existencia de dos etapas : hasta las 72 hs y luego de este tiempo. Ello coincide con el pasaje a 247 mOsm, a partir de este punto se produce el incremento del PS y el aumento de mortalidad en el grupo. Existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de ADA vs MAN, ADA vs ClNa pero no

existen entre MAN vs ClNa (Tabla 12), probablemente a causa del comportamiento del PS hacia el final del ensayo.

Contenido de agua (Figura 23): Este parámetro se mantiene con valores relativamente estables en el tiempo en el caso de ADA; pero en MAN y ClNa la tendencia se modifica a partir de las 72 hs, esto coincide con el pasaje a 204 mOsm. En este momento se evidencia un descenso importante en el CA. No existen diferencias significativas entre ClNa y MAN pero sí entre éstas y ADA (Tabla 12).

Porcentaje de humedad (Figura 24): Al igual que en el caso anterior, este parámetro se mantiene relativamente estable en ADA y también en ClNa (con tendencia a la disminución del mismo, en este último. En MAN la tendencia es la misma que en ClNa pero con un brusco descenso en el pasaje a 247 mOsm (96 hs), lo cual modifica la pendiente. Existen diferencias de pendientes entre ADA vs MAN, ClNa vs MAN pero no entre ADA vs ClNa (Tabla 12). En general se puede observar que en control existe disminución tanto del PH como del PS, que puede atribuirse al ayuno; que el descenso de PH es importante independientemente del tratamiento a las 24 hs. El efecto del PS se observa más relacionado con el tratamiento en el tiempo. Este parámetro sería el que gobierna las diferencias, puesto que si ambos valores bajan en forma proporcional, el CA y H se mantienen estables, en tanto que si ello no ocurre, se detectan diferencias en el contenido de agua. (Tabla 13). En condiciones de aclimatación los animales no modifican el PS en relación al control cuando se exponen a soluciones de elevada osmolaridad electrolítica, pero ello ocurre por encima de 200 mOsm en solución no electrolítica, y la mortalidad se incrementa notablemente; esto coincide con el descenso del PH a valores cercanos al 50 % relativo a controles, lo que puede interpretarse como incapacidad de las larvas de compensar en las condiciones del tratamiento y en consecuencia se produce la muerte.

También se observa un fenómeno semejante en ClNa; pero aquí, como cuando se exponen

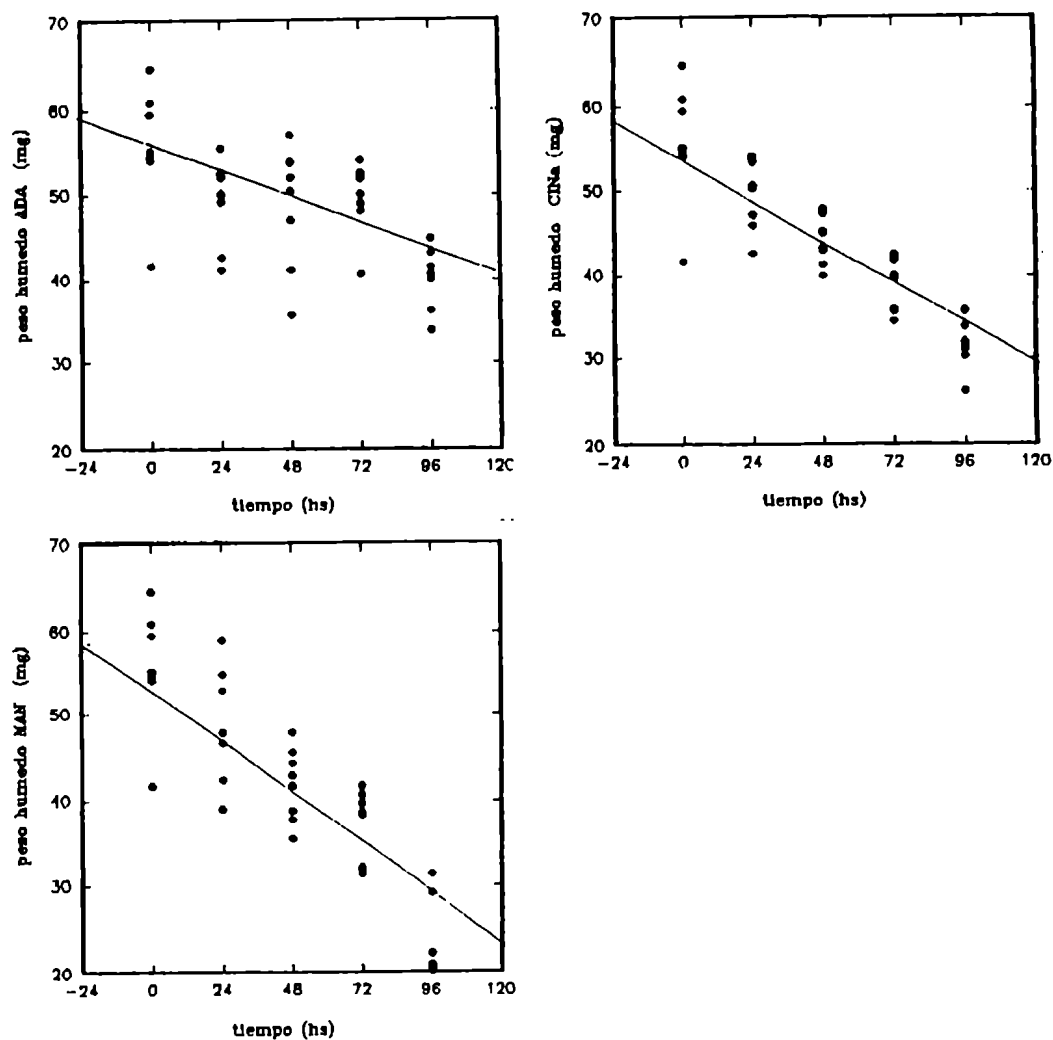


Figura 21: PH (mg) en función del tiempo y recta de regresión de acuerdo con el análisis de regresión lineal en larvas jóvenes de *Bufo arenarum* expuestas a soluciones electrolíticas y no electrolíticas de osmolaridad creciente. A: ADA-5mOsm; B: ClNa; C: MAN.

en forma aguda, la muerte se produce abruptamente, es decir que hasta 247 mOsm permanecen cercanos a controles y a partir de la exposición a 271 mueren todos: no hay transición.

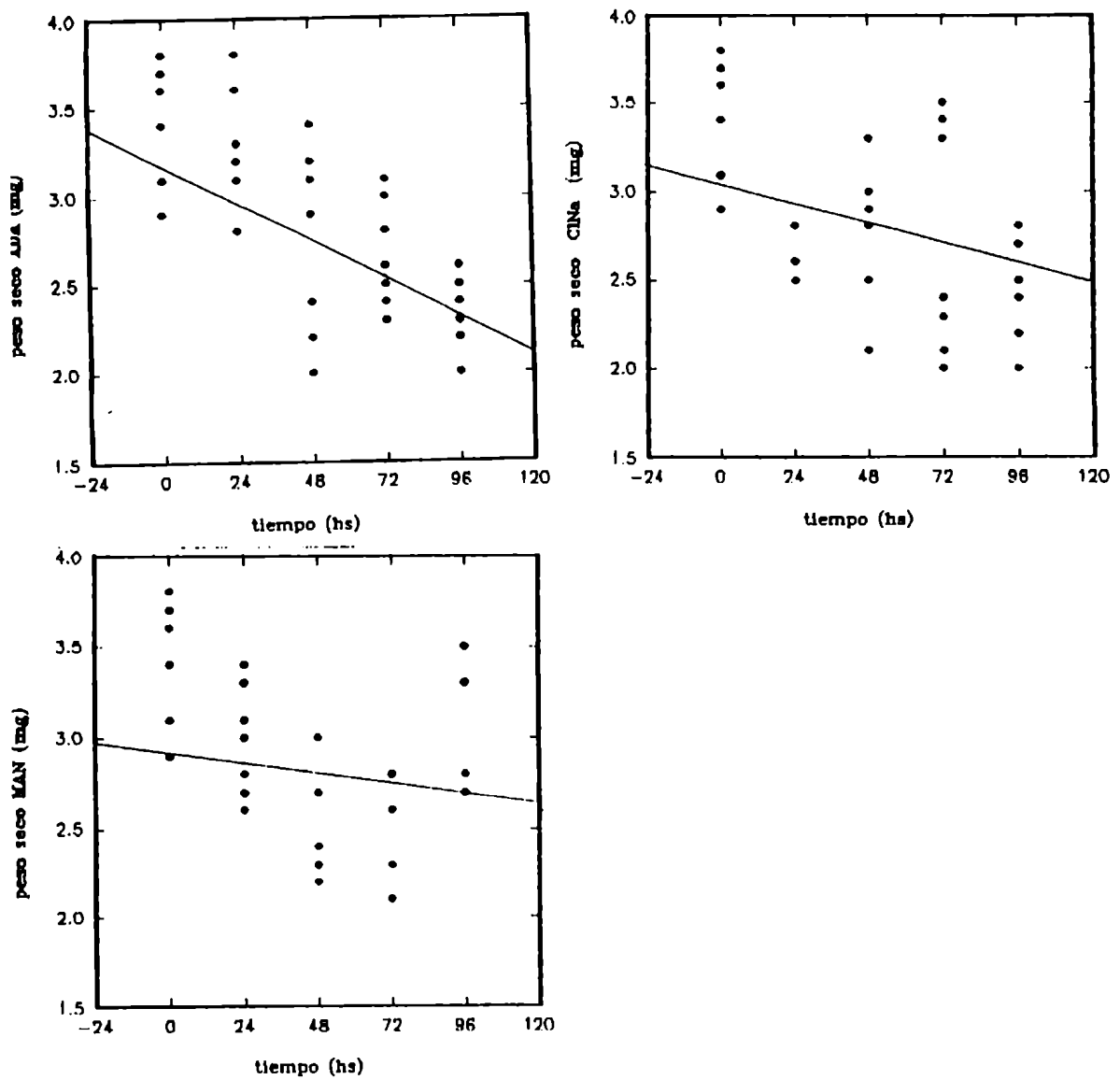


Figura 22: PS (mg) en función del tiempo y recta de regresión de acuerdo con el análisis de regresión lineal en larvas jóvenes de Bufo arenarum expuestas a soluciones electrolíticas y no electrolíticas de osmolaridad creciente. A: ADA-5mOsm; B: ClNa; C: MAN.

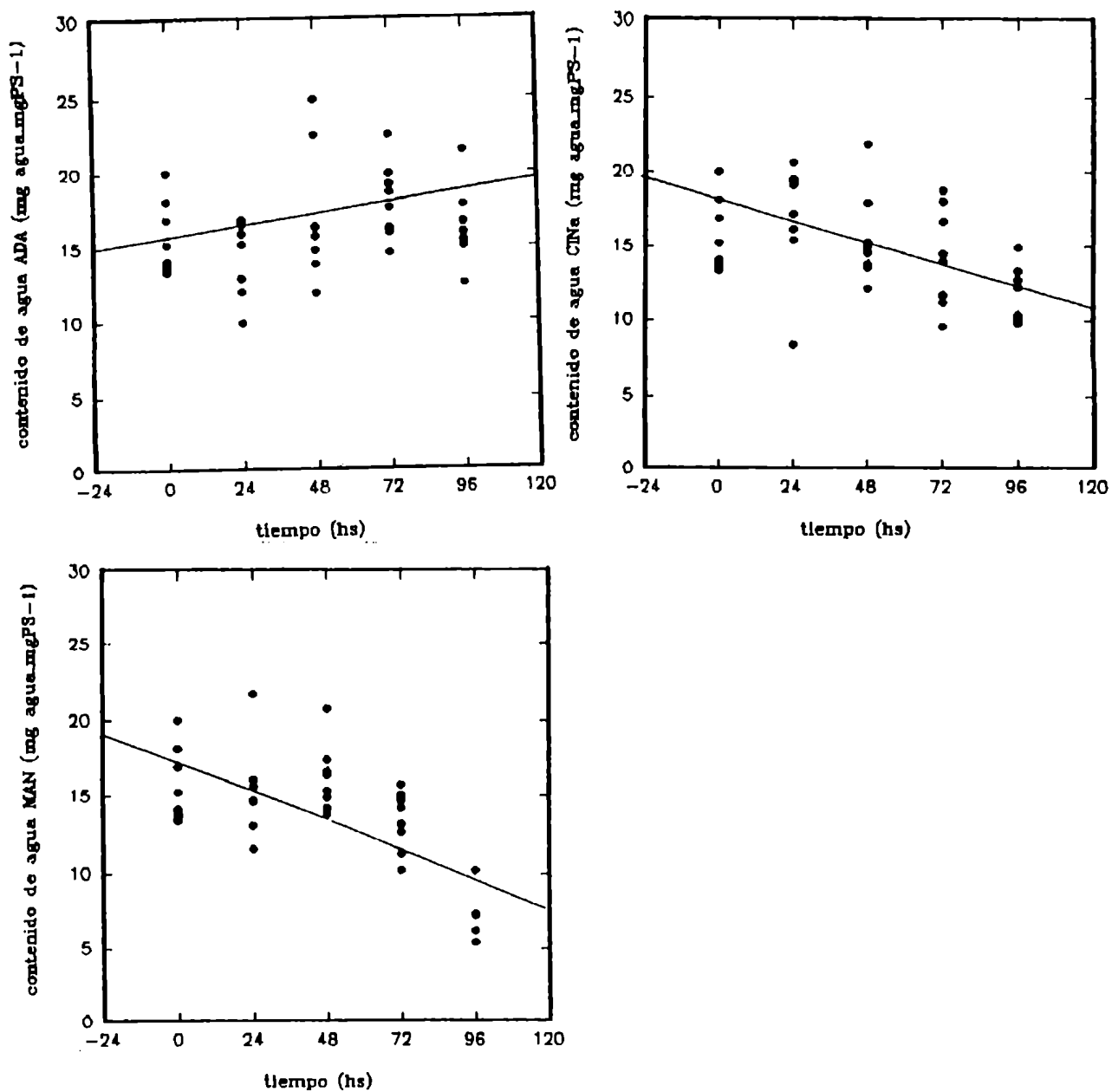


Figura 23: CA (mg agua/mg PS) en función del tiempo y recta de regresión de acuerdo con el análisis de regresión lineal en larvas jóvenes de Bufo arenarum expuestas a soluciones electrolíticas y no electrolíticas de osmolaridad creciente. A: ADA-5mOsm; B: ClNa; C: MAN.

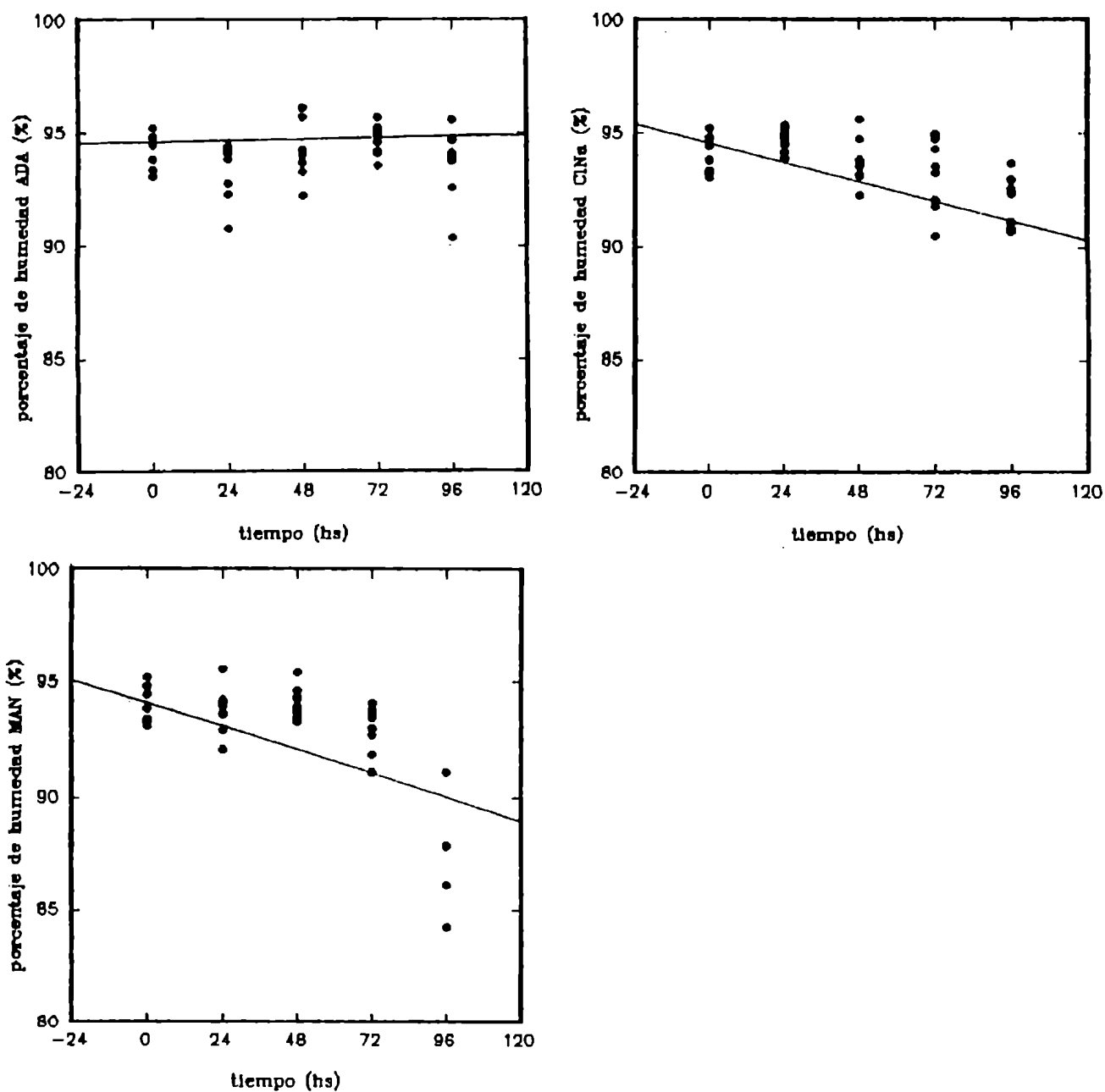


Figura 24: H (% agua) en función del tiempo y recta de regresión de acuerdo con el análisis de regresión lineal en larvas jóvenes de *Bufo arenarum* expuestas a soluciones creciente electrolíticas y no electrolíticas de osmolaridad. A: ADA-5mOsm; B: ClNa; C: MAN.

II-d.2. Análisis Discriminante Múltiple

a) Análisis discriminante para cada una de las soluciones ensayadas

ADA (Figura 25, A): La variable de mayor incidencia en la capacidad discriminante es el PS (Tabla 14). El comportamiento integrado de las variables indica estabilidad relativa en función del tiempo pero con tendencia a diferenciarse hacia el final de ensayo, probablemente por el deceso del PS a causa del ayuno.

MAN (Figura 25, B): la variable de mayor incidencia en la capacidad discriminante también es el PS (Tabla 14). El comportamiento integrado de las variables tiende a diferenciarse continuamente en el tiempo y mucho más pronunciadamente hacia el final del bioensayo. No existen diferencias significativas entre las 0 y 24 hs, lo cual indica que el pasaje a 70 mOsm-MAN no es traumático, que las larvas no reconocen al medio como estresante.

CINa (Figura 25, C): Las variables de mayor incidencia en la capacidad discriminante son el PS y la H (Tabla 14). El comportamiento integrado de las variables es a diferenciarse en el tiempo: hasta las 48 hs predomina el PS y a partir de las 72 hs la H. El test de comparaciones múltiples indica

que existen diferencias entre las 0 y 24 hs, es decir que el pasaje a solución de osmolaridad electrolítica mayor no es indiferente para los animales. Tampoco existen diferencias entre las 24 y 48 hs, esto es entre la permanencia en 70 y 141 mOsm; pero a partir de la exposición a 204, se detectan diferencias significativas entre los distintos tiempos, siendo el contenido de agua un parámetro importante en tal diferenciación.

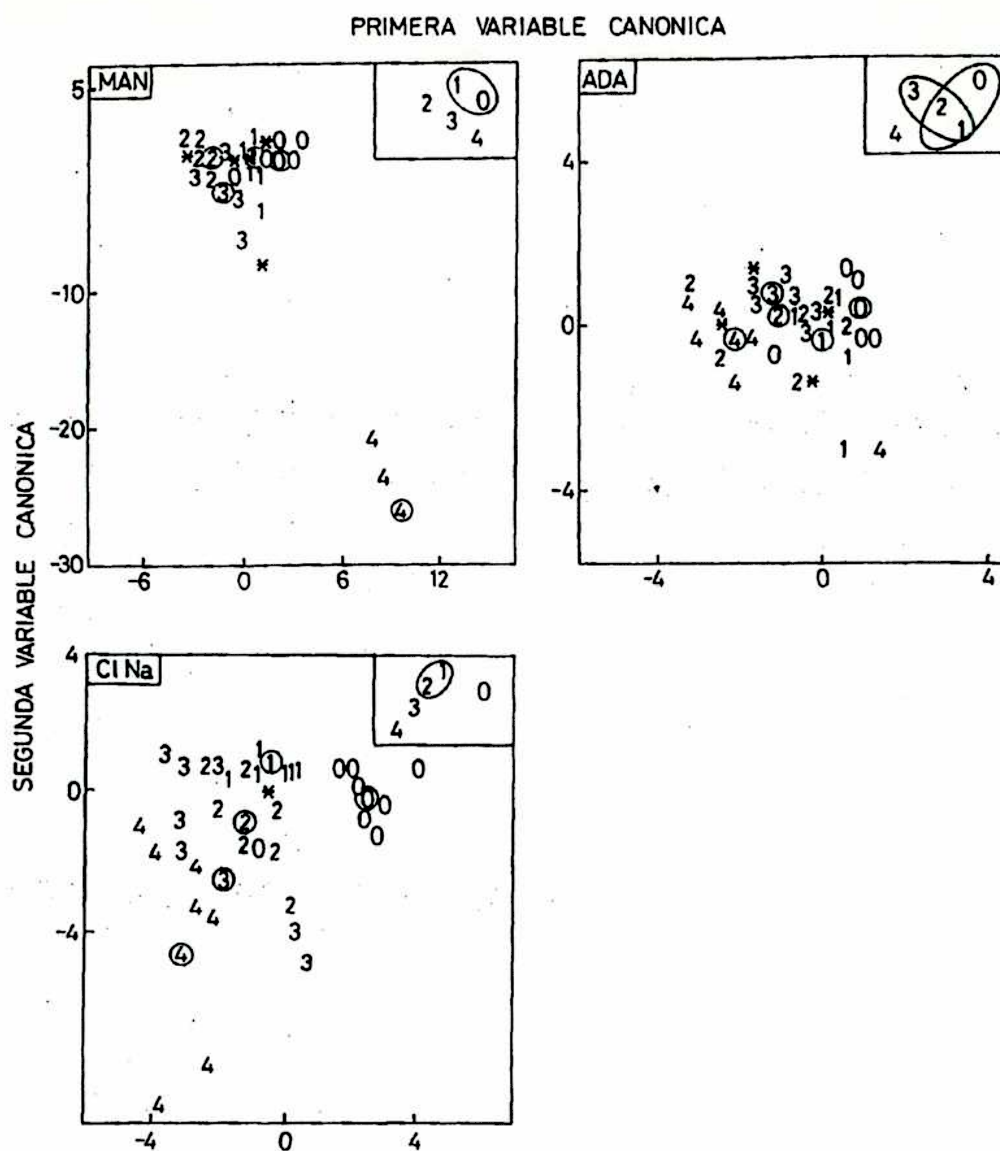


Figura 25: Análisis discriminante para las distintas soluciones ensayadas en larvas expuestas a osmolaridad creciente electrolítica y no electrolítica. Para su interpretación remitirse a la Figura 13.

0= 0hs; 1= 24 hs; 2=48 hs; 3= 72 hs; 4=96 hs.

Tabla 14: Respuesta integrada de las larvas en función del tiempo, a la exposición a soluciones de osmolaridad creciente ("stress" osmótico con aclimatación) en soluciones de diferente composición química: análisis discriminante múltiple (para símbolos, remitirse a Tabla 5).

soluciones		PH	PS	CA	H	VAR
ADA	CV1	0.30	-1.78	-0.28	-1.00	0.84
	CV2	0.10	-1.21	-0.24	0.82	1.00
MAN	CV1	0.54	-4.76	-0.14	-3.36	0.97
	CV2	-0.43	7.68	-0.95	6.95	1.00
CINa	CV1	0.23	0.76	-0.20	-0.25	0.84
	CV2	-0.13	2.53	-1.07	5.49	1.00

b) Análisis discriminante para cada tiempo muestreado, entre las distintas soluciones

24 hs (Figura 26, A): La variable de mayor incidencia en la capacidad discriminante es el PH (Tabla 15). Según el análisis de comparaciones múltiples no existen diferencias entre ADA y MAN pero sí entre éstas y CINa.

48 hs (Figura 26, B): la variable de mayor incidencia en la capacidad discriminante es el PS y ésta sigue siéndolo hasta el final del bioensayo (Tabla 15). En este tiempo el comportamiento integrado de las variables, evaluado a partir del "test" de comparaciones múltiples, indica semejanza entre los dos grupos experimentales que a su vez se diferencian del control.

72 y 96 hs (Figura 26, C): a partir de las 72 hs existen diferencias estadísticamente significativas entre las tres soluciones ensayadas.

Tabla 15: Respuesta integrada de las larvas en función de los distintos tratamientos para cada uno de los tiempo muestreados, a la exposición a soluciones de osmolaridad creciente ("stress" osmótico con aclimatación) en soluciones de diferente composición química: análisis discriminante múltiple (para símbolos, remitirse a Tabla 5)

soluciones		PH	PS	CA	H	VAR
24 hs	CV1	7.93	-5.03	-5.97	-4.93	0.91
	CV2	-10.86	8.98	8.07	7.50	1.00
48 hs	CV1	0.72	-8.30	0.24	-5.25	0.91
	CV2	1.26	-20.98	-0.71	-3.62	1.00
72 hs	CV1	1.26	-15.99	-1.43	-3.03	0.85
	CV2	1.21	-20.01	-2.35	-2.65	1.00
96 hs	CV1	0.49	-5.11	-0.57	-0.12	0.88
	CV2	0.01	2.46	0.60	-0.66	1.00

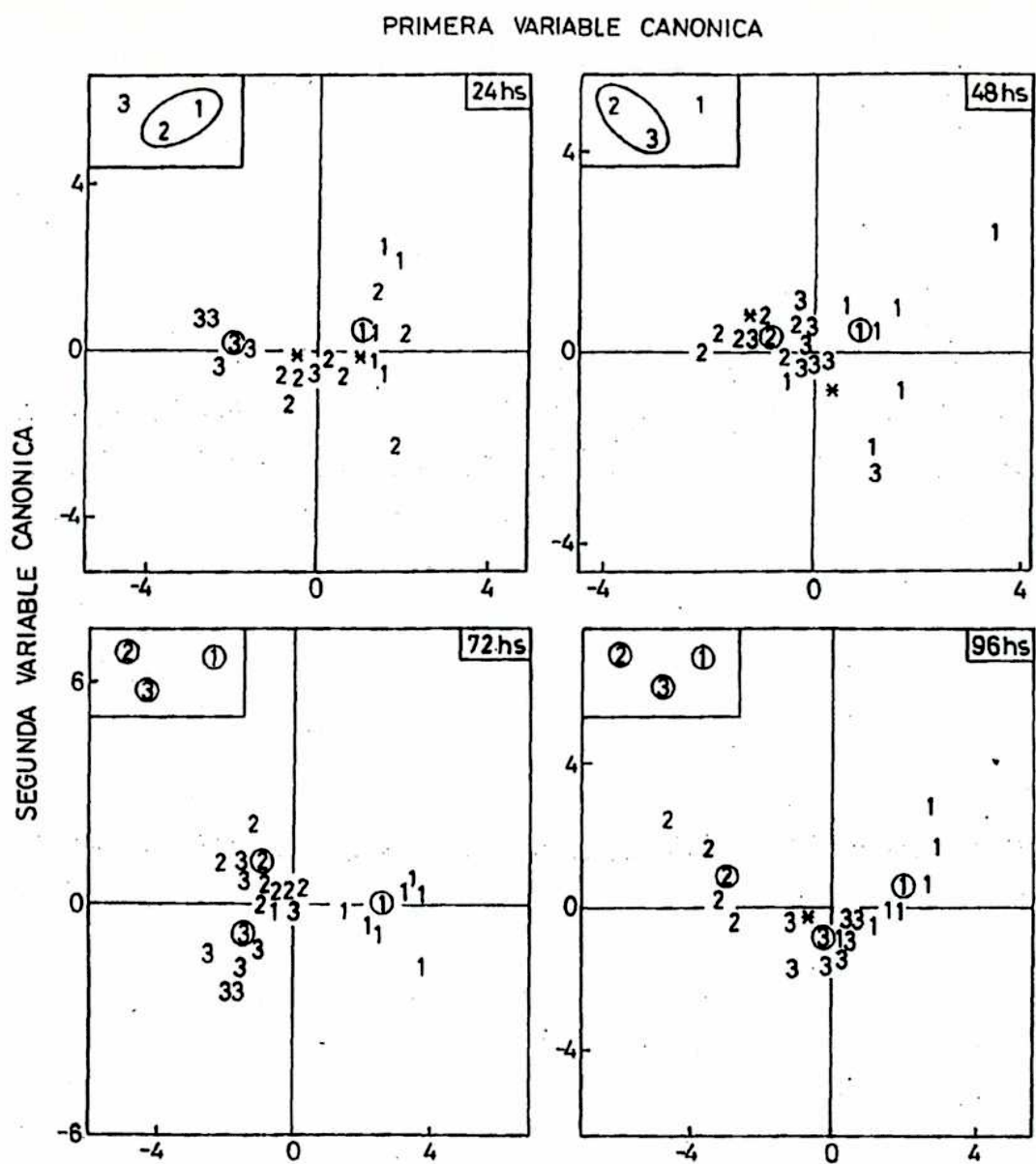


Figura 26: Análisis discriminante para cada uno de los tiempos muestreados en larvas expuestas a osmolaridad creciente electrolítica y no electrolítica. Para su interpretación remitirse a la figura 14.

0= 0hs; 1= 24 hs; 2= 48hs; 3= 72 hs; 4= 96 hs.

II-e. EXPOSICION A SOLUCIONES DE DIFERENTE CONCENTRACION DE 0 A 30 mOsm EN CONDICIONES DE EXPOSICION PROLONGADA

En la Tabla 16 se muestra la evaluación estadística para cada variable analizada, de la población total de datos experimentales.

Tabla 16: Media aritmética (x), desvío estándar (ds), coeficiente de variación experimental (coef. var.), valor mínimo (min) y máximo (max) para cada parámetro analizado del pool general de datos. PH: peso húmedo (mg); PS: peso seco (mg); CA: contenido de agua (mg agua/mg PS); H: humedad (%); N: 225.

parámetro	x	ds	coef.var.	min.	max
PH	44.55	13.96	0.31	23.46	81.10
PS	2.03	0.91	0.45	1.00	5.19
CA	22.05	3.92	0.18	14.35	36.13
H	95.54	0.75	0.11	93.48	97.31

II-e.1-Análisis de regresión para cada parámetro considerado

En la Tabla 17 se presentan las ecuaciones para el modelo ajustado por regresión múltiple con el correspondiente coeficiente de correlación para cada una de las variables en estudio así como el intervalo de los coeficientes de variación experimentales. Para cada parámetro se indica la significatividad estadística de los términos de la ecuación.

En las Figuras 27 a 30 se presentan los valores medios experimentales y esperados de PH, PS, CA y H en función del tiempo y de la osmolaridad.

Tabla 17: Ecuaciones de regresión múltiple para PH, PS, CA y H de larvas jóvenes de Bufo arenarum expuestas a diferentes concentraciones electrolíticas durante 27 días.

Par: parámetro morfológico; R: coeficiente de correlación; coef.var: intervalo en el cual oscilaron los coeficientes de variación experimentales; t: tiempo; log. c: logaritmo de la concentración; as: altamente significativo estadísticamente ($p > 0.99$); ns: estadísticamente no significativo; s: estadísticamente significativo ($p > 0.95$).

Par	Ecuación	R	coef.var.
PH	$50.91 - 0.76t + 2.87 \log c$ t:xx ; log c:xx	0.50	9-23%
PS	$2.21 - 0.07t + 0.52 \log c$ t:xx ; log c:xx	0.68	10-37%
CA	$25.63 + 0.31t - 5.22 \log c$ t:xx ; log c:xx	0.78	0.4-17%
H	$96.11 + 0.06t - 0.99 \log c$ t:xx ; log c:xx	0.78	0.02-0.07%

a) **Peso húmedo** (Figura 27) En todas las soluciones el PH presenta un comportamiento semejante, esto es, un descenso inicial que alcanza un 50% de disminución hasta el décimo día de experimentación; luego tiende a incrementarse llegando al final del ensayo a valores de aproximadamente un 40 % menores a los iniciales, es decir, valores ligeramente menores a los del quinto día. Esto indica que la fase inicial (hasta el quinto día) es crucial en el comportamiento del PH; luego del quinto día probablemente se ponen en marcha mecanismos reguladores que tienden a equiparar los valores del PH entre las distintas soluciones.

No se detectan diferencias entre los valores de control (ADA 5 mOsm) y las soluciones experimentales. Según el análisis de regresión múltiple, la variación del PH se debe fundamentalmente al efecto del tiempo y no a la concentración.

La tendencia del PH según el modelo ajustado por regresión múltiple es a incrementarse con la concentración y disminuir con el tiempo. La baja correlación evidencia la gran variabilidad

del PH que también se observa en el rango para los coeficientes de variación (Tabla 17).

El coeficiente de regresión es relativamente bajo (Tabla 17), probablemente a causa de la gran variabilidad registrada para este parámetro.

b) Peso seco (Figura 28): En ADA 20 mOsm y ADA 30 mOsm las larvas presentan valores de PS marcadamente superiores a los de las tres concentraciones restantes y disminuyen con el tiempo de exposición; en tanto que los valores de PS de las demás soluciones se mantienen en valores más cercanos y disminuyen menos abruptamente que las concentraciones superiores durante los primeros 15 días de exposición. A partir de este momento, los valores tienden a equipararse alcanzando, el día 27, valores muy cercanos entre las 5 soluciones ensayadas, incluido el control.

Al igual que en el caso de PH, se produce una fuerte disminución del PS entre el tiempo 0 y el primer muestreo (5to día); pero en este caso, el porcentaje de descenso del parámetro en cuestión es menor a mayor concentración, siendo del orden de 57% para ADE y del 35% en ADA 30 mOsm.

Según el modelo ajustado por regresión múltiple la variación del PS en función del tiempo es estadísticamente significativa al igual que la concentración. Según este modelo, la tendencia del PS es a disminuir con el tiempo de exposición y a incrementarse con el aumento de concentración, pero el rango de disminución del PS en el tiempo es más pronunciada en ADA 30 mOsm donde disminuye un 8% respecto al valor de los 5 días, 6% en ADA 20 mOsm, 4% en ADA 10 mOsm, 2% en ADE y un 1% en ADA 5 mOsm; es decir que el decremento es más pronunciado a mayor concentración. Entre concentraciones a los 5 días existe una diferencia del 5.5% entre ADA 30 mOsm y ADE, en tanto que a los 27 días esa diferencia es nula.

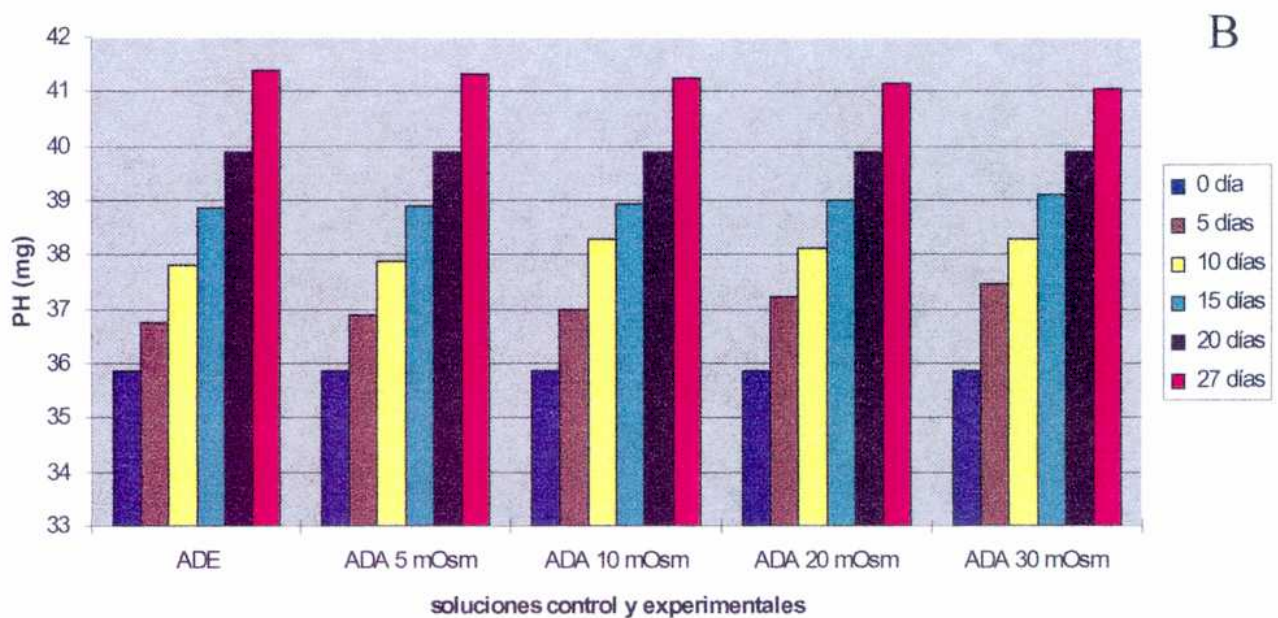
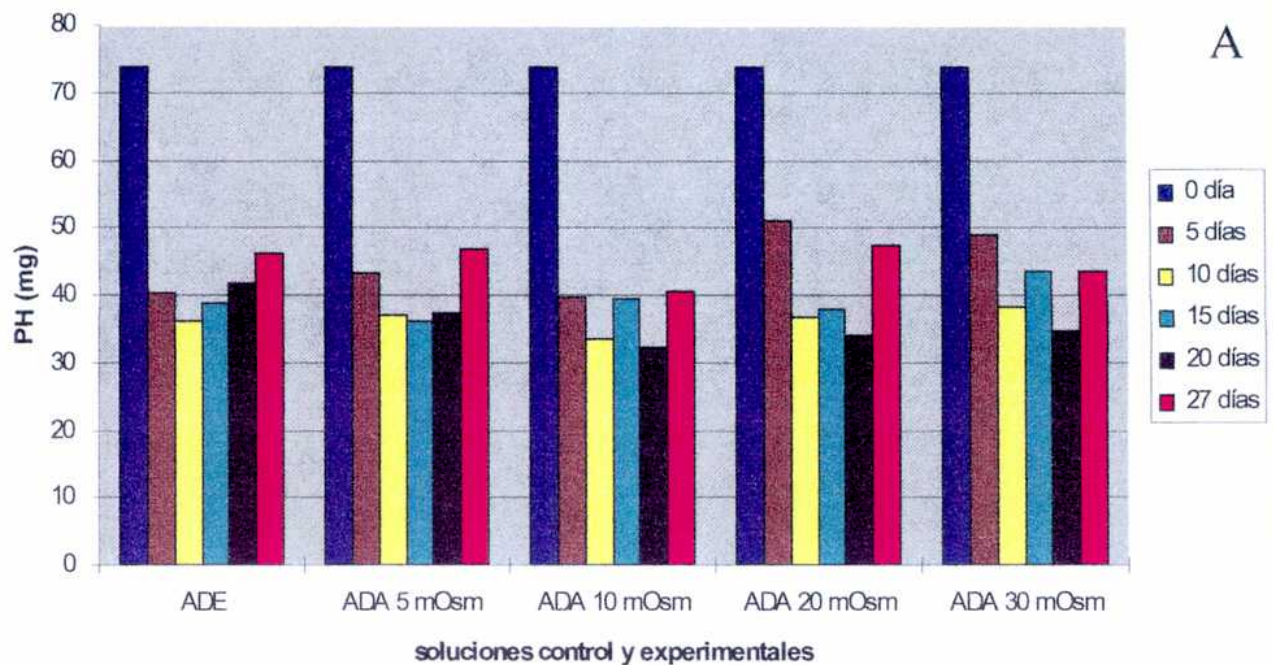


Figura 27: Variaciones del PH de larvas jóvenes expuestas en forma prolongada a soluciones de diferentes concentraciones de ADA y de ADE, en función del tiempo y de la concentración. A: valores medios experimentales; B: valores calculados de acuerdo con el modelo de regresión múltiple seleccionado.

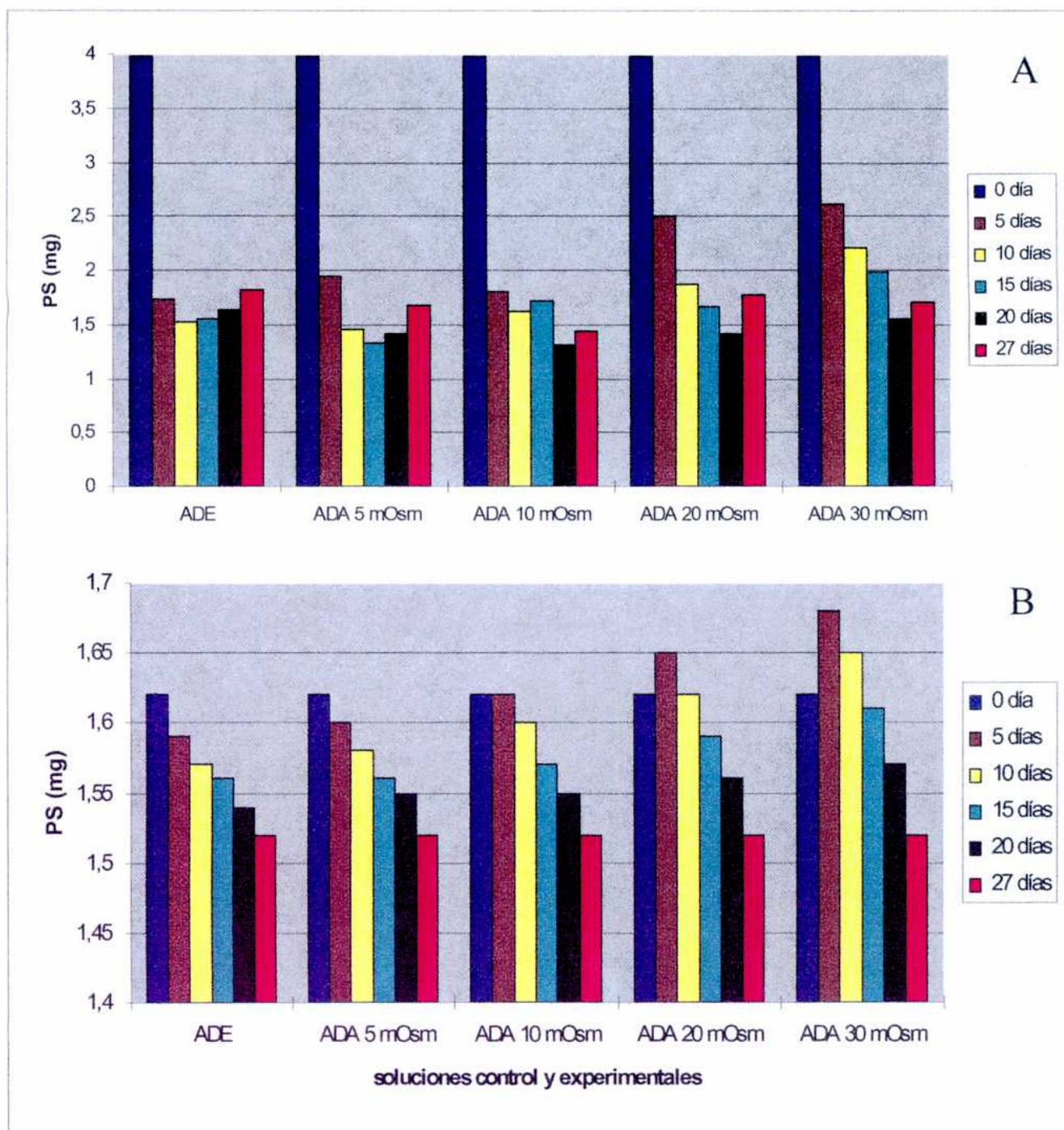


Figura 28: Variaciones del PS de larvas jóvenes expuestas en forma prolongada a soluciones de ADA de diferentes concentraciones y ADE, en función del tiempo y de la concentración. A: n-valores medios experimentales; B: valores calculados de acuerdo con el modelo de regresión múltiple seleccionado.

c) **Contenido de agua** (Figura 29): El comportamiento del CA evidencia la relación entre la variación del PH y PS. El CA se incrementa con el tiempo de exposición y disminuye con el aumento de concentración. el comportamiento es a igualar los valores entre las distintas concentraciones con el transcurso del tiempo.

ADE y ADA 5 mOsm se estabilizan en los valores de CA a partir del día 15 de experimentación, en tanto que las tres concentraciones restantes siguen una tendencia de ascenso, compensatoria. el incremento del CA es claro desde el tiempo 0, pero el porcentaje de su incremento entre el tiempo 0 y el 5to día de ensayo es mayor a menor concentración siendo del orden del 25% para ADE y practicamente nula para ADA 30 mOsm.

Según el modelo ajustado por regresión múltiple, la tendencia del CA es a disminuir con la concentración y a incrementarse con el tiempo de exposición. Ambas variables (tiempo y concentración) son estadísticamente significativas; la variabilidad del CA es menor que para PH y PS y el coeficiente de correlación es relativamente elevado (Tabla 17).

d) **Humedad** (Figura 30): La humedad presenta un comportamiento semejante al de CA. Según el modelo ajustado por regresión múltiple la H tiende a disminuir levemente con la concentración y a incrementarse también ligeramente con el tiempo. El coeficiente de regresión es alto y el intervalo de oscilación de los coeficientes de variación experimentales es estrecho (Tabla 17).

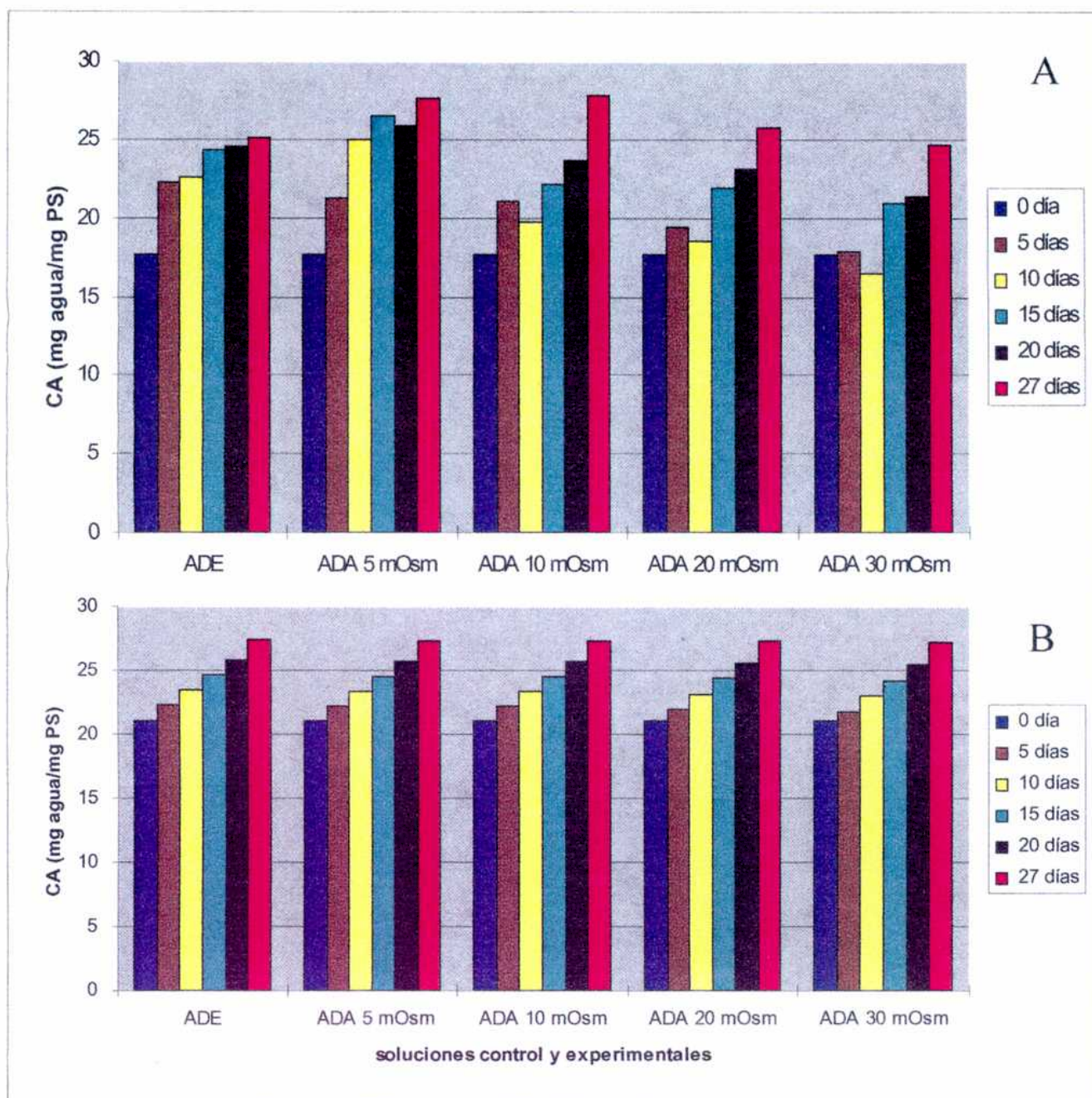


Figura 29: Variaciones del CA en larvas jóvenes expuestas en forma prolongada a soluciones de diferentes concentraciones de ADA y de ADE, en función del tiempo y de la concentración. A: valores medios experimentales; B: valores calculados de acuerdo con la ecuación de regresión múltiple.

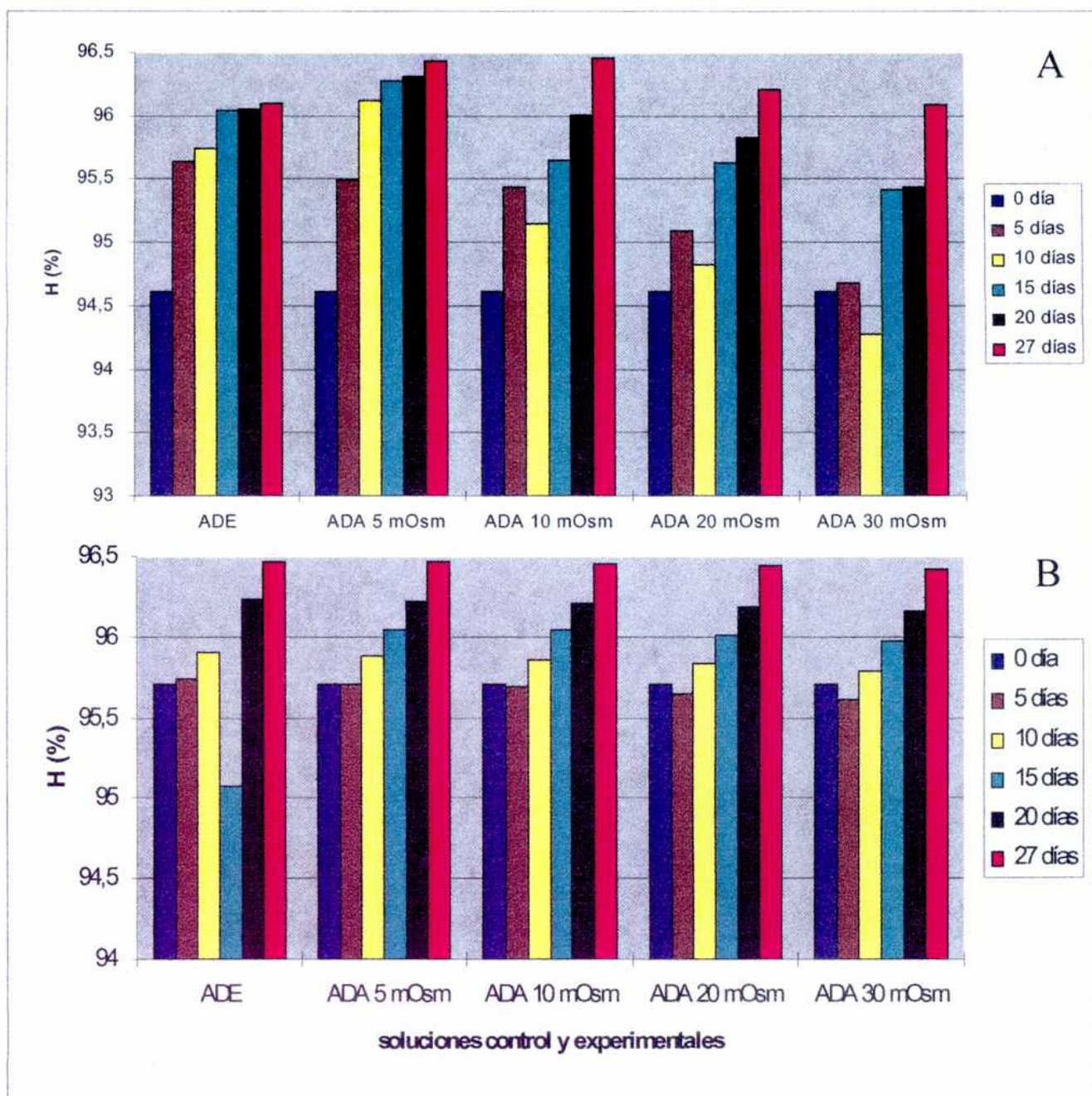


Figura 30: Variaciones de la H en larvas jóvenes expuestas en forma prolongada a soluciones de ADA de diferente concentración y a ADE, en función del tiempo y de la concentración. A: valores medios experimentales; B: valores esperados de acuerdo con la ecuación de regresión múltiple.

En resumen, podemos decir que tanto el PH como el PS presentan una gran heterogeneidad en sus valores, lo cual se refleja en los amplios intervalos observados para el coeficiente de variación y los bajos coeficientes de correlación. Las tendencias marcadas por el modelo ajustado por regresión pueden seguirse en los valores observados.

El CA y H reflejan la relación entre la variación de PH y PS (valores a partir de los cuales se calcula el CA y H). Estos muestran un comportamiento inverso en relación al tiempo evidentemente a causa de la mayor modificación en el tiempo sufrido por PH en reacción con PS. La variación en tiempo y entre concentraciones de PH y PS es menor que la de CA y H, lo cual se refleja en intervalos más pequeños para los coeficientes de variación y mayores coeficientes de correlación.

Para los cuatro parámetros analizados se puede generalizar que hasta aproximadamente la mitad del tiempo de experimentación, ADA20 mOsm y ADA 30 mOsm se diferencian del control, en tanto que ADE y ADA 10 mOsm se mantienen en valores muy cercanos a aquél. Hacia el final del experimento no existen diferencias entre las soluciones ensayadas y el control. En todos los casos las variaciones respecto al control fueron muy pequeñas.

II-e.2-Análisis Discriminante Múltiple

a) Análisis discriminante para cada una de las soluciones ensayadas.

Los valores de autovectores para la primera y segunda variables canónicas, (VC1 y VC2), así como su porcentaje de variación experimental se encuentran en la Tabla 18.

En todos los casos el tiempo 0 se diferencia de los restantes muy netamente; en ADE toda la significatividad del ANOVA, MANOVA y comparaciones múltiples está dada por esta diferencia (esto se demuestra cuando se efectúa el análisis sin considerar los datos del tiempo 0). Durante todo el tiempo de ensayo el comportamiento integrado de las variables es uniforme (Figura 31).

Tabla 18: valores de autovectores (AUT) para la primera y segunda variables canónicas (VC1 y VC2) para cada uno de los parámetros analizados y para cada una de las soluciones ensayadas. Análisis discriminante múltiple.

VAR: porcentaje de variación experimental acumulada explicado por la VC1 y VC2 respectivamente.

soluciones		PH	PS	CA	H	VAR
ADE	VC1	0.02	-3.49	0.04	-0.95	0.92
	VC2	-0.05	-2.44	-0.26	-2.07	0.98
ADA 5 mOsm	VC1	0.09	-4.68	-0.06	-0.87	0.85
	VC2	0.18	-5.76	0.17	-5.85	0.94
ADA 10mOsm	VC1	-0.12	-1.09	0.06	0.18	0.84
	VC2	0.05	-2.06	-0.37	-0.81	0.97
ADA 20 mOsm	VC1	-0.05	-1.90	0.09	-0.20	0.74
	VC2	0.05	-2.27	-0.36	-1.37	0.95
ADA 30 mOsm	VC1	0.02	0.29	-1.30	3.38	0.64
	VC2	0.03	-2.69	0.01	-3.37	0.95

En ADA 5 mOsm (Figura 31,B) las diferencias estadísticamente significativas se deben tanto a los valores del tiempo 0 como a los del primer muestreo. Estos difieren entre sí y con el resto, los que se comportan uniformemente.

En ADA 10 mOsm (Figura 31,C) el comportamiento en conjunto de las variables es estable durante los 5 y 15 días de exposición; a partir de este momento comienza una desestabilización. En ADA 20 mOsm y ADA 30 mOsm (Figura 31, D y E) el comportamiento de las variables es uniforme entre los 15 y 20 días de experimentación. La variable de mayor incidencia en el poder discriminante es el PS, salvo para ADA 30 mOsm en que es la H.

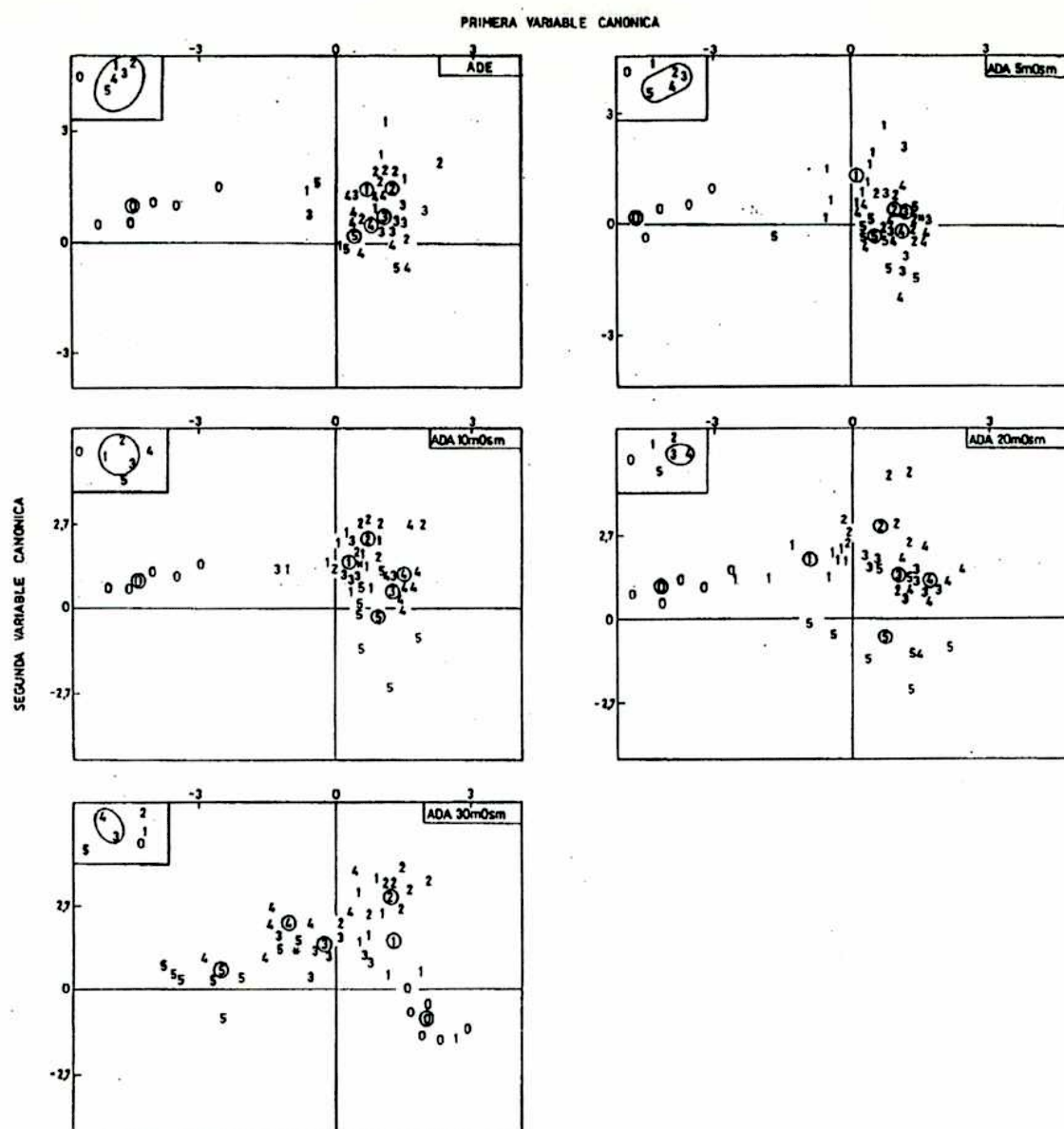


Figura 31: Análisis discriminante para las soluciones experimentales de ADE y ADA de diferentes concentraciones. Los números indican la posición relativa de cada muestra para cada tiempo evaluado (valores medios encerrados en círculos). En el margen superior izquierdo se encuentran esquematizadas las medias para cada tiempo, indicando los números encerrados, ausencia de diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de comparaciones múltiples. 0: tiempo 0; 1: 5 días de exposición; 2: 10 días de exposición; 3: 15 días de exposición; 4: 20 días de exposición; 5: 27 días de exposición.

En términos generales se puede decir que a partir de ADA 20 mOsm, las larvas no logran estabilizarse a lo largo del tiempo salvo entre los 15 y 20 días, siendo las variables menos compensadas PS y H. En ADA 10 mOsm se logra una estabilización durante los primeros quince días y luego se descompensa. ADE no presenta modificaciones en el curso de toda la experiencia, siendo el tratamiento de comportamiento más semejante al control, que se mantiene estable a partir del décimo día. Incluida la solución control, es muy notable la diferencia entre el tiempo 0 y el primer muestreo, lo cual evidencia una adaptación de las larvas a las condiciones experimentales. La tendencia a equiparar las condiciones del control con el transcurso del tiempo, lo cual ya quedó demostrado para cada variable en el análisis de regresión múltiple.

b) Análisis discriminante para cada uno de los tiempos muestreados

En la tabla 19 se encuentran los valores de autovectores para la VC1 y VC2, así como el porcentaje explicado de la variación experimental total.

En la figura 32 se presentan los gráficos de análisis discriminante para cada uno de los tiempos. Durante el transcurso del ensayo se integran tres grupos: ADE y ADA 5 mOsm (grupo 1), ADA 10 mOsm y ADA 20 mOsm (grupo 2) y ADA 20 mOsm y ADA 30 mOsm (grupo 3); éstos se encuentran conformados en todos los tiempos con excepción del muestreo del 10° día. ADA 20 mOsm se comporta como una solución de transición entre el grupo 1 por un lado y ADA 10 mOsm y ADA 30 mOsm por el otro. A partir del día 15, ADA 30 mOsm se integra con el grupo 2 y finalmente en el día 27 todas las soluciones se encuentran equiparadas al control (Figura 32). Para todos los tiempos considerados, la variable de mayor incidencia en el poder discriminante es el PS (Tabla 19).

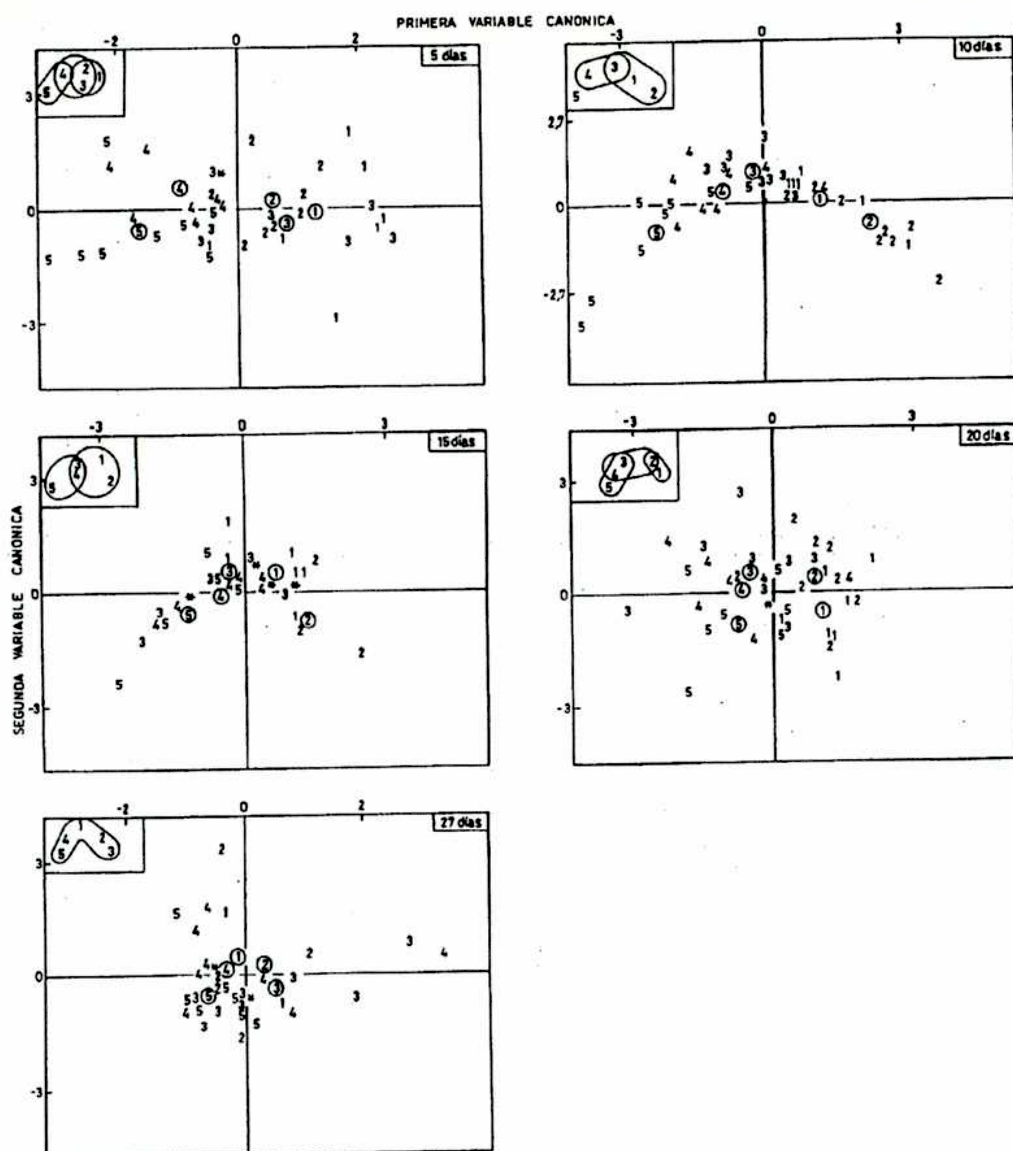


Figura 32: Análisis discriminante para cada tiempo ensayado entre las distintas soluciones. Los números representan la posición relativa de las larvas de cada solución para cada tiempo evaluado. Los números encerrados en círculo representan la media para cada solución. En el margen superior izquierdo se representa graficamente los resultados del test de comparaciones múltiples, indicando los números encerrados en círculos ausencia de diferencias estadísticas. 1: ADE; 2: ADA 5 mOsm; 3: ADA 10 mOsm; 4: ADA 20 mOsm; 5: ADA 30mOsm.

Tabla 19: Valores de autovectores para la primera y segunda variables canónicas (VC1 y VC2 respectivamente) para cada uno de los parámetros analizados y para cada uno de los tiempos ensayados. Análisis discriminante múltiple.

VAR: porcentaje de variación experimental acumulada para cada una de las VC.

tiempo		PH	PS	CA	H	VAR
5 días	VC1	-0.38	6.22	0.25	4.20	0.90
	VC2	0.74	-13.26	-0.34	-3.40	0.99
10 días	VC1	0.18	-4.50	0.41	-1.16	0.81
	VC2	0.61	-14.32	-1.31	0.50	0.98
15 días	VC1	0.18	-4.76	-0.11	1.60	0.76
	VC2	1.14	-25.05	-1.84	2.06	0.93
20 días	VC1	-0.67	20.65	1.32	0.84	0.62
	VC2	0.44	-14.26	-0.79	1.69	0.94
27 días	VC1	-0.48	11.85	0.67	1.61	0.53
	VC2	-0.33	11.33	0.60	0.18	0.85

CAPITULO III

RESULTADOS: SEGUNDA PARTE

EFFECTO DEL CADMIO SOBRE LA SOBREVIVENCIA Y EL BALANCE
HIDRICO DE LARVAS DE *Bufo arenarum*.

III-a. CONCENTRACION LETAL MEDIA (CL50) DE CADMIO EN LARVAS JOVENES Y PROMETAMORFICAS DE Bufo arenarum: EFECTO DE LA EDAD Y DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION.

La acción perjudicial del metal sobre las larvas se puede evaluar considerando, entre otros parámetros, la mortalidad las alteraciones morfológicas y los efectos comportamentales; la mortalidad se cuantifica mediante CL50. En cuanto a los demás efectos se ha observado que como respuesta a elevadas concentraciones de Cd, se produce una reducción de la actividad general, posición de natación atípica, incurvación axial contracciones arrítmicas, y alteraciones en la estructura y organización de la epidermis, principalmente desprendimiento de células en la región abdominal. Estos efectos se observan en las concentraciones cercanas a las CL50 y siempre son previos a la muerte. Los efectos son similares en las dos edades larvales utilizadas.

Puesto que tanto en larvas jóvenes (Figura 33) como en prometamórficas (Figura 34) existe superposición de límites fiduciales de CL50 entre las distintas series experimentales para 20 y 25°C respectivamente, se utilizó el criterio de unificarlas de acuerdo con el estadio y temperatura de ensayo.

En la Figura 35 se indican las curvas de sobrevivencia en función del tiempo para larvas jóvenes a 20 y 25°C. En ambas temperaturas los porcentajes de sobrevivencia en controles fueron siempre superiores al 95%. Tanto con 1 como con 2 ppm de Cd, las curvas de sobrevivencia no difieren entre las dos temperaturas de ensayo, en tanto que en 4 ppm la tasa de supervivencia a 25 °C se mantiene en valores de aproximadamente un 20% por encima de los registrados a 20°C durante todo el experimento y muestra siempre un patrón de descenso exponencial en contraposición a las concentraciones menores que presentan una tasa de descenso continuo. A concentraciones mayores que 4 ppm, la mortalidad fue muy superior a las que se informan dentro de las primeras 24 hs de exposición, motivo por el cual no se consideraron para la determinación de las CL50.

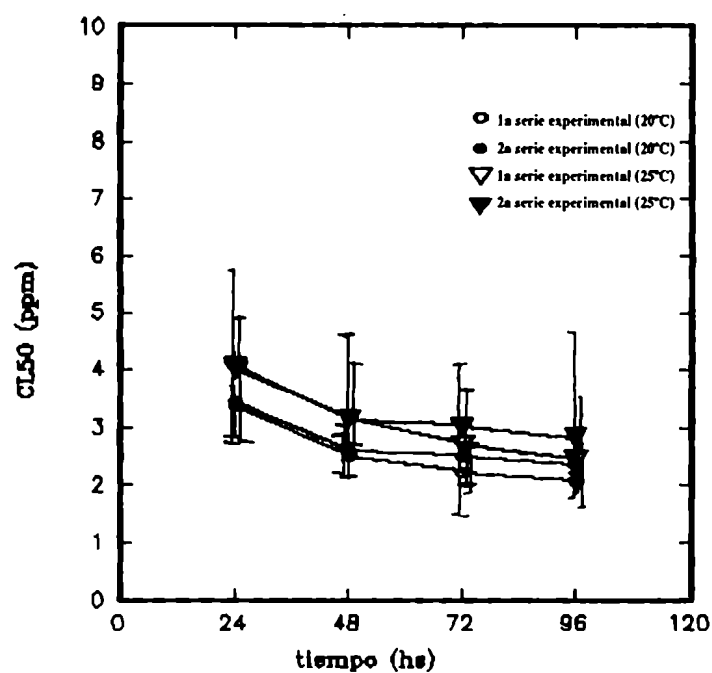


Figura 33: CL50 en función del tiempo de Cd y sus correspondientes intervalos de confianza para larvas jóvenes (estadio 26) a 20 y 25°C. (n=40 larvas por concentración).

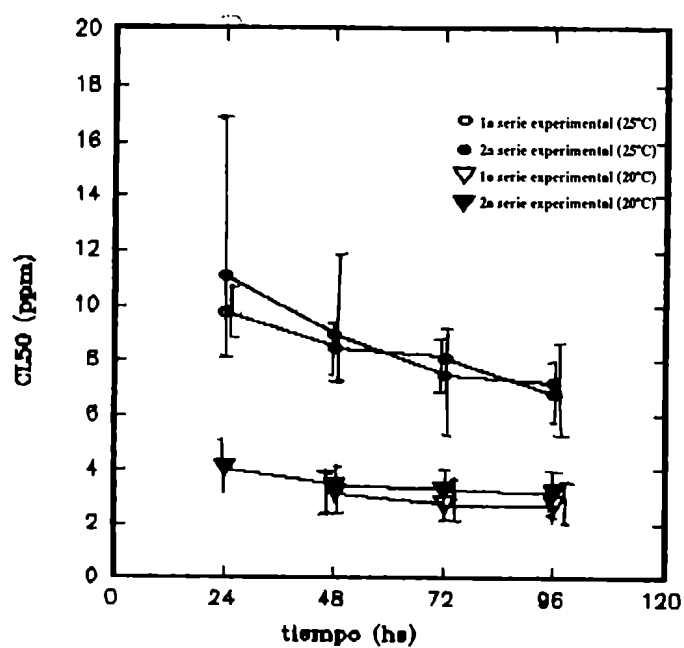


Figura 34: CL50 de Cd con sus correspondientes intervalos de confianza, en función del tiempo para larvas prometamórficas (estadio 28III/29). (n=30 y 20 larvas por concentración respectivamente).

En la Figura 36 se indican las curvas de supervivencia para larvas prometamórficas en función del tiempo para cada concentración ensayada a 20 y 25°C respectivamente. En este caso no se registraron muertes en los grupos control. Para todas las concentraciones de Cd ensayadas, se observaron diferencias importantes en la supervivencia, dependientes de la temperatura de ensayo: en tanto que a 25°C en 4 ppm de Cd, el 90 % de las larvas permanecen vivas al final del período experimental, a 20°C la tasa de supervivencia decrece abruptamente, con un comportamiento de tipo exponencial. Consecuentemente las diferencias en las tasas de supervivencia a 20 y 25°C tienden a incrementarse con el transcurso del tiempo: las larvas expuestas, en 20°C a 8 ppm mueren en su totalidad durante las primeras 24 hs de exposición, mientras que para el mismo tiempo, en 25°C presentan una supervivencia del 75%. La concentración de 16 ppm no fue ensayada a 20°C. Dicha concentración a 25°C muestra una elevada mortalidad desde las 24 hs de exposición, con un porcentaje de mortalidad superior al 90% a partir de las 48 hs.

Los resultados de los probits para los dos estadios larvales a 20 y 25 °C se encuentran resumidos en las Tablas 20 a 23. Las CL50 y sus intervalos de confianza para larvas jóvenes (Tablas 20 y 21) fueron ligeramente mayores a 25°C que a 20°C; los límites fiduciales se hallan parcialmente superpuestos. Estos resultados sugieren que su consideración debe ser cautelosa, indicando un incipiente efecto protector de la temperatura sobre la mortalidad debida a Cd. Este efecto protector de la temperatura es notable en larvas prometamórficas (Tablas 22 y 23) en las que un incremento de 5°C en la temperatura de incubación provoca un 100% de incremento de la CL50 durante todo el tiempo de ensayo.

En la Figura 37 se observan las CL50 con sus correspondiente intervalos de confianza para larvas jóvenes y prometamórficas a las dos temperaturas de ensayo, en función del tiempo. Se aprecia claramente la mayor sensibilidad de las larvas jóvenes, diferencia especialmente pronunciada a 25°C.

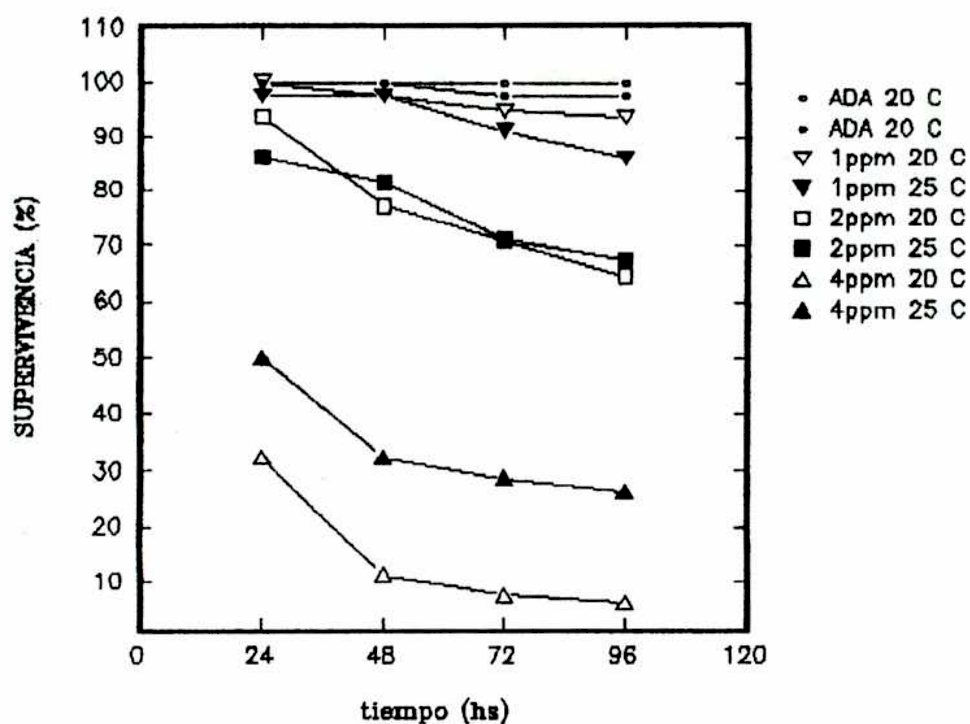


Figura 35: Supervivencia en función del tiempo en larvas jóvenes (estadio 26) expuestas a diferentes concentraciones de Cd a 20 y 25°C. (n= 80 larvas por concentración).

Tabla 20: Valores de CL50 de Cd para larvas jóvenes (estadio 26) incubadas a 20°C (n=80 larvas por concentración). Grados de libertad = 3.

tiempo (hs)	CL50 (ppm)	int. conf.	pend.	coef.corr.	X2
24	3.41	3.14-3.74	6.61	0.99	0.001
48	2.55	2.33-2.62	5.68	0.98	2.792
72	2.32	2.12-2.55	5.34	0.98	4.460
96	2.19	1.99-2.41	5.16	0.98	3.159

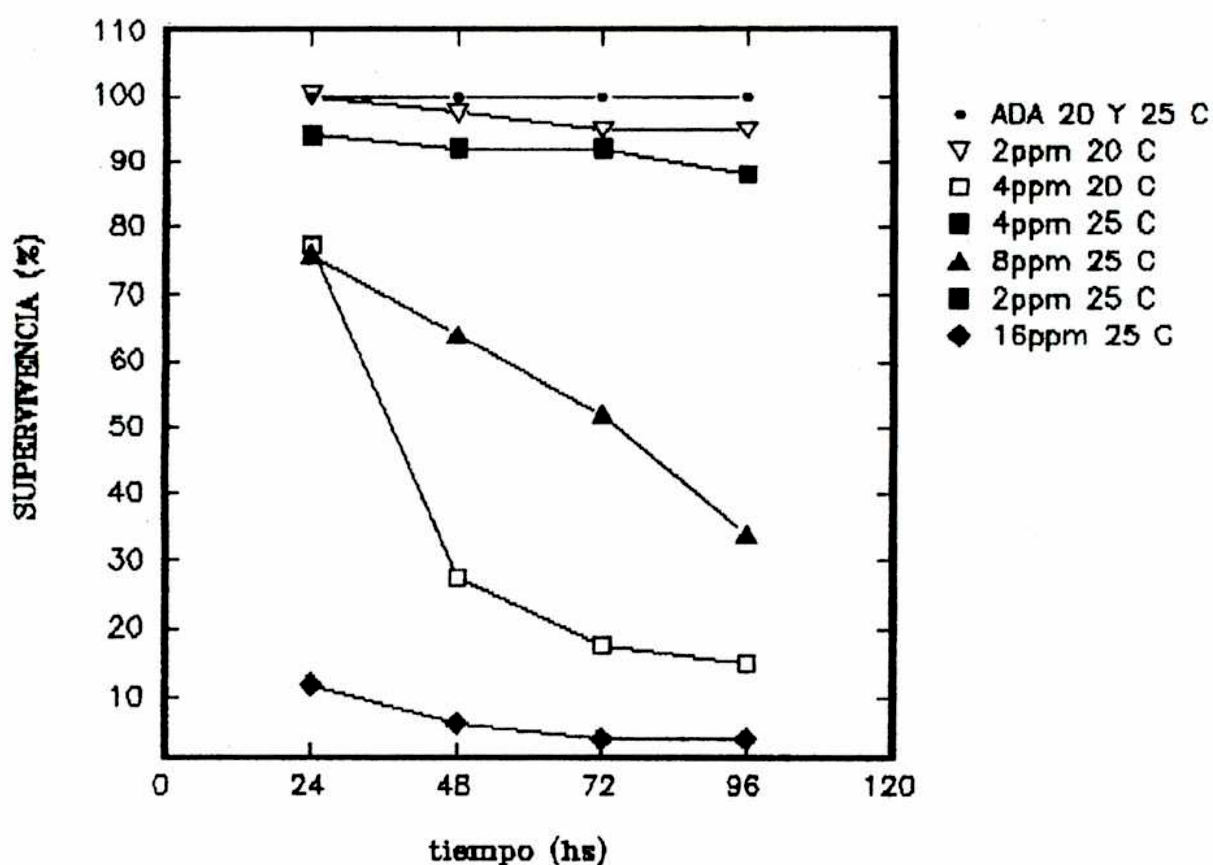


Figura 36: Supervivencia en función del tiempo para larvas prometamórficas expuestas a Cd entre 2 y 16 ppm, a 20 y 25°C (n=40 larvas por concentración en 20°C y 50 larvas por concentración en 25°C).

Tabla 21: Valores de CL50 de Cd para larvas jóvenes (estadio 26) incubadas a 25°C (n=80 larvas por concentración). Grados de libertad = 3.

tiempo (hs)	CL50 (ppm)	int. conf.	pend.	coef.corr.	X2
24	4.05	3.47-5.11	3.37	0.97	0.216
48	3.15	2.80-3.63	3.91	0.99	1.050
72	2.87	2.52-3.33	3.53	0.99	0.324
96	2.65	2.31-3.11	3.11	0.95	1.120

Tabla 22: Valores de CL50 de Cd para larvas prometamórficas (estadio 28III/29) incubadas a 20°C (n=40 larvas por concentración). Grados de libertad = 3.

tiempo (hs)	CL50 (ppm)	int. conf.	pend.	coef.corr.	X2
24	4.76	4.42-5.53	6.97	0.89	6.360
48	3.40	3.04-3.77	8.51	0.99	0.016
72	3.11	2.78-3.45	8.54	0.99	0.005
96	3.06	2.74-3.34	8.87	0.99	0.002

Tabla 23: Valores de CL50 de Cd para larvas prometamórficas (estadio 28III/29) incubadas a 25°C (n=50 larvas por concentración). Grados de libertad = 3.

tiempo (hs)	CL50 (ppm)	int. conf.	pend.	coef.corr.	X2
24	9.92	8.76-11.30	4.80	0.97	3.954
48	8.60	7.62- 9.75	4.93	0.98	2.693
72	7.84	6.95- 8.83	5.18	0.95	0.673
96	6.77	5.97- 7.65	4.94	0.99	0.216

De acuerdo con los resultados obtenidos (baja mortalidad, ausencia de alteraciones de tipo morfológico y etológico) se adoptó la concentración de 1 ppm de Cd a 20°C en larvas jóvenes como subletal (Figura 35). Por ello fue la utilizada en los ensayos posteriores de efecto del metal sobre el equilibrio hidromineral.

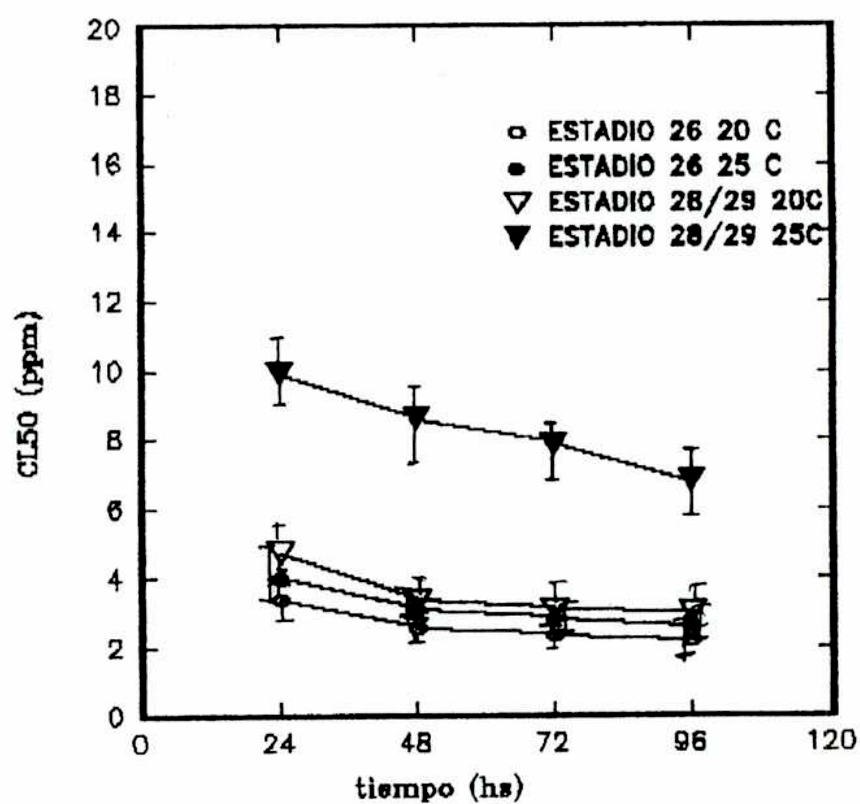


Figura 37: CL50 con sus correspondientes intervalos de confianza en función del tiempo para Cd en larvas jóvenes y prometamórficas a 20 y 25°C de temperatura de ensayo. Estadio 26, n=80 larvas por concentración en ambas temperaturas; estadio 28III/29, n=40 (20°C) y 50 (25°C) larvas por concentración.

III-b. EVALUACION CUANTITATIVA DEL EFECTO DE UNA CONCENTRACION SUBLETAL DE CADMIO SOBRE EL BALANCE HIDRICO DE LARVAS JOVENES DE Bufo arenarum BAJO CONDICIONES DE "STRESS" OSMOTICO: EFECTO PROTECTOR DE LOS IONES.

Las larvas incubadas en medio no iónico (MAN o ADE) con 1 ppm de Cd presentan un 100% de mortalidad en el curso de las primeras 12 hs de exposición, con signos visibles de alteraciones epidérmicas. Las larvas sometidas a las mismas soluciones sin cadmio sobreviven sin mortalidad durante todo el tiempo de experimentación. En consecuencia ambas soluciones no iónicas no se consideran en la evaluación estadística de balance hídrico. En las soluciones iónicas no hubo mortalidad ni signos de alteraciones epidérmicas durante todo el tiempo de ensayo.

En las Figuras 38 a 41 se representan los valores medios experimentales para PH, PS, CA y H de las distintas soluciones en función del tiempo de ensayo. En ninguna de las soluciones iónicas se hallan variaciones significativas de los cuatro parámetros considerados en forma individual.

Se evidencia una tendencia de PH y PS menores para ClNa con y sin Cd en relación a las demás soluciones consideradas, lo cual determina CA ligeramente menores que los de controles. En ADA 30 mOsm con y sin Cd se observan los mayores PS, pero al no existir variaciones significativas en los PH, no se detectan diferencias en los CA en relación a los controles. La H no presenta variaciones entre las distintas soluciones.

Del ANOVA de dos factores cuyos resultados se muestran en la Tabla 24, se desprende que no existen diferencias para ninguno de los parámetros en cada una de las soluciones debido a la presencia de cadmio.

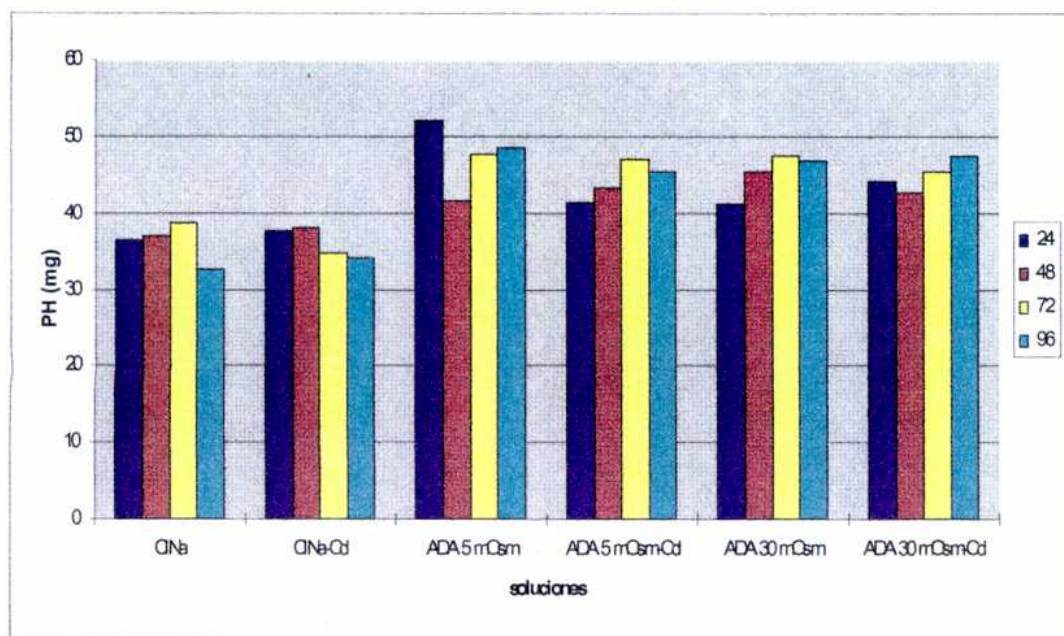


Figura 38: Valores medios de peso húmedo (PH) en función del tiempo, en larvas jóvenes expuestas a "stress" osmótico en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd.

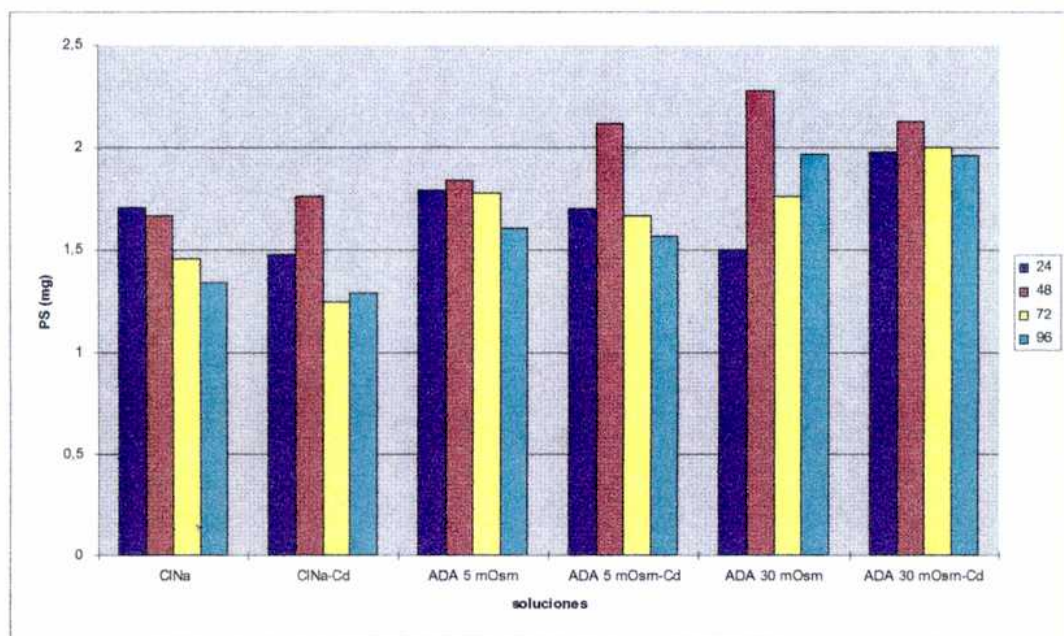


Figura 39: Valores medios de peso seco (PS) en larvas jóvenes expuestas a "stress" osmótico en presencia y en ausencia de 1 ppm de Cd.

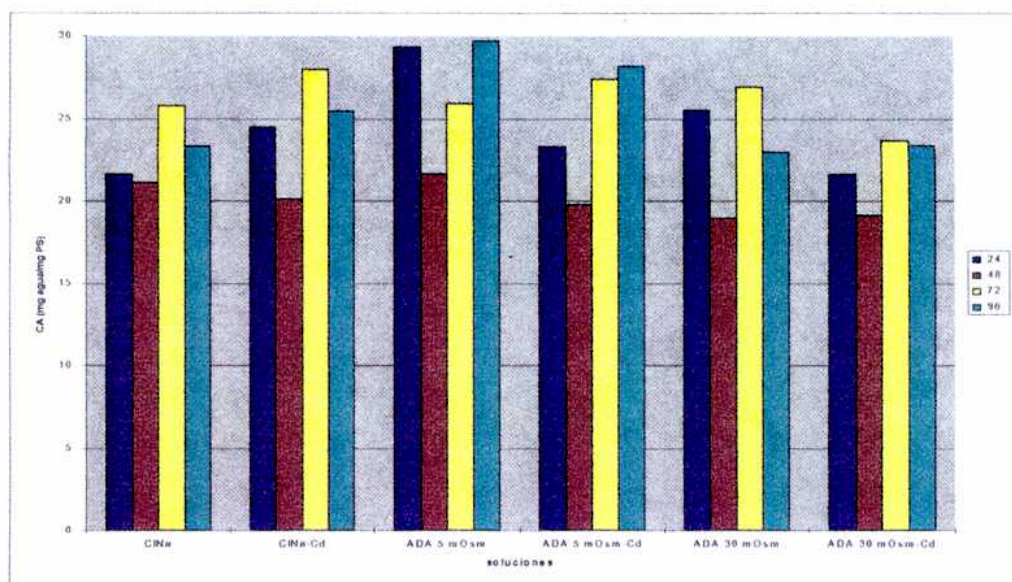


Figura 40: Valores medios de contenido de agua (CA) en función del tiempo en larvas jóvenes expuestas a "stress" osmótico en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd.

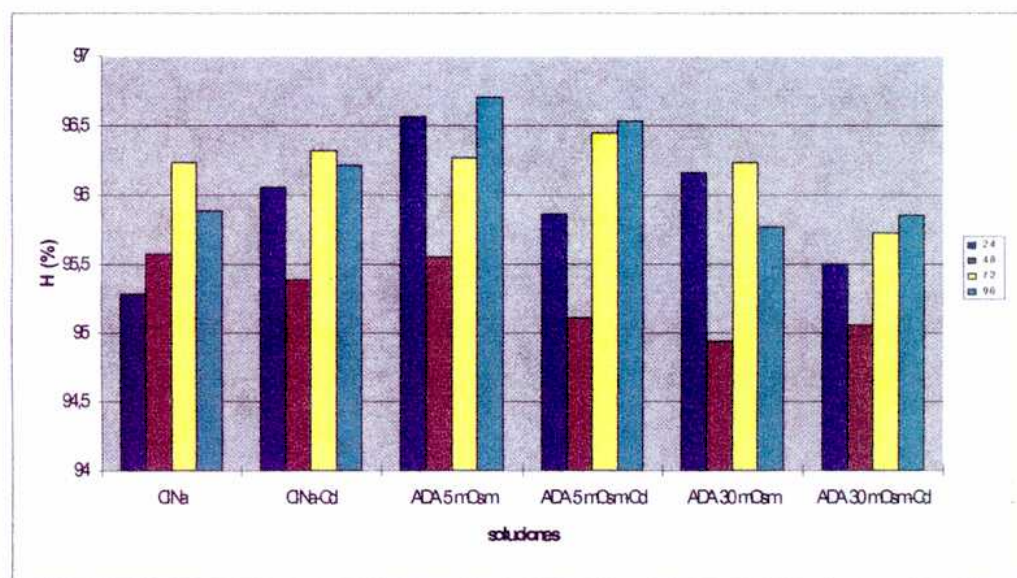


Figura 41: Valores medios de humedad (H) en función del tiempo en larvas jóvenes expuestas a "stress" osmótico en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd.

Tabla 24: Intervalo de valores medios (n=8) de PH (mg), PS (mg), CA (mg H₂O/mgPS) y H (%) para cada solución sin (C) y con Cd (E) . Se indica el valor de F de Snedecor resultante del ANOVA entre tratamientos. ninguno fue significativo.

	PH		PS		CA		H	
soluciones	C	E	C	E	C	E	C	E
ADA 5 mOsm	41.51 a	41.26 a	1.61 a	1.57 a	21.66 a	19.79 a	95.55 a	95.11 a
	52.08	47.09	1.84	2.12	29.67	28.17	96.70	96.53
	F=1.81		F=0.24		F=0.38		F=0.18	
ADA 30 mOsm	41.15 a	42.75 a	1.57 a	1.85 a	18.92 a	19.14 a	94.94 a	95.00 a
	47.52	47.42	2.28	2.13	26.89	23.63	96.23	95.86
	F=0.14		F=0.00		F=0.50		F=0.22	
ClNa 141 mOsm	32.55 a	34.18 a	1.34 a	1.25 a	20.27 a	21.08 a	95.28 a	95.05 a
	38.66	38.05	1.71	1.73	25.74	26.38	96.16	96.32
	F=0.00		F=2.44		F=3.41		F=2.22	

a) Análisis discriminante múltiple para cada una de las soluciones ensayadas

En la Tabla 25 se hallan los valores de autovectores, correspondientes a los cuatro parámetros analizados, para la primera y segunda variables canónicas y el porcentaje explicado de la variación experimental total para cada solución ensayada. En la Figura 42 se representa la posición relativa de cada dato, que se compone de las 4 variables consideradas en forma integrada, y el valor promedio para cada tiempo (encerrado en círculo). En el ángulo inferior derecho se representan esquemáticamente los valores medios para cada tiempo, indicando aquéllos encerrados en círculos ausencia de significatividad estadística, de acuerdo con el "test" de comparaciones múltiples.

En todos los casos los principales parámetros de la función discriminante son el PS y H . En la Figura 42 puede observarse el comportamiento integrado de las variables en función del tiempo. Estos resultados sugieren que no existen diferencias estadísticamente significativas en el comportamiento integrado de los parámetros en cada solución en función del tiempo por la presencia de 1 ppm de Cd.

Tabla 25: Respuesta integrada de las larvas en función del tiempo a la exposición a las diferentes soluciones en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd. Análisis discriminante múltiple

s/Cd solución control sin cadmio; c/Cd: solución experimental con 1 ppm de Cd; PARAMETROS: parámetros morfológicos evaluados; VAR: porcentaje acumulado de la variación experimental total; CV1 y CV2: primera y segunda variables canónicas.

soluciones			PH	PS	CA	H	VAR
ADA 5 mOsm	s/Cd	CV1	-0.41	-8.77	-0.25	0.07	0.89
		CV2	-0.05	3.53	0.61	-1.64	0.95
	c/Cd	CV1	0.05	-1.31	-0.15	-2.11	0.80
		CV1	-0.45	7.34	-0.64	7.27	0.94
ADA 30 mOsm	s/Cd	CV1	0.01	2.27	0.23	2.17	0.73
		CV2	-0.34	5.54	-0.36	4.45	0.88
	c/Cd	CV1	0.69	-1.16	-0.29	-1.16	0.64
		CV1	-0.27	5.40	-1.98	0.93	
ClNa 141mOsm	s/Cd	CV1	-0.32	13.74	0.52	-0.91	0.71
		CV2	0.62	19.15	-1.48	0.86	0.94
	c/Cd	CV1	-0.43	17.43	0.42	1.17	0.78
		CV1	-0.70	-13.94	-0.92	0.93	0.95

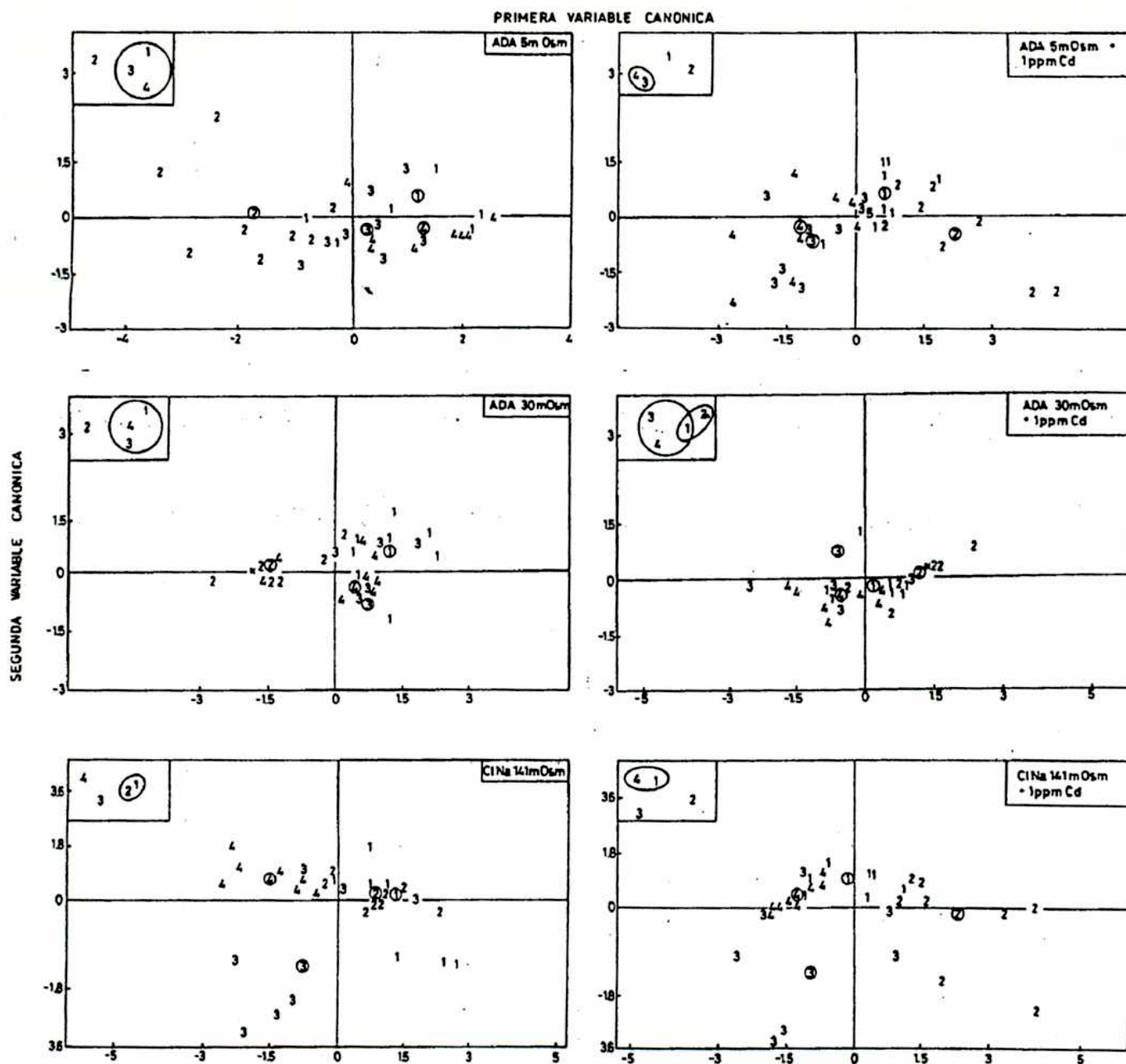


Figura 42: Análisis discriminante para cada solución ensayada. Los números encerrados en círculos representan el valor promedio para cada tiempo muestreado. En el ángulo superior izquierdo se esquematizan las medias para cada tiempo y se indican mediante un círculo ausencia de diferencias estadísticamente significativas.

1:24hs; 2:48hs; 3: 72hs; 4:96 hs.

b) Análisis discriminante múltiple entre las distintas soluciones, para cada tiempo muestreado

En la Tabla 26 se indican los valores de autovectores para la primera y segunda variables canónicas y el porcentaje explicado de la variación experimental total para cada uno de los tiempos considerados. En la Figura 43 se indica la posición relativa de cada dato y el valor promedio para cada uno de las soluciones ensayadas; en el ángulo inferior izquierdo se esquematiza el resultado de las comparaciones múltiples para cada tiempo ensayado; aquellas encerradas en círculos indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas.

En todos los tiempos el parámetro de mayor incidencia en la capacidad discriminante es el PS en primer término y el H en segundo término.

A las 24 hs se agrupan ClNa-Cd, ADA 5 mOsm-Cd y ADA 30 mOsm; las 3 soluciones restantes se diferencian entre sí y del grupo, y que cada solución está separada de su control sin Cd.

A partir de las 48 hs en adelante, cada solución permanece agrupada con su control y ADA 5 mOsm con y sin Cd toman una posición intermedia entre los otros dos grupos que siempre permanecen aislados uno del otro; un comportamiento similar se observa a las 72 hs. A las 96 hs ambas soluciones experimentales se separan del control.

Tabla 26: Respuesta integrada de las larvas de Bufo arenarum sometidas a "stress" osmótico para cada tiempo muestreado comparando todas las soluciones ensayadas. Análisis discriminante múltiple.

PARAMETROS		PH	PS	CA	H	VAR
24 hs	CV1	-0.60	13.12	0.34	1.14	0.49
	CV2	-0.18	-0.17	-0.58	5.87	0.83
48 hs	CV1	-0.43	5.26	0.38	1.89	0.77
	CV2	-0.39	7.72	-0.86	6.14	0.92
72 hs	CV1	-0.24	1.86	0.14	0.54	0.70
	CV2	0.12	-3.46	-0.52	3.17	0.95
96 hs	CV1	0.06	-7.41	-0.86	2.03	0.72
	CV2	0.28	-8.83	0.24	-2.91	0.96

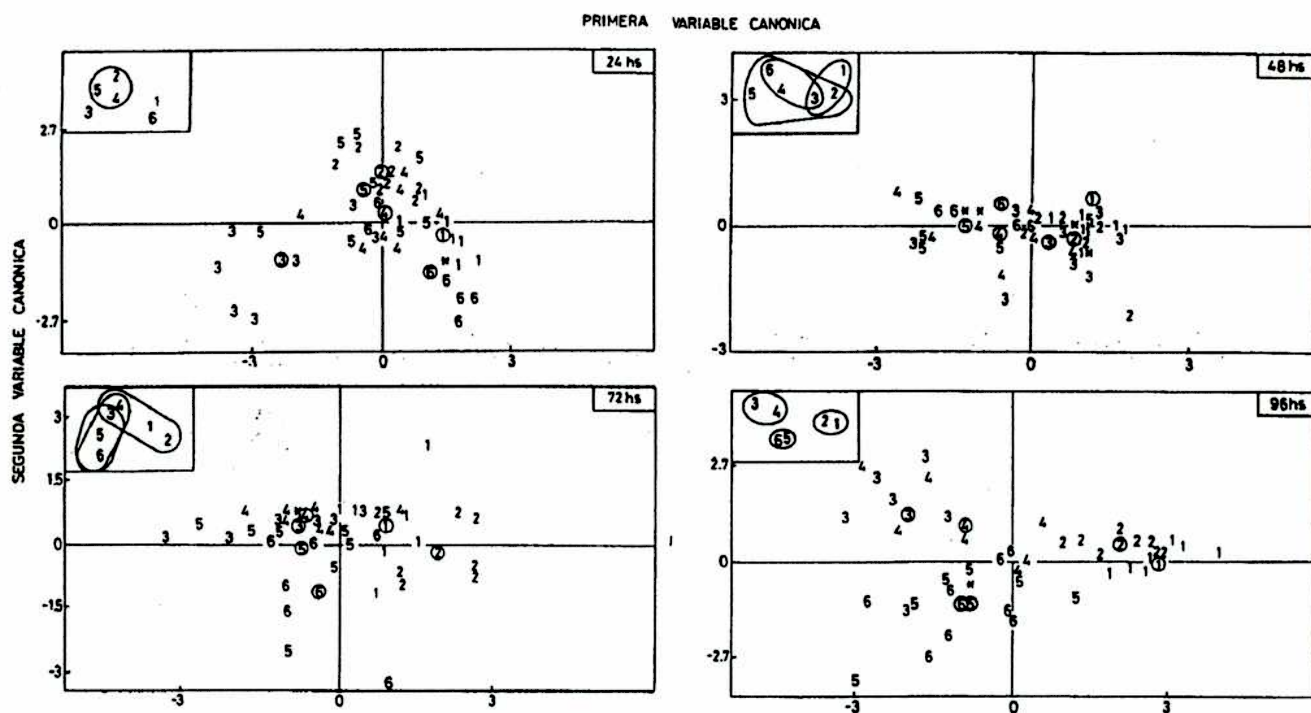


Figura43: Análisis discriminante para cada uno de los tiempos muestreados . Para interpretar la figura remitirse a leyenda de Figura 10.

1:ClNa; 2:ClNa-Cd; 3:ADA1; 4:ADA1-Cd; 5: ADA6; 6:ADA6-Cd.

III-c. EFECTOS DEL CADMIO SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA EPIDERMIS DE LARVAS DE Bufo arearum EXPUESTAS A SOLUCIONES DE DIFERENTE COMPOSICION QUIMICA Y OSMOLARIDAD .

La epidermis de las larvas modifica su estructura con la edad, comenzando como una única capa de células hasta "cornificarse" en el estadio juvenil. Además, el grosor de la epidermis varía en diferentes regiones de la larva. Las células más abundantes durante el desarrollo larval son las células glandulares de forma característicamente poliédrica; éstas presentan numerosas microvellosidades que en muchos casos se anastomosan entre sí. Se observan también pequeños glóbulos y esporádicamente se encuentran pequeños orificios en la membrana celular. Las células ciliadas, cuya función tendría relación con la locomoción, son muy abundantes durante la segunda mitad del desarrollo embrionario. Este tipo celular aún persiste en los estadios 25 y 26: se encuentran en regresión y rodeadas por células glandulares; presentan una superficie apical menor que aquéllas y son de forma circular, con signos evidentes de involución ciliar. Su superficie apical presenta numerosos pliegues que se anastomosan entre sí dando la imagen de un retículo (Herkovits y Pisanó, 1980; Herkovits y Pésico, 1982).

La superficie de contacto entre células glandulares y/o ciliadas sobresale sobre la superficie epitelial, lo que permite visualizar con nitidez los límites celulares (Figura 44 A). Se ha reportado la existencia de numerosos desmosomas por debajo del complejo de unión apico-lateral (Herkovits y Pisanó, 1980).

Como ya se anticipó, las larvas mantenidas en medio iónico control (ADA 5 mOsm) y expuestas a concentraciones de Cd, cercanas a la CL50, presentan, entre otros efectos, descamación de toda la epidermis, principalmente de la zona abdominal. El aspecto característico de la epidermis de una larva afectada por intoxicación aguda con cadmio es el

que se aprecia en la Figura 44,C; se observa una epidermis lisa con granulaciones sobrepuestas en la superficie. Un detalle a mayor aumento permite comprobar que se trata de un acumulo de células desprendidas sobre una epidermis lisa en la que no se diferencian límites celulares (Figura 44,D). También suelen observarse perforaciones sobre la superficie apical de éstas (Figura 44,B) las que indudablemente deben alterar el sistema de intercambio iónico de membrana, si bien dichas perforaciones también se observan, en algunas ocasiones, en animales control. Como fuera descrito en este mismo Capítulo (III-B), cuando las larvas se incubaron en medio iónico en presencia de una concentración subletal de Cd de 1 ppm, se produjo un 100% de mortalidad antes de las 12 hs de exposición. Su aspecto fue el mismo que el de larvas muertas a mayores concentraciones del metal luego de 24 hs de exposición, en tanto que las mantenidas en los medios iónicos en ausencia de Cd no presentaron mortalidad ni evidencias de alteraciones epidérmicas de ningún tipo durante todo el tiempo de ensayo siendo indistinguibles de controles. Este fenómeno fue interpretado como efecto protector de los iones sobre la toxicidad del Cd.

Con el objeto de evaluar las alteraciones epidérmicas se fijaron las larvas antes de las 6 hs de exposición a MAN-141 mOsm y ADE con y sin 1 ppm de Cd. En la Figura 45,A se aprecia el aspecto típico, a bajo aumento, de la epidermis de una larva expuesta a MAN-141 mOsm, el que no difiere del de larvas expuestas a las soluciones iónicas, de cualquier composición química ensayada. En la Figura 45,B se muestra el aspecto de la epidermis de una larva expuesta a la misma solución con 1 ppm de Cd; no se aprecian los límites celulares con claridad y se observan células en proceso de desprendimiento parcial o total; en este último caso, las células adquieren un aspecto esférico. En la Figura 45,C y D se muestran a mayor aumento, el aspecto de la epidermis en MAN-141 mOsm con y sin Cd respectivamente. En ausencia del metal la superficie de contactoápico lateral entre células glandulares sobresale sobre la superficie epitelial, observándose claramente los límites celulares; también se ven abundantes microvellosidades en la superficie apical de las células,. Este aspecto contrasta notablemente con el de larvas tratadas con Cd (Figura 45,D) donde no se distinguen los límites celulares y disminuye el número de microvellosidades; en el centro de la fotografía se observa una célula ciliada con su superficie apical perforada en vías de desprendimiento. En

la Figura 46,B se ven células epidermicas desprendiéndose; es de destacar el aspecto colapsado de su superficie, probablemente como una consecuencia de la deshidratación causada por la elevada concentración del medio externo. En la Figura 47,A se muestra la epidermis, de aspecto típico, de una larva control MAN-141 mOsm; en B y C se ilustran dos estados de desestructuración de la epidermis de una larva expuesta a la misma solución con Cd; se visualiza claramente la desorganización de la superficie de contacto entre células, la pérdida de volumen celular y las perforaciones de la superficie apical de las células. Resultados semejantes a los que se acaban de describir se obtienen con larvas expuestas a ADE con 1 ppm de Cd. En la Figura 48,A se observa el aspecto de la epidermis abdominal de una larva en ADE el que es prácticamente indistinguible de ADA-5mOsm (Figura 44,A) y de MAN-141 mOsm (Figura 47,A). Con el agregado de Cd, como en el caso de MAN-141 mOsm con 1 ppm de Cd, también se observó el mismo fenómeno de desprendimiento intercelular y posterior desprendimiento de las células así como perforaciones en su superficie (Figura 48,B y C). La única diferencia con las larvas de MAN-Cd radica en la mayor turgencia de las células, seguramente ligada a la incubación en medio hiposmótico. En la Figura 49 se aprecian detalles de la epidermis control-ADE (Figura 49,A) y de una larva tratada ADE-Cd (Figura 49,B) donde se hacen evidentes el desprendimiento de las células entre sí y las perforaciones en su superficie. El efecto tan drástico hallado en estas larvas expuestas a Cd en medio no iónico, no se repite ni siquiera con mayor tiempo de exposición a la misma concentración de Cd en medio iónico, tanto en ClNa 141 mOsm como en ADA concentrada de 30 mOsm o ADA control de 5 mOsm. En la Figura 50, A,B y C se observa la epidermis abdominal de larvas sometidas durante 24 hs a 1 ppm de Cd en ADA 5 y 30 mOsm y a ClNa 141 mOsm. La epidermis no muestra signos de desestructuración de ningún tipo y no se puede diferenciar entre ellas ni entre los de animales tratados con cadmio.

Figura 44: Microfotografías de MEB de la epidermis de larvas jóvenes de Bufo arenarum expuestas a solución de ADA-5 mOsm conteniendo 4 ppm de Cd. A: (aumento 3000x) epidermis abdominal de larva control en ADA-5 mOsm. B: (aumento 3000x) epidermis abdominal de larva expuesta a Cd durante 24 hs, la flecha indica zona de perforaciones de membrana. C: (aumento 100x) vista general de una larva expuesta a 4 ppm de Cd 24 hs, zona dorsoposterior, se observan acúmulos de células desprendidas (C) D: (aumento 100x) detalle de la zona observada en C.

Figura 45: Microfotografías de MEB de la epidermis de larvas jóvenes de Bufo arenarum expuestas a MAN-141 mOsm en presencia y ausencia de 1 ppm de Cd. A: (aumento 700x) epidermis dorsal de larva control-MAN, se observan los límites celulares nítidos. B: (aumento 700x) la misma zona que en A de una larva tratada con Cd; se observan células desprendidas (C) y desestructuración de límites celulares (L). C: (aumento 4500x) epidermis abdominal de control-MAN, la flecha señala límites celulares; también se indican microvellosidades (M). D: (aumento 4500x) la misma zona de un animal tratado en igual solución con 1 ppm de Cd (M: microvellosidades, CC: célula ciliada).

Figura 46: Microfotografías de MEB de epidermis abdominal de larvas jóvenes expuestas a MAN-141 mOsm con 1ppm Cd. A: (aumento: 3000x) corresponde a una imagen semejante a fig.44,D. B: otro sector cercano a lo fotografiado en A donde se observan las células en vías de desprendimiento de la superficie epitelial (C) con perforaciones en su superficie (P)

Figura 47: Microfotografías de MEB de piel abdominal de larvas jóvenes expuestas a MAN-141 mOsm con y sin 1 ppm de Cd. A: (aumento: 2000x) aspecto característico de control, se ven células glandulares (G), uniones celulares muy fuertes; (L) célula ciliada en la que se han perdido las cilias (CC) y microvellosidades (M). B: (aumento:2000x) la misma zona que la anterior de una larva expuesta a igual solución con 1 ppm de Cd. Se aprecia claramente la desintegración de las uniones celulares (L) y las perforaciones de la superficie apical de las células (P). C: (aumento:2000x) corresponde a otro detalle de la piel abdominal

de la misma larva que en B, probablemente un paso posterior en el proceso de desprendimiento de células.

Figura 48: Microfotografías de MEB de piel abdominal de larvas jóvenes expuestas a ADE con y sin Cd. A: (aumento: 1500x) aspecto de epidermis control ADE con límites celulares fuertes; (L) entre células glandulares (G) en las superficie de las que se observan microvellosidades. B: (aumento: 1500x) la misma zona de una larva expuesta a igual solución en presencia de 1 ppm de Cd, se observa desintegración de uniones intercelulares (L) y algunas perforaciones (P). C: (aumento: 1500x) otra zona cercana a la fotografiada en B donde se observa a las células protruyendo con un aspecto más turgente que en el caso de MAN-141 mOsm.

Figura 49: Microfotografía de MEB de piel abdominal de larvas jóvenes expuestas a ADE con y sin 1 ppm de Cd. A: (aumento: 7000x) epidermis control, L: unión intercélulas, M: microvellosidades. B: (aumento: 7000x) la misma zona que en la fotografía anterior de una larva en igual solución con Cd donde se observa claramente el proceso de desintegración de las uniones celulares (L) así como las perforaciones en la superficie (P).

Figura 50: Microfotografías de MEB de piel abdominal de larvas jóvenes expuestas por un período de 24 hs a soluciones iónicas conteniendo Cd. A: ADA-5mOsm + 1ppm de Cd. B: ADA-30 mOsm+1ppm de Cd. C: ClNa-141 mOsm+ 1ppm de Cd. (Aumento :1000x).

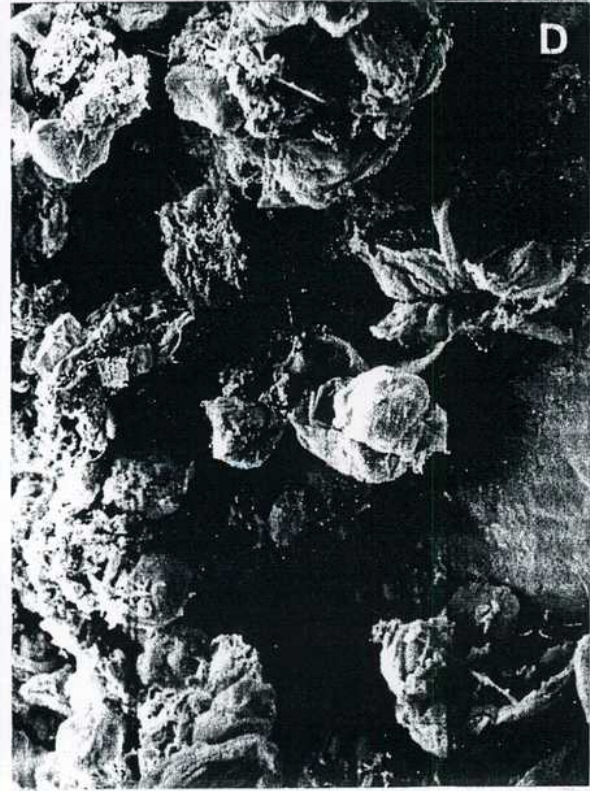
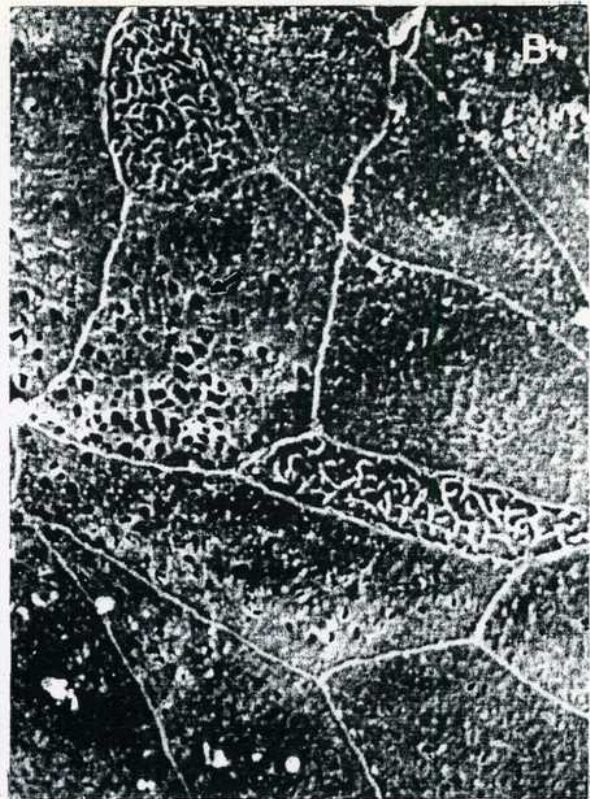


Figura 44

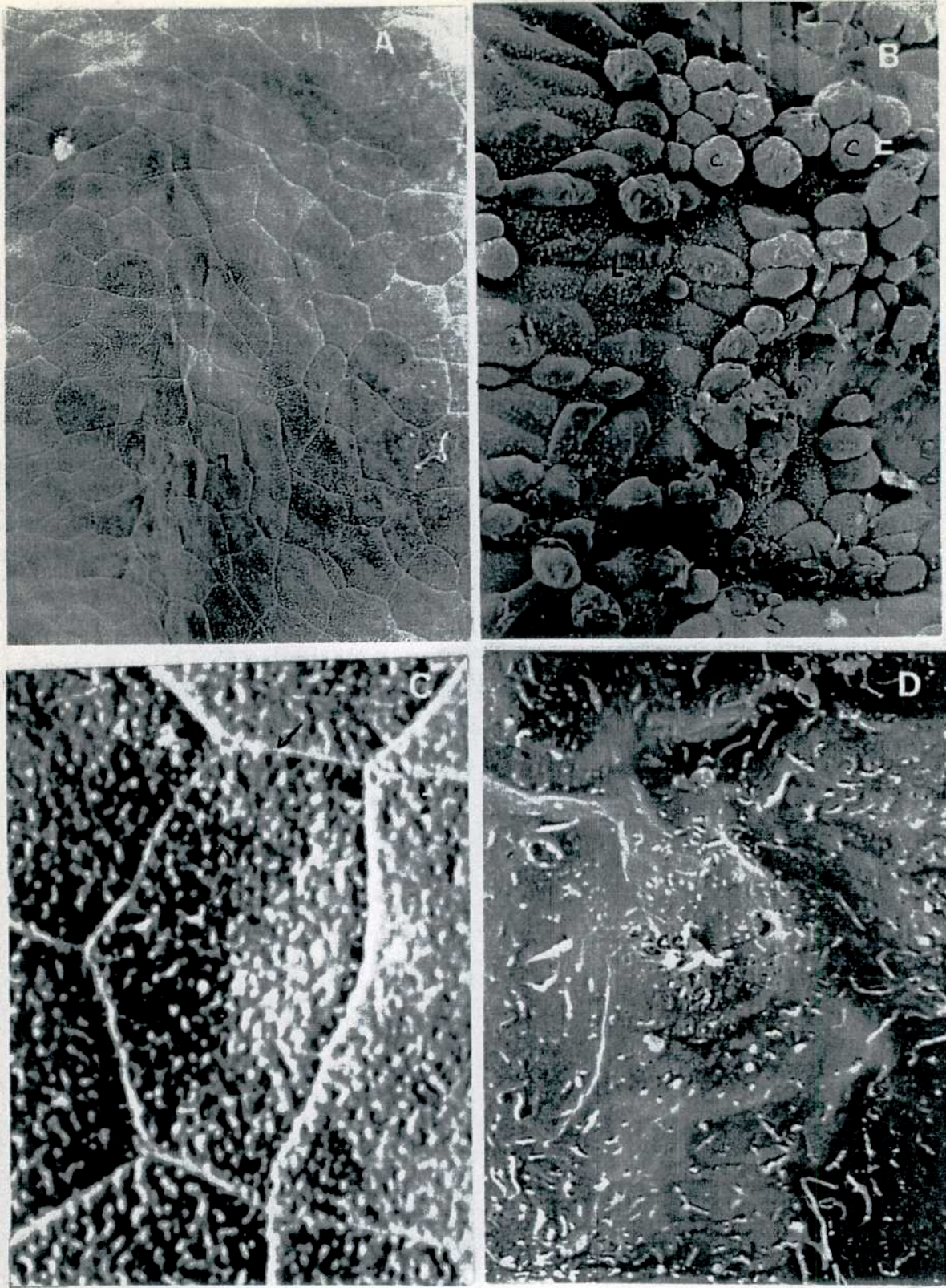


Figura 45

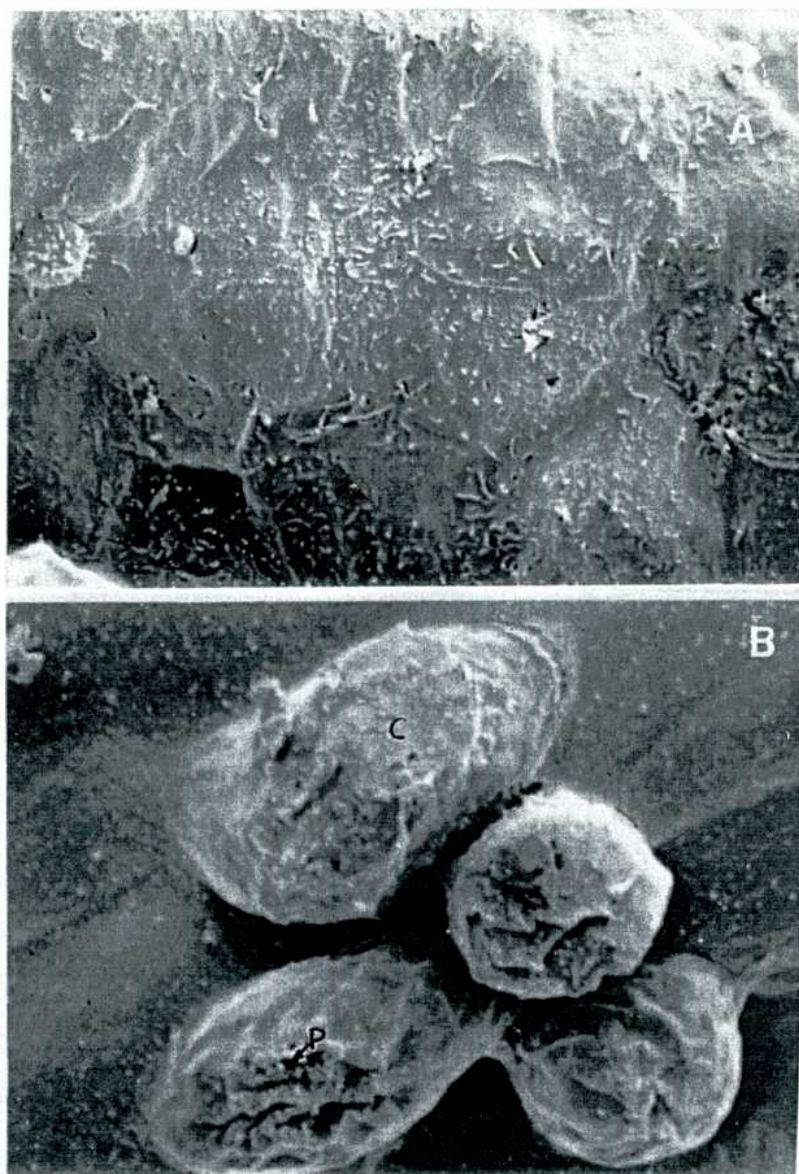


Figura 46

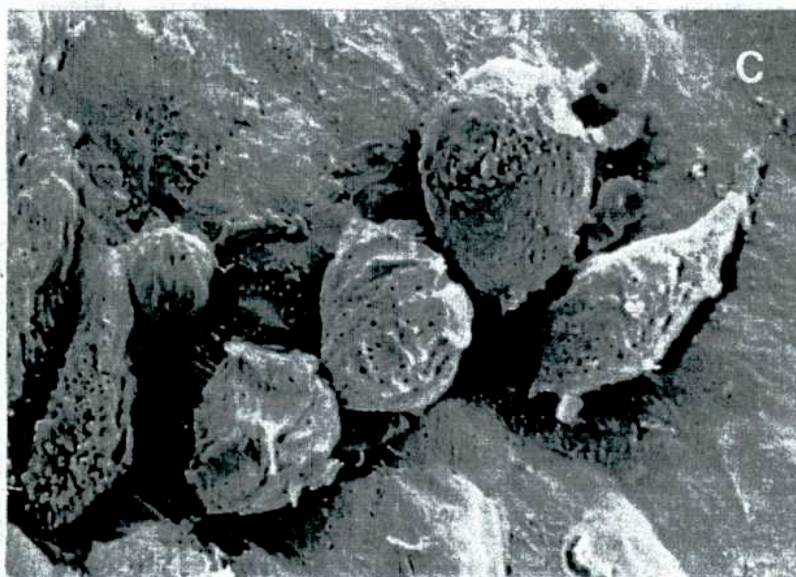


Figura 47

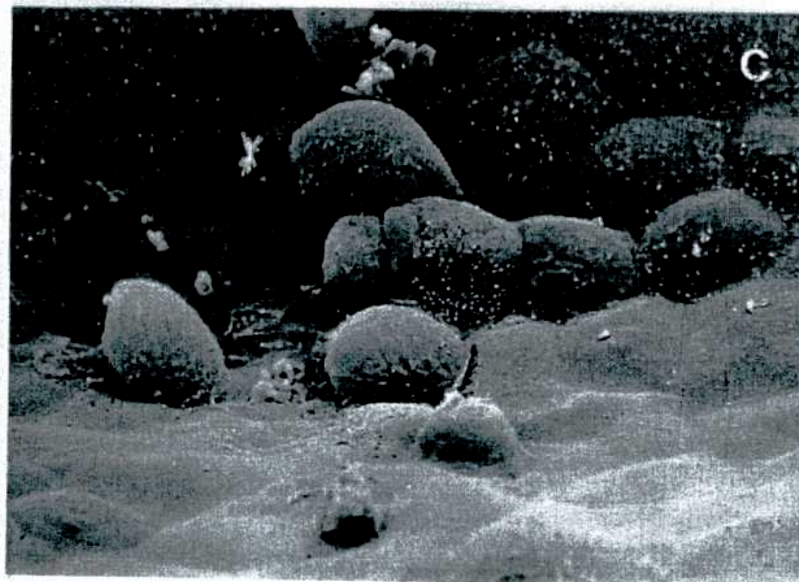
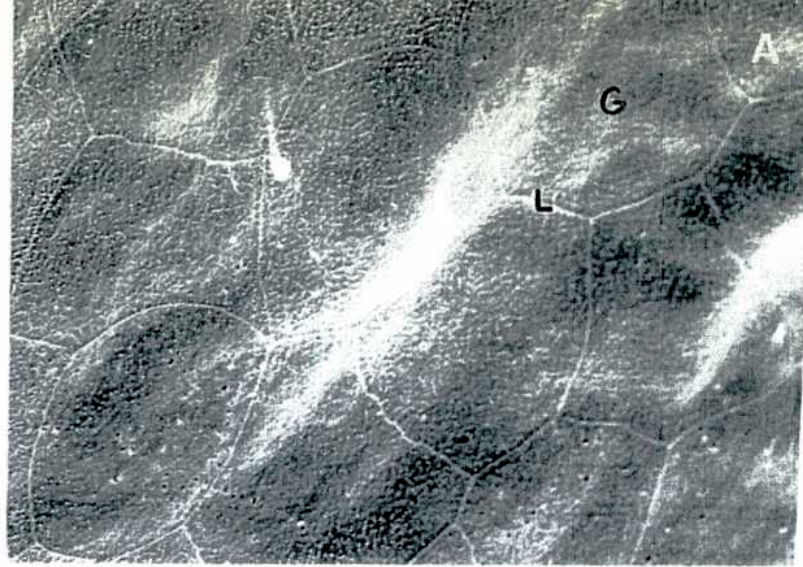


Figura 48

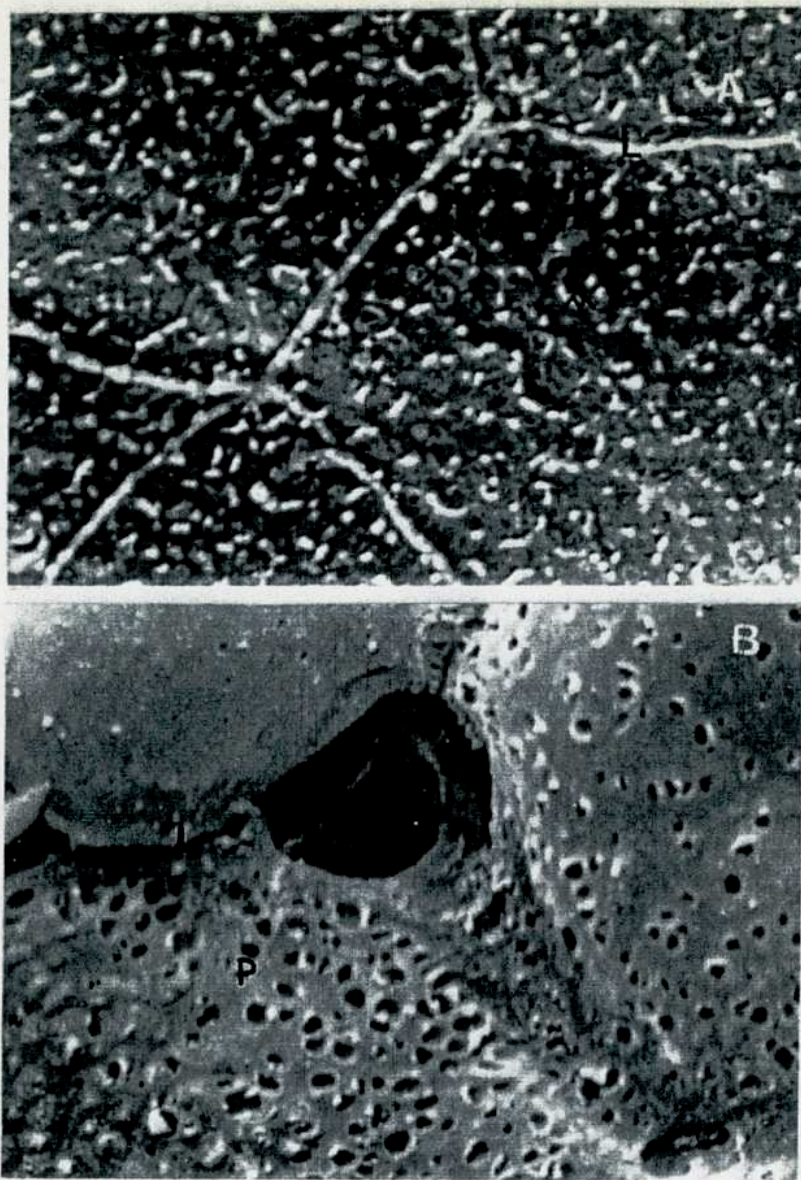


Figura 49

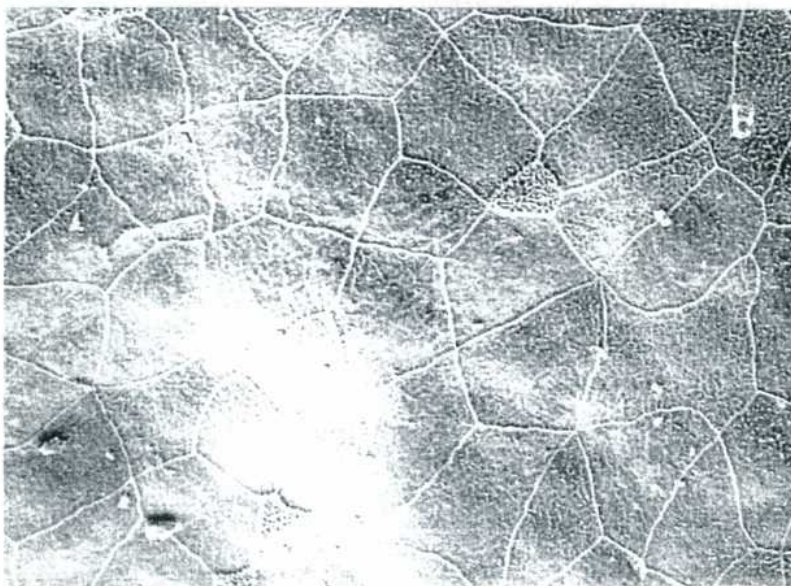
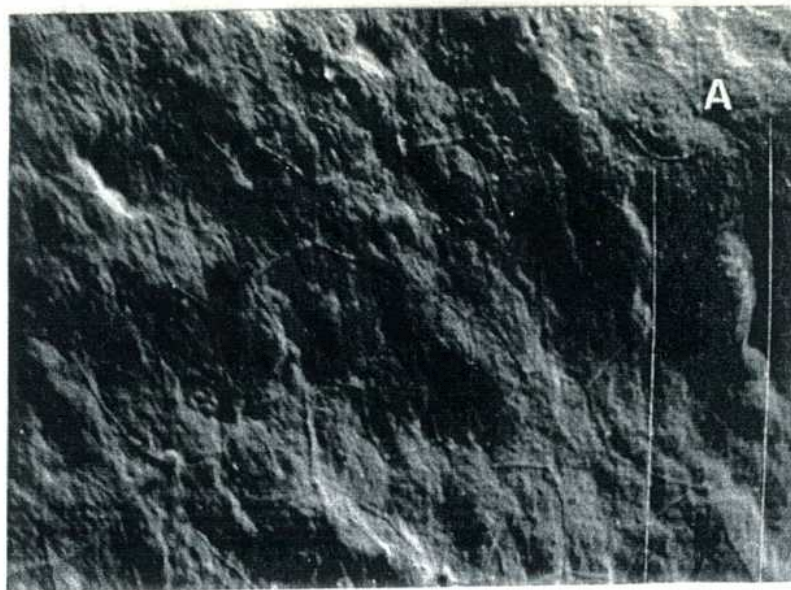


Figura 50

III-d. EVALUACION DE LOS CONTENIDOS CATIONICOS INTRALARVALES DE Bufo arenarum EXPUESTOS A SOLUCIONES DE DIFERENTE OSMOLARIDAD Y COMPOSICION QUIMICA EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE CADMIO: EXPERIMENTOS PRELIMINARES.

En las Tablas 27 a 30 se indican los resultados. Debido al bajo número de observaciones, la interpretación de los mismos es provisoria.

Tabla 27: Contenidos totales de cationes intralarvales (estadio 26) de Bufo arenarum.

Animales mantenidos en ADA 5 mOsm, con y sin 1 ppm de Cd por 6 y 96 hs. Datos expresados en $\mu\text{Eq/g PS}$. (medias $\pm$ ESM)

*: menor que el límite de detección.

Solución	Catión	6 hs		96 hs	
ADA 5 mOsm (n=2)	Na	3828.3	$\pm$ 276.1	1947.8	$\pm$ 373.8
	K	309.0	$\pm$ 26.9	346.2	$\pm$ 66.5
	Ca	742.5	$\pm$ 207.5	612.5	$\pm$ 273.9
	Mg	179.2	$\pm$ 4.2	172.2	$\pm$ 9.0
	Cd		*		*
	Na/K	12.6	$\pm$ 2.0	5.8	$\pm$ 1.2
ADA 5 mOsm + 1 ppm Cd (n= 3)	Na	1824.6	$\pm$ 235.7	1934.8	$\pm$ 569.6
	K	375.6	$\pm$ 47.4	248.3	$\pm$ 159.4
	Ca	1200.0	$\pm$ 197.5	1087.5	$\pm$ 127.5
	Mg	186.1	$\pm$ 23.8	291.7	$\pm$ 16.7
	Cd	3.0	$\pm$ 0.2	5.4	$\pm$ 0.1
	Na/K	5.3	$\pm$ 0.2	10.7	$\pm$ 4.5

Tabla 28: Contenidos totales de cationes intralarvales (estadio 26) de Bufo arenarum. Animales mantenidos en ADA 30 mOsm, con y sin 1 ppm de Cd por 6 y 96 hs. Datos expresados en $\mu\text{Eq/g PS}$. (medias $\pm$ ESM)

*: menor que el límite de detección.

Solución	Catión	6 hs		96 hs	
ADA 30 mOsm 6 hs n=1; 96 hs n=3	Na	1730.3		1658.0	$\pm$ 260.2
	K	289.7		224.8	$\pm$ 16.5
	Ca	3090.0		2856.7	$\pm$ 367.4
	Mg	133.3		122.22	$\pm$ 10.0
	Cd	*		*	
	Na/K	6.0		7.39	$\pm$ 0.8
ADA 30 mOsm + 1ppm Cd 6 hs n=2 96 hs n=3	Na	4221.7		1658.0	$\pm$ 260.2
	K	397.4		207.7	$\pm$ 49.2
	Ca	3590.0	$\pm$ 60.0	3007.5	$\pm$ 457.9
	Mg	137.5	$\pm$ 12.5	141.7	$\pm$ 14.4
	Cd	2.8	$\pm$ 0.2	2.8	$\pm$ 0.1
	Na/K	10.6	$\pm$ 0.9	9.7	$\pm$ 1.4

Tabla 29: Contenidos totales de cationes intralarvales (estadio 26) de Bufo arenarum. Animales mantenidos en ClNa 141 mOsm, con y sin 1 ppm de Cd por 6 y 96 hs. Datos expresados en $\mu\text{Eq/g PS}$. (medias $\pm$ ESM)

*: menor que el límite de detección.

Solución	Catión	6 hs				96 hs			
ClNa 141 mOsm 6 hs n=2 96 hs n=3	Na	2304.4	$\pm$	104.4	4398.6	$\pm$	493.3		
	K	316.9	$\pm$	37.0	506.8	$\pm$	24.7		
	Ca	417.5	$\pm$	47.5	100.0	$\pm$	8.7		
	Mg	183.3	$\pm$	0.0	269.4	$\pm$	2.8		
	Cd			*			*		
	Na/K	7.3	$\pm$	0.5	8.6	$\pm$	0.6		
ClNa 141 mOsm + 1 ppm Cd 6 hs n=2 96 hs n=2	Na	2171.7	$\pm$	110.9	3287.0	$\pm$	221.8		
	K	394.9	$\pm$	28.2	421.8	$\pm$	11.5		
	Ca	357.5	$\pm$	42.5	117.5	$\pm$	52.5		
	Mg	208.3	$\pm$	41.7	200.00	$\pm$	8.3		
	Cd	1.2	$\pm$	0.5	4.9	$\pm$	1.9		
	Na/K	5.6	$\pm$	0.7	7.8	$\pm$	0.7		

Tabla 30: Contenidos totales de cationes intralarvales (estadio 26) de Bufo arenarum. Animales mantenidos en Manitol 141 mOsm (MAN) y en agua destilada (ADE), con y sin 1 ppm de Cd por 6 y 96 hs. Datos expresados en $\mu\text{Eq/g PS}$. (medias $\pm$ ESM)

*: menor que el límite de detección.

Solución	Catión	6 hs	
ADE (n=6)	Na	1572.56	$\pm$ 217.60
	K	242.32	$\pm$ 48.91
	Ca	316.25	$\pm$ 89.33
	Mg	178.37	$\pm$ 29.34
	Cd	*	
	Na/K	7.86	$\pm$ 2.30
ADE + 1ppm Cd (n=5)	Na	1985.22	$\pm$ 178.02
	K	335.89	$\pm$ 17.35
	Ca	254.00	$\pm$ 43.39
	Mg	159.99	$\pm$ 8.08
	Cd	2.38	$\pm$ 0.24
	Na/K	5.89	$\pm$ 0.32
MAN 141 mOsm (n=2)	Na	1895.65	$\pm$ 4.35
	K	402.57	$\pm$ 79.48
	Ca	329.00	$\pm$ 49.00
	Mg	225.00	$\pm$ 25.00
	Cd	*	
	Na/K	4.89	$\pm$ 0.95
MAN 141 mOsm + 1ppm Cd (n=3)	Na	1152.57	$\pm$ 115.39
	K	341.87	$\pm$ 25.40
	Ca	180.00	$\pm$ 27.83
	Mg	161.11	$\pm$ 5.55
	Cd	1.95	$\pm$ 0.17
	Na/K	3.36	$\pm$ 0.15

El contenido de cationes para cada solución ensayada no se modificó por la presencia de Cd; en cambio el contenido del Cd aumenta, en función del tiempo, en larvas incubadas en ADA 5 mOsm y ClNa 141 mOsm, no así en ADA 30 mOsm. En ninguno de los controles se detectó Cd.

Si consideramos que todo el Cd de las soluciones está disponible, cada muestra de 12 larvas está en contacto con 0.86 uEq de Cd/48 ml de solución. De allí puede calcularse que los animales en solución de ADA incorporan, del total de Cd presente, aproximadamente un 60 % en las primeras 6 horas de exposición. Dicho porcentaje fue menor en larvas de ClNa 141 mOsm. La incubación en medio aiónico no modificó la incorporación de Cd.

Del análisis estadístico entre los tratamientos surge que a las 6 hs, la respuesta de los animales en ClNa 141 mOsm (Tabla 29) es diferente de los mantenidos en las soluciones de ADA (Tabla 27 y 28). Estas diferencias desaparecen a las 96 hs. El Na y el K muestran diferencias significativas solamente para ClNa a las 96 hs con valores mayores que los restantes tratamientos.

La relación Na/K es mayor en ADA 5 mOsm que en las demás soluciones a las 6 hs. A las 96 hs las diferencias se compensan. Debido a que en ClNa se incrementan ambos cationes, la relación se estabiliza.

El contenido intralarval de Ca presenta diferencias altamente significativas entre los dos tiempos muestreados: ADA 30 mOsm presenta cantidades mayores en el orden del 200% a las de ADA 5 mOsm y en esta solución son del orden del 100% superiores a las de medios libres de Ca (iónicos o aiónicos). El valor del contenido intralarval de Ca aparece relacionado con la concentración de Ca en el medio de incubación.

En general el contenido de Mg no se modifica de forma importante y mantiene valores muy conspicuos para todas las soluciones. Las únicas diferencias estadísticamente detectables se observan a las 96 hs y se deben a ADA 5 mOsm + Cd y ClNa, que incrementan los valores de este ión en función del tiempo en una proporción aproximada del 35%.

Los resultados obtenidos sugieren que, bajo nuestras condiciones experimentales:

1) Existen diferencias en el contenido cationico intralarval entre los diferentes medios de incubación:

a) el Ca muestra desde el comienzo valores muy superiores en ADA 30 mOsm en relación al control de ADA 5 mOsm, siendo éste, a su vez, unas 6 veces mayor que en los tratamientos que no tienen Ca en su composición química (ClNa, MAN y ADE). Se evidencia que existe pérdida de Ca en soluciones carentes de este catión independientemente de la osmolaridad externa.

b) el Na y el K se incrementan cuando el nivel del primero en la solución externa es elevado (ClNa 141 mOsm), permitiendo de esta forma mantener constante la relación Na/K.

2) La composición química de la solución externa no modifica, al menos a 96 hs de exposición, la incorporación de Cd, sin embargo al comienzo de la exposición la presencia de Na externo parece limitar la incorporación del metal.

CAPITULO IV

DISCUSION

PRIMERA PARTE: BALANCE HIDROMINERAL DE LARVAS DE Bufo arenarum

Se evaluó el balance hídrico de las larvas jóvenes de Bufo arenarum incubadas en medios de diferentes osmolaridades desde agua destilada (0 mOsm) hasta 271 mOsm y diferente composición química (manitol, ClNa y agua dulce artificial concentrada), tanto en condiciones agudas como de aclimatación y exposición crónica. Se estudiaron las alteraciones de contenido de agua como parámetros indicadores de la regulación del balance hídrico.

IV-a. Evaluación de la supervivencia de larvas jóvenes en condiciones de "stress" osmótico a dos densidades diferentes.

Con la finalidad de descartar el efecto debido a las condiciones experimentales del diseño utilizado en los ensayos de regulación hídrica, se comprobó previamente que la mortalidad para las larvas jóvenes (evaluada como CL50) no difirió en medio electrolítico y no electrolítico, y en condiciones de densidad de organismos adecuada, según las recomendaciones del APHA (1992) (1 larva/20 ml de solución) como elevada (1 larva/4 ml de solución). Los resultados correspondientes a CL50 para soluciones de manitol y ClNa (II-a) demuestran que las larvas jóvenes de Bufo arenarum tienen una respuesta semejante en lo que se refiere a supervivencia en medio osmóticamente elevado, independientemente de la presencia de electrolitos y de la superposición de "stress" causado por elevada densidad de organismos (Figuras 4 y 7). Los valores de osmolaridad letal media para manitol (solución no electrolítica) y para ClNa (solución electrolítica) superponen sus límites fiduciales para todos los tiempos de ensayo (Tablas 1 y 2 y Figura 8).

Estos resultados permitieron diseñar los protocolos de regulación de balance hídrico adoptando la densidad elevada y establecer a 271 mOsm como máxima osmolaridad de ensayo, puesto que este valor se encuentra dentro de los límites de confianza de la CL50 48 hs en manitol, ClNa y de las dos densidades mencionadas.

IV-b Evaluación cuantitativa del balance hidromineral.

Los organismos animales se consideran como sistemas en los que muchas variables diferentes se encuentran interrelacionadas; por ello, el enfoque correcto para cuantificar las diferencias entre muestras debe ser multivariado.

El diseño experimental seguido en los ensayos de regulación hídrica (II-b, c, d, y e) permitió cuantificar la respuesta integral de los mecanismos adaptativos a condiciones de "stress" ambiental causado por alteraciones de la presión osmótica del medio de incubación. Ello fue posible a través de la utilización de análisis multivariado.

En II-b se indicaron los resultados de la exposición aguda de las larvas a soluciones de manitol sobre el balance hídrico. Estos muestran que los animales sobreviven varios días cuando se los transfiere sin aclimatación previa a soluciones no iónicas, desde agua destilada hasta 204 mOsm MAN. Es interesante mencionar que el medio natural de estos animales son cuerpos de agua cuyas osmolaridades son cercanas a la de nuestras soluciones de menor osmolaridad (Ringuelet *et al.*, 1967).

También comparamos el efecto particular de una solución isoosmótica no iónica con respecto a ADA 5 mOsm (5 mOsm MAN). La tolerancia de las larvas al "stress" osmótico parece estar ligada no solo a la presión osmótica sino también a las características químicas del baño externo, puesto que los parámetros evaluados divergen con el tiempo según se trate de un medio no iónico (5 mOsm MAN) o iónico (ADA 5 mOsm) (Figuras 9 a 12). Esto puede ser interpretado como un efecto particular

del manitol, ya que se ha demostrado que la aclimatación en ese medio disminuye la permeabilidad osmótica de la piel (Katz, 1987). Además, la piel de larvas de anuros tiene una permeabilidad menor que la de los adultos (Burggren y Just, 1992).

Bajo nuestras condiciones experimentales, las primeras 24 hs de ensayo constituyen un período crítico en la adaptación de los animales al nuevo medio: durante el mismo ocurren los cambios más importantes en todas las condiciones excepto en las larvas control ADA 5 mOsm; las diferencias en relación a esta solución son proporcionales al incremento de la osmolaridad del medio. En algunos casos se hallan diferentes grados de respuestas compensatorias, particularmente en 70 mOsm MAN. A esta osmolaridad las larvas muestran valores intermedios de sus parámetros fisiológicos entre aquéllos de control y las restantes soluciones experimentales. La respuesta compensatoria de estos animales es gradual y se completa al séptimo día de incubación. Este tipo de respuesta no se detecta en ninguna otra osmolaridad ensayada donde, además, la supervivencia es menor.

Las larvas sometidas a cambios en la osmolaridad externa no electrolítica se encuentran imposibilitadas de efectuar intercambio iónico con el medio y la pérdida de agua es continua. Como efecto inmediato es razonable suponer la existencia de cierto ajuste de la presión osmótica plasmática por incremento de la concentración relativa de ClNa plasmático, que aumentará a mayor deshidratación; a su vez la deshidratación se incrementará con el aumento de la osmolaridad del medio y en consecuencia, en casos extremos se producirá la muerte por hipernatremia (Balinsky, 1981; Schrock *et al*; 1980).

Este mecanismo podría explicar los importantes descensos iniciales de PH y CA en relación al control 5 mOsm MAN y la baja supervivencia en las soluciones de osmolaridad más elevada.

Al final del período experimental las larvas expuestas a 70 mOsm logran equipararse con controles tanto en cada uno de los parámetros evaluados (Figuras 9 a 12) como considerando a éstos en forma integrada (Figuras 13 y 14).

Para explicar respuestas adaptativas de este tipo se ha mostrado, que algunos anfibios son capaces de acumular osmolitos orgánicos, tales como urea o aminoácidos libres (Gasser y Miller, 1986). Este

mecanismo fue comprobado en juveniles de Xenopus laevis pero descartado en larvas de la misma especie (Srchrök y Hanke, 1979; Srhock et al. 1980). En relación con este tipo de respuesta, existen evidencias de que la presión osmótica del medio puede afectar la tasa de producción de proteínas de las células sanguíneas: en larvas de Rana catesbeiana el incremento de osmolaridad del medio de incubación de 100 a 150 mOsm aumenta el porcentaje de incorporación de aminoácidos a las células sanguíneas en un 50 % en el curso de 4 hs (Burggren y Just, 1992).

Otra interpretación sería que dentro del intervalo de osmolaridades de nuestros experimentos se desencadenan mecanismos homeostáticos diferentes que logran mantener el equilibrio del medio interno; es decir que nos encontraríamos dentro del intervalo de tolerancia para esta especie.

No hay evidencias que las larvas jóvenes de Bufo arenarum sean capaces de sintetizar urea; por ello la capacidad de respuesta adaptativa a las soluciones no electrolíticas concentradas debe considerarse en el marco de una respuesta de corto tiempo debido principalmente a la deshidratación. Es interesante mencionar que la concentración externa de manitol elevada produce una disminución del volumen celular, de la conductancia apical y del transporte de sodio en piel de sapo (Gazitua et al., 1988). Esto nos llevaría a pensar que el parámetro de mayor incidencia en la capacidad discriminante sería el CA, lo cual es erróneo: según nuestros resultados dicho parámetro es el PS. El manitol ha sido frecuentemente utilizado como marcador del espacio extracelular con resultados comparables a los obtenidos con inulina y sacarosa (Fidelman y Watling, 1987). Teniendo en cuenta su penetración paracelular y también su elevado peso molecular (PM= 182.17), podría suponerse que el incremento del PS sería causado por su ingreso al organismo. Sin embargo, como veremos, la incubación en soluciones de osmolaridad electrolítica (ClNa) idénticas a las de manitol, arroja resultados semejantes al poliol.

En II-c se indican los resultados correspondientes a la exposición aguda de larvas jóvenes a elevada osmolaridad electrolítica. El comportamiento de las variables evaluadas difiere notablemente del observado para manitol en las mismas condiciones. Si se comparan los comportamientos de PH y CA con los observados para iguales osmolaridades no electrolíticas se ve que los de manitol son siempre

distantes del de control y que los de ClNa se hallan cercanos a aquel. Ello sugiere el desencadenamiento de mecanismos diferentes de regulación de equilibrio hídrico de acuerdo con la naturaleza del medio externo. Sin embargo, cuando la osmolaridad del medio supera los 200 mOsm, la mortalidad aumenta a pesar de que el comportamiento de las variables fisiológicas se mantiene cercano al de control. Esta respuesta se diferencia de la observada en manitol, ya que en éste las variables evaluadas permanecen distanciadas del control al incrementarse la osmolaridad. El PS se comporta de manera semejante que en manitol, es decir que se incrementa con la osmolaridad (si bien en menor medida que en el primer caso), pero desciende en función del tiempo hasta 141 mOsm. Por encima de esta osmolaridad, el PS también se incrementa con el tiempo (Figura 16). Este comportamiento bifásico podría explicar la baja correlación que se observa para el modelo de regresión múltiple (Tabla 8).

Como ya fuera mencionado, en el caso de las larvas expuestas a ClNa, el principal parámetro en la función discriminante tanto para cada solución en función del tiempo como para cada tiempo entre soluciones es el PS y en algún caso la H (Tablas 9 y 10). El comportamiento integrado de las variables indica una tendencia a estabilizarse en el tiempo, la cual es más notable a osmolaridades elevadas, en las que la mortalidad se incrementa. Es interesante el hecho que a medida que el comportamiento integrado de las variables en soluciones de ClNa concentradas se equipara a las de las soluciones control, la sobrevivencia es imposible. En 70 mOsm, donde el comportamiento integrado de las variables fisiológicas se distancia ligeramente del control, las larvas logran sobrevivir hasta el final del ensayo (Figuras 19 y 20). Esto podría sugerir que el costo metabólico de la regulación hidromineral es demasiado elevado (Katz *et al.*, 1984). En general la osmolaridad del medio natural de la mayor parte de las larvas de anfibios se encuentra entre 10 y 15 mOsm, intervalo en que las larvas osmorregulan. Pero a presiones osmóticas externas superiores a 200 mOsm se comportan como osmoconformadoras (Burggren y Just, 1992), es decir que cuando el medio interno de las larvas se hace hiposmótico en relación al externo, las larvas no son capaces de osmorregular. Esto concuerda con nuestros resultados.

Los anfibios tienen una gran variedad de estructuras con función osmorreguladora (piel, riñón, vejiga, branquias y tracto digestivo) pero la contribución relativa de cada órgano cambia drásticamente durante el desarrollo. La principal actividad osmorreguladora la realiza la piel con dos funciones: movimiento de agua e iones. El flujo osmótico se realiza principalmente a través de poros de la epidermis. El intercambio de iones puede ser pasivo, debido a gradiente electroquímico o activo, (Na,K)-ATPasa dependiente. En larvas jóvenes de anuros los niveles de esta enzima son muy bajos (Kawada *et al*, 1969) de modo que puede considerarse que el único camino de transporte de Na es el pasivo (Warburg y Rosenberg, 1990). Esto sugiere que la muerte en soluciones iónicas con osmolaridades superiores a 200 mOsm probablemente se produzca por el ingreso pasivo de Na a las larvas, las que se harían isoosmóticas con el medio, lo que estaría acompañado por la pérdida continua de agua; en consecuencia la muerte se produciría por hipernatremia.

Los cambios en el CA pueden producirse por cambios en el PH o PS en forma independiente. Nuestros resultados sugieren que la regulación tanto en soluciones iónicas como no iónicas se produce por cambios simultáneos en los dos parámetros de referencia. En el caso particular de las larvas incubadas en ADE, el CA se mantiene estable en el tiempo a causa de una reducción conjunta del PH y PS (Figuras 9 a 12). A través del análisis discriminante múltiple se llega a la conclusión de que el PS es el principal parámetro en la capacidad discriminante tanto analizando las respuestas de cada solución ensayada en función del tiempo, como analizando las diferencias entre soluciones para cada tiempo muestreado. El aumento absoluto de PS en soluciones de osmolaridad elevada, independientemente de la naturaleza química del medio, sugiere la existencia de mecanismos de síntesis de compuestos orgánicos osmóticamente activos, tales como aminoácidos libres. Sin embargo en el caso de incubación en medio de elevada osmolaridad no electrolítica (manitol), no puede descartarse que el ingreso de manitol dentro del organismo por vía paracelular contribuya a ese aumento de PS.

El rol de PS resulta enmascarado cuando se aplica el análisis para cada uno de los parámetros por separado. Como se deduce del ADM (Figuras 13, 14, 19 y 20), los animales control tienden a

estabilizar su balance acuoso, en tanto que los de las soluciones experimentales responden en la dirección de restablecer las condiciones iniciales. Esta diferencia en la respuesta integrada entre controles y experimentales se hace más evidente a medida que la osmolaridad del medio se incrementa. Además un comportamiento cercano entre las larvas control y las experimentales siempre se halla asociado a porcentajes de sobrevivencia semejantes.

En II-d se indican los resultados obtenidos en larvas jóvenes cuando fueron incubadas sucesivamente en soluciones iónicas y no iónicas de osmolaridad creciente. A través de este ensayo de aclimatación paulatina se intentó demostrar la existencia de mecanismos adaptativos de las larvas.

La tendencia del PH es a bajar en función del tiempo en todas las soluciones, pero la pendiente es mayor en ClNa y MAN que en controles (Figura 21). El PS disminuye en función del tiempo en control y tratados hasta las 72 hs, pero la transferencia a 247 mOsm incrementa su valor en manitol en tanto que en ClNa continua descendiendo (Figura 22). Para este tratamiento en particular indica un efecto de la aclimatación sobre dicho parámetro.

Del análisis de las Figuras 21 y 22 y de la Tabla 11 se desprende con claridad que los grupos tratados pierden agua en forma continua y similar, independientemente de la naturaleza química del medio de incubación pero la respuesta se diferencia entre ambos tratamientos en relación al PS; esto sugiere un efecto puramente osmótico. Sin duda el CA está gobernado por las variaciones de PH y PS: los grupos tratados presentan una mayor disminución de ambos parámetros a partir de la transferencia a 204 mOsm siendo mayor el descenso en MAN a causa del incremento en el PS (Figuras 23 y 24). La sobrevivencia en soluciones de osmolaridad elevada no se incrementa con aclimatación previa; por el contrario, cuando las larvas se transfieren de 204 a 247 mOsm aumenta notablemente la mortalidad hasta morir en menos de 24 hs cuando se transfieren a 271 mOsm. Esto sugiere que las larvas tienen un intervalo estrecho de osmoconformidad (tal vez 200-250 mOsm).

Al igual que en el caso de exposición aguda, el principal parámetro de incidencia en la función discriminante es nuevamente el PS, tanto dentro de cada solución en función del tiempo, como entre soluciones.

También queda claro que la naturaleza química del medio de incubación no resulta indiferente a las larvas, ya que el comportamiento difiere entre MAN, ClNa y ADA-5 mOsm (Figuras 25 y 26). Al comparar MAN y ClNa se hace evidente que a partir de 204 mOsm se dan las principales diferencias. En tanto que en ClNa el comportamiento integrado de las variables se distancia entre las distintas osmolaridades y tratamientos, en manitol ocurre a partir de 247 mOsm. Esto probablemente indica que 204 mOsm es la concentración a partir de la cual el efecto de la ganancia de Na prima sobre el efecto puramente osmótico que continúa en manitol (donde las larvas se encuentran imposibilitadas de incorporar Na).

En II-e se señalan los resultados obtenidos cuando se exponen larvas jóvenes a soluciones de diferente concentración iónica (hasta 30 mOsm) en forma prolongada. También se ensayó la exposición prolongada a ADE. Se comprobó que las larvas toleran sin alteraciones en su equilibrio hídrico la exposición a agua destilada (0 mOsm). Esto se deduce de los resultados del ADM, donde se observa que el comportamiento integrado de las variables bajo estudio en condiciones de un medio carente de solutos (ADE) no se diferencia de control (ADA-5 mOsm) (Figuras 31 y 32). La capacidad de vivir en ADE ya fue reportada para embriones de la misma especie por Minotti *et al.* (1983) quienes informaron como efecto particular de esa incubación, un retraso en el desarrollo embrionario y mortalidad elevada. Castañé *et al.* (1987) obtuvieron para el último estadio de embriones desarrollados en ADE, niveles de aldosterona significativamente mayores que para animales del mismo estadio desarrollados en solución de Holtfreter diluída (11.5 mOsm), resultados que, de alguna manera, sugieren una mayor actividad de intercambio iónico en embriones incubados en ADE, probablemente como resultado del ingreso de agua al organismo.

Nosotros hemos comprobado que durante el desarrollo larval, la incubación en ADE no muestra variaciones cuantificables de su balance hídrico en relación al control ni a la solución concentrada de ADA 10 mOsm durante 27 días de exposición. Nuestros resultados demuestran que las larvas no se diferencian del control durante todo el tiempo de ensayo desde 0 a 10 mOsm; en 20 y 30 mOsm logran equiparar al control luego de 15 días de exposición (Figura 32). Por otra parte, en tanto que

hasta 10 mOsm la tendencia en el tiempo es a la estabilidad, ello no ocurre por encima de 20 mOsm, pero es clara la tendencia a restablecer las condiciones iniciales (Figura 31). Esto indica el comportamiento de balance hídrico en osmolaridades equiparables a las halladas en medios naturales de la especie.

En todos los casos es muy claro el efecto sobre el PH y PS de los primeros 5 días de incubación (Figuras 27 y 28). Hemos interpretado este resultado como un efecto de la interrupción de la alimentación de los animales y a la adaptación a las condiciones experimentales. Durante el resto del tiempo de ensayo no existen diferencias de valores entre las soluciones hasta 10 mOsm, en tanto que en 20 y 30 mOsm presentan valores superiores de PS cuando se analiza la respuesta en forma integrada. Ello concuerda con el alejamiento inicial de estas soluciones con respecto a las tres primeras (ADE, ADA 5mOsm y ADA 10 mOsm); también coincide con que el principal parámetro en la función discriminante sea, otra vez, el PS. Este resultado en un medio de osmolaridades equiparables a la de ambientes naturales, así como en condiciones experimentales de "stress" osmótico agudo y con aclimatación, demuestra que el PS es un parámetro de incidencia fundamental en la actividad osmorreguladora de estos animales y que probablemente deba relacionarse con aumentos en las tasas de biosíntesis de compuestos nitrogenados.

SEGUNDA PARTE: IMPACTO DEL CADMIO SOBRE LA SUPERVIVENCIA Y EL BALANCE HIDRICO DE LARVAS DE Bufo arenarum

Considerando que las larvas utilizadas en nuestros ensayos fueron siempre obtenidas en laboratorio y criadas bajo condiciones controladas, libres de contaminación, la respuesta de las mismas al Cd no puede ser atribuida a exposición previa al metal ni a ningún otro xenobiótico.

De los ensayos de toxicidad aguda (III-a) se desprende que las larvas jóvenes (estadio 26) son más sensibles al Cd que las prometamórficas (estadios 28III/29). Valores de CL50 comparables a los nuestros se hallan para larvas de Microhyla ornata de 1 a 4 semanas de vida obtenidas en campo y expuestas a Cd a una temperatura de 25.5-26°C (Rao y Madhyasta, 1987), pero lamentablemente sus gráficos no permiten discernir la existencia de diferencias relacionadas con la edad larval.

La temperatura de ensayo resulta ser de vital importancia en la evaluación de toxicidad, puesto que se ha confirmado un efecto protector de la temperatura sobre la toxicidad por Cd. Este efecto es incipiente en las larvas jóvenes y muy evidente en las prometamórficas (Figura 37).

Por debajo de 2 ppm de Cd la mortalidad de las larvas se halla siempre muy cercana a la de controles, para las dos edades larvales y a ambas temperaturas de ensayo (Figuras 35 y 36), por lo cual se estableció la concentración de 1 ppm de Cd como subletal en los ensayos subsiguientes.

Un efecto protector de la temperatura análogo al aquí descrito fue informado por Pérez-Coll *et*

al. (1986) para embriones de la misma especie en estadio 19 (latido cardíaco) y 25 (opérculo completo) expuestos a concentraciones de Cd de 0.07-1.68 ppm. Sus resultados muestran que la mortalidad es independiente de la temperatura (20 y 30 °C) pero que la incidencia de las malformaciones se reduce considerablemente a la temperatura mayor.

Los mecanismos por los cuales los elementos traza entran y son regulados dentro de los organismos se encuentran insuficientemente entendidos. La toxicidad del Cd puede estar relacionada con la disponibilidad de los iones libres o de su concentración total. La cantidad de ión libre decrece a causa de su capacidad de complejarse con otras especies iónicas tales como el Cl^- o HCO_3^- (Sprague, 1987). Esta capacidad puede ser dependiente de la temperatura, pero bajo nuestras condiciones experimentales, la composición de la solución externa permanece constante, variando sólo la temperatura de exposición y la edad de los animales. Así es evidente que la interpretación de nuestros resultados no puede ser reducida a consideraciones fisicoquímicas, pues el efecto del Cd debería ser básicamente el mismo en ambas edades larvales; sin embargo un incremento de 5°C en el baño externo provoca un importante descenso en los signos de toxicidad aguda de Cd en larvas prometamórficas. Por ello consideramos que un incremento en la temperatura ambiental, que afecta la tasa metabólica estándar de los animales, puede afectar los eventos bioquímicos asociados con la cinética de los procesos de detoxificación (e.g., inducción de síntesis de metalotioninas) tanto como los procesos de homeostasis relacionados con la metabolización del metal (Hochachka y Somero, 1984; Simkiss y Watkins, 1988).

Existen evidencias recientes que indican que la inducción de la síntesis de las metalotioninas y su acumulación intracelular son eventos tempranos que pueden ocurrir dentro del período de tiempo que abarcan nuestros ensayos (Gagné et al. 1990).

La respuesta mucho menos diferenciada de las larvas jóvenes y aun de los últimos estadios embrionarios, puede ser atribuida al hecho de que los caminos metabólicos protectivos endógenos no se hallan completamente desarrollados o aún no son funcionales.

El Cd es un elemento que interfiere en los mecanismos de intercambio iónico principalmente a través de la inhibición de las ATPasas epiteliales (Hayashi *et al.* 1977; Hillyard *et al.* 1979; Takada y Hayashi 1980); porbablemente este efecto pueda vincularse a las alteraciones epidérmicas observadas en concentraciones cercanas a las CL50.

En III-b se indican los resultados obtenidos cuando la larvas jóvenes de Bufo arenarum se incubaron en medios de diferente composición química y osmolaridades, que probadamente no modifican el equilibrio hídrico, analizado según nuestra metodología de evaluación de regulación hídrica (Capítulo II), en presencia de una concentración subletal de Cd.

Bajo esas condiciones esperábamos cierta modificación del balance hídrico; sin embargo en las soluciones iónicas, (ADA 5 mOsm, ADA 30 mOsm y ClNa 141 mOsm) el metal no modificó significativamente ninguno de los parámetros evaluadores utilizados, tanto evaluando cada uno en forma univariada (Figuras 38 a 41) como tomándolos en forma integrada, a través de un análisis multivariado (Figuras 42 y 43). En las soluciones no iónicas (ADE y MAN 141 mOsm) el efecto de 1 ppm de Cd fue drástico, ya que produjo un 100% de mortalidad en el curso de las primeras 12 horas de exposición. Esto indica que, dentro de los límites del diseño experimental seguido por nosotros, la presencia de iones amortigua el efecto nocivo del Cd independientemente de la presión osmótica y de la composición química de la solución.

La muerte en soluciones no iónicas con Cd está acompañada de importantes alteraciones epidérmicas dentro de las primeras horas de exposición (ver III-c). Estos resultados podrían ser interpretados

como una consecuencia secundaria del conocido efecto inhibitorio del Cd sobre las ATPasas branquiales. (Hayashi et al., 1977; Hillyard et al., 1979; Jakobson y Turner, 1980; Takada y Hayashi, 1980; Verbost et al., 1987).

Las larvas jóvenes de Bufo arenarum expuestas a 1 ppm de Cd en solución no iónica presentan importantes modificaciones en la organización de la epidermis, siendo la zona más afectada la abdominal; en ella se aprecia claramente la desestructuración epidérmica. Este efecto se caracteriza por ser muy rápido, ya que en el curso de unas pocas horas todas las larvas expuestas, que aún se encuentran con vida, presentan lesiones en la piel. Sin duda dichas alteraciones se hallan relacionadas con la ausencia de iones en solución, puesto que la misma concentración de Cd en solución iónica de osmolaridades semejantes a aquéllas, no provoca los mismos efectos ni aun luego de 48 hs de exposición.

Se requiere un mínimo de 24 hs de exposición a 4 ppm de Cd en solución salina de ADA-5 mOsm para observar un efecto semejante; esta concentración es cercana a la CL50 24 hs. Cabe recordar que la descamación del epitelio es uno de los síntomas de letalidad en condiciones de toxicidad aguda. La alteración de la estructura y función de los epitelios en animales acuáticos intoxicados con Cd ha sido reportada en muchas ocasiones (Randi et al., 1993; Hemetraad y Hervwing, 1988; Block, 1991; Block et al. 1991; Dawson et al., 1988; Minotti et al. 1983; Perez-Coll et al., 1985, 1986, Herkòvits y Pisano, 1980; Verbost et al. 1987, 1988, entre otros), pero no se ha encontrado en la bibliografía información acerca de efectos similares a los encontrados por nosotros en medio aiónico ni para peces ni para anfibios.

Generalmente se atribuye el efecto sobre los epitelios a la afinidad del Cd por proteínas tales como las enzimas involucradas en los procesos de transporte (Jakobson y Turner, 1980) y su competencia

por el Ca, que como es sabido, juega un papel muy importante en la adhesividad celular.

Se han descrito alteraciones ectodérmicas en embriones de Bufo arenarum expuestos a concentraciones entre 6.5×10^{-5} y 1.6×10^{-3} ppm de Cd en solución de Holtfreter, tales como pliegues, incremento y distribución atípica de células ciliadas y malformaciones (Pérez Coll et al. 1986); también se observó abovedamiento de la superficie apical de las células glandulares y células en proceso de desprendimiento (Perez Coll et al., 1985), fenómenos muy semejantes a los observados por nosotros. Es interesante el hecho que los mismos autores (Pérez-Coll et al., 1988) observan pérdida de contacto intercelular y aparición de células esféricas en embriones tratados con Pb, lo cual podría indicar una falta de especificidad del fenómeno.

En embriones de la misma especie incubados en agua destilada, se ha observado abovedamiento de las células ectodérmicas de la región branquial y numerosas células en proceso de desprendimiento. Estos embriones completan su desarrollo, pero lo hacen mucho más lentamente que los incubados en solución de Holtfreter, comenzando a demorarse en el desarrollo especialmente luego de la aparición de las branquias, lo cual sugiere que, a partir de ese momento, se produce un cambio de permeabilidad de las membranas apicales (Minotti et al. 1983).

Como fuera informado en el Capítulo II, las larvas incubadas en agua destilada no presentan disturbios a nivel de epidermis al menos durante 30 días de exposición, sin embargo se observan efectos similares a los descritos para embriones cuando se exponen a baja concentración de Cd.

En branquias de peces el flujo de Ca es pasivo y paracelular en tanto que el influjo es considerado un proceso activo (Ca+Mg)-ATPasa dependiente y transcelular (Verboost et al., 1987). Por ello nos parece razonable la hipótesis de que el Cd ha de inducir hipocalcemia como una consecuencia directa del desbalance del transporte branquial. La presencia de Cd en el medio de incubación inhibe

específicamente la entrada de Ca en las branquias, sin afectar el eflujo. En vista de la elevada afinidad del Cd por la bomba Ca-ATPasa "in vitro", es lógico considerar que el metal, aún pudiendo estar ligado en gran parte a los receptores intracelulares de Ca, puede tener un efecto inhibitorio sobre el transporte y eventualmente, sobre los niveles citosólicos de Ca.

Indudablemente, en nuestro caso, la interpretación del fenómeno observado a nivel de epidermis debe estar vinculado a la competencia del Cd por elementos que actúan sobre la adhesividad celular, tales como el Ca y la alteración de los mecanismos de transporte a nivel de membranas probablemente como consecuencia de la afinidad del Cd por proteínas de membrana.

En III-d se indican los resultados preliminares de niveles catiónicos intralarvales. En el caso particular de las larvas de B. arenarum hemos hallado hipocalcemia en soluciones de baja y elevada osmolaridad con Cd, tanto iónicas como no iónicas, ya que el contenido intralarval de Ca es menor en estas soluciones respecto de los controles de ADA-5 mOsm (Tablas 27 a 30); pero no se puede responsabilizar, por los efectos tóxicos descritos, al bajo contenido de Ca, ya que no existen diferencias significativas, para los contenidos intralarvales de Ca, entre las larvas en estas soluciones en presencia y ausencia de Cd. Tampoco existen diferencias significativas en la ganancia de Cd en medio iónico, ya que la composición química de la solución de incubación no modifica el grado de incorporación del Cd.

Resumiendo, la ganancia de Cd en medios iónicos o no iónicos es semejante y la pérdida de Ca también. Son un hecho la elevada mortalidad en medio no iónico conteniendo baja concentración de Cd y la importante desestructuración de la epidermis que acompaña a este fenómeno. Pareciera que estos efectos no pueden atribuirse a la hipocalcemia puesto que niveles semejantes de Ca se encuentran en las mismas soluciones en ausencia de Cd, ni tampoco pueden atribuirse a una posible

mayor ganancia en condiciones no iónicas puesto que la ganancia de Cd no difiere de la observada en medio iónico de diferentes osmolaridades. Una interpretación de este fenómeno sería que en medio no iónico el 100% de Cd está biodisponible, en tanto que en medios iónicos debe ser mucho menor. Este Cd actuaría a nivel de las uniones celulares desintegrandolas, probablemente compitiendo con el Ca²⁺ inhibiendo las ATPasas epiteliales.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. En términos de osmolaridad letal media (OL50), las larvas jóvenes de Bufo arenarum responden de manera semejante, independientemente de la presencia de electrolitos en el medio de incubación y de la densidad de organismos. Se establece una OL50 48 hs (valor medio $\pm$ ESM en mOsm) de 279.0 ± 9.6 y OL50 144 hs de 220.5 ± 2.0 .
2. Cuando las larvas se exponen a soluciones superiores a 250 mOsm, no son capaces de osmorregular y mueren en menos de 48 hs. Este hecho es independiente de la composición química del baño externo y/o de la exposición paulatina a osmolaridad creciente.
3. Las primeras 24 hs de exposición de los animales a soluciones de elevada osmolaridad, son críticas para su capacidad de adaptación al aumento de la presión osmótica externa.
4. El aumento de la presión osmótica externa provoca en las larvas deshidratación gradual tanto en medio electrolítico como no electrolítico.
5. La regulación de los parámetros fisiológicos evaluados en medios osmóticamente elevados se efectúa por ajustes simultáneos en las dos variables medidas (PH y PS). En todos los casos el PS resultó ser el principal parámetro de la función discriminante. En condiciones de exposición aguda el comportamiento del PS no ofrece diferencias entre soluciones iónicas y aiónicas; en cambio al aumentar la presión osmótica del medio en forma paulatina, el comportamiento del PS se modifica. El incremento del PS se produce por encima de 200 mOsm en medio no electrolítico, pero ello no ocurre en presencia de iones. Se comprueba que la naturaleza química del medio prevalece sobre la presión osmótica en la respuesta adaptativa de los animales.
6. Las larvas jóvenes de Bufo arenarum son capaces de sobrevivir durante no menos de un mes en agua destilada sin indicios de desajustes en su balance hídrico. La misma capacidad adaptativa se observa en medio salino hasta 30 mOsm.

7. Se establecen los siguientes intervalos de CL50 de Cd en solución ADA 5 mOsm (24 a 96 hs): a) larvas jóvenes, entre 3.5 y 2 ppm, a 20 y 25°C; b) larvas prometamórficas, entre 5 y 3 ppm a 20°C y entre 10 y 6 ppm a 25°C.

Se considera a la concentración de 1 ppm de Cd en ADA 5 mOsm como subletal para larvas jóvenes de Bufo arenarum, a 20°C durante el lapso de tiempo de los bioensayos.

8. Se encontró un efecto protector de la temperatura sobre la toxicidad aguda del Cd en larvas de Bufo arenarum, que es incipiente en los animales jóvenes y absolutamente manifiesto en las prometamórficas. Este efecto probablemente deba vincularse al escaso desarrollo (o ausencia) de mecanismos protectivos endógenos en el primer estadio larval.

9. Se halló un efecto protector de los iones sobre la toxicidad del Cd, en larvas jóvenes de Bufo arenarum expuestas a bajas concentraciones del metal.

En concentración subletal, el Cd no altera la regulación hídrica de las larvas jóvenes cuando se encuentran en solución iónica de diferente composición química, (ClNa 141 mOsm y ADA, 5 y 30 mOsm); en cambio, provoca la muerte del total de los animales expuestos, en el curso de unas pocas horas, cuando el medio de incubación carece de iones (ADE y MAN 141 mOsm).

10. Se comprobó que la toxicidad por Cd en larvas de Bufo arenarum expuestas a una concentración subletal del mismo en soluciones no iónicas se halla asociada a importantes alteraciones en la organización de la epidermis. La magnitud de las alteraciones epidérmicas mencionadas, es semejante a la encontrada en larvas jóvenes expuestas a concentraciones letales de Cd en medio iónico control (ADA 5 mOsm).

Dichas alteraciones se encuentran relacionadas con la ausencia de iones, puesto que la misma concentración de Cd en medio iónico no provoca modificaciones de ningún tipo en dicha estructura.

11. Los resultados de experimentos preliminares sugieren que el contenido intralarval del Cd pareciera no ser el causante de la mortalidad en medio iónico ya que su cantidad no difiere de la hallada en animales incubados en medios iónicos control.

Independientemente de la presencia de Cd en solución, en medio carente de Ca externo (ADE, MAN y CINA) se produce un importante descenso del contenido intralarval de Ca.


Dr. ALFREDO SALIEBAN



BIBLIOGRAFIA CITADA

- Alvarado R.H. y Johnson S.R.(1966). The effects of neurohypophysial hormones on water and sodium balance in larval and adult bullfrogs (Rana catesbeiana). Comp. Biochem. Physiol. **18**:549-561.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Pollution Control Federation (WPCF) (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th Ed. Washington DC.
- Ardizzone C y Lippe C. 1985. Effect of vasopressin on the permeability of non electrolytes across the skins of Rana esculenta and Bufo bufo. Arch. Intern. Physiol. Biochim **93**: 135-141.
- Balinsky J.B. (1881). Adaptation of nitrogen metabolism to hyperosmotic environment in Amphibia. J.Exp. Zool. **215**: 335-350.
- Bandó R. (1976) Heavy metals concentrations (chromium, copper, manganese and lead) in tadpoles and adults of Rana esculenta (L). Memorie Ist. Ital. Idrobiol. **3** 325-344.
- Bentley P.J. (1971). Endocrines and Osmoregulation. A comparative account of the regulation of water and salt in vertebrates. Springer-Verlag. Berlin. pp 300.
- Bewers, J.M., Barry, P.J. and MacGregor, D.J. 1987. Distribution and Cycling of Cadmium in the Environment. En Niriagu, J.O. and Sprague, J.B. (Ed) Cadmium in the aquatic environment John Wiley & Sons, Inc. p:1-19.

- Block. M. (1991). Uptake of cadmium in fish: effects of xanthates and diethyldithiocarbamate. Acta Univ. Upsaliensis. Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Sciences 326. Uppsala.
- Block M., Wicklund Glynn A. y Pärt P. (1991). Xanthate effects on cadmium uptake and intracellular distribution in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) gills. Aquatic Toxicology, **20**: 267-268.
- Burggren W.W. y Just J.J (1992) Developmental changes in physiological systems. En Feder M.E. y Burggren W.W.(Eds) Environmental Physiology of the Amphibians . pp:467-530.
- Castañé P.M., Salibián, A., Zylbersztein C. y Herkovits J. 1987. Ontogenic screening of aldosterone in the South American toad Bufo arenarum (Hensel). Comp. Biochem. Physiol. **86A**: 697-701.
- Capelletti C.A. (1983). Elementos de estadística . Cesarini Hnos. Buenos Aires. pp. 368.
- Cheng L., Franco P.J. y Schultz-Baldes M. (1979). Heavy metals in the sea-skater Halobates robustus from the Galápagos Islands: concentrations in nature and uptake experiments, with special reference to cadmium. Mar. Biol. **54**: 201-206.
- Cooke A.S. (1981). Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. Environm. Pollut. **25**: 123-133.
- Danielson K.G., Ohi S. y Huang P.C. (1982). Immunochemical detection of metallothionein in specific epithelial cells of rat organs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **79**: 2301-2304.

- Dawson D., Stebler, E.F., Burks, S.L. y Bantle, J. (1988). Evaluation of the developmental toxicity of metal-contaminated sediments using short-term fathed minnow and frog embryo-larval assays. Environm. Toxicol. Chem. 7: 27-34.
- Degani G. 1985. Osmoregulation in red blood cells of Bufo viridis. Comp. Biochem Physiol. 81A: 451-453.
- Degani G. y Nevo E. 1986. Osmotic stress and osmoregulation of tadpoles and juveniles of Pelobates syriacus. Comp. Biochem. Physiol. 83A: 365-370.
- Del Conte E. y Sirlin J.L. (1951). Los primeros estadios embrionarios en Bufo arenarum. Acta Zool. Lilloana 12: 495-499.
- Dixon W.J. (1881). BMDP Statistical Software. Univ of California Press, Berkeley.
- Dmowsky K. y Karolewsky M.A. (1979). Accumulation of zinc, cadmium and lead in invertebrates and in some vertebrates according to the degree of an area contamination. Ekol. Pol. 27: 333-349.
- Dogmann G. y Nürnberg H.W. (1982). Observations with Thalassiosira rotula (Meunier) on the toxicity and accumulation of cadmium and nickel. Ecotoxicol. Environm. Saf. 6: 535-544.
- Duelman W.E. y Trueb L. (1983). Biology of Amphibians. Mc Graw Hill, Book Co. 670 pag.
- Echeverria D.D. y Fiorito de López L.E. (1981). Estadios de la metamorfosis en Bufo arenarum (Anura). Physis (Buenos Aires) 40 B: 15-23.

- Echeverria D.D. y Fiorito de López L.E. (1992). Estereomorfología del aparato bucal y de la cavidad oral de las larvas de Ololygon fuscovaria (Lutz, 1925) (Anura, Hylidae) Rev. Mus. Arg. Cs. Nat. Bernardino Rivadavia, Zool. **16**: 1-13.
- Eckert R. (1990). Fisiología Animal Mecanismos y Adaptaciones. Capítulo 12: Osmorregulación y excreción. pag:387-434. 3ra Ed.
- Fassett D.W. (1973). Cadmium: Biological effects and occurrence in the environment. Ann. Rev. Pharmacol. **15**: 425-435.
- Fidelman y Watling, 1987. Effect of aldosterone and insulin on mannitol, Na and Cl fluxes in cultured epithelia of renal origin (A6): evidence of increased permeability in the paracellular pathway. Biochem.Biophys. Acta. **93**: 205-214.
- Finney D.J. (1971). Probit analysis. Cambridge University Press. Londres. 333 pag.
- Foulkes, E.C. (1986). Absorption of cadmium. En Foulkes, E.C (Ed.) Cadmium. Springer-Verlag, Berlin. pp:75-97.
- Fowler B.A. (1987). Intracellular compartmentation of metals in aquatic organisms: roles in mechanisms of cell injury. Environm. Health Persp. **71**: 121-128.
- Gagne F., Marion M. Denizeau F. (1990). Metal homeostasis and metallothionein induction in rainbow trout hepatocytes exposed to cadmium. Fund. Appl. Toxicol. **14**: 429-437.
- Gasser K. W. y Miller B. T. 1986. Osmoregulation of larval blotched tiger salamanders, Ambystoma tigrinum melanostictum in saline environments. Physiol. Zool. **59**: 643-648.

- Gazitúa S., González J., Condeza M. Blanco E. y Gosset C. 1988). Autorregulación del transporte de sodio en hiperosmolaridad. Arch. Biol. Med. Exp. **21**: R297.
- Giles M.A. (1984). Electrolyte and water balance in plasma and urine of rainbow trout (Salmo gairdneri) during chronic exposure to cadmium. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **41**: 1678-1685.
- Hamburger V. (1969). A Manual of Experimental Embriology. University Press. Londres.
- Hayashi H. Takada M. y Arita A. (1977). Effects of cadmium on the active transport of sodium by the abdominal skin of a bullfrog (Rana catesbeiana). Jap. J. Physiol. **27**: 337-352.
- Hemetraad J. y Hervwing H.J. (1988). Cadmium Kinetics in freshwater clams. IV. Histochemical localization of cadmium in Anodonta cygnea y Anodonta anatina, exposed to cadmium chloride. Arch. Environm. Contam. Toxicol. **17**: 333-343.
- Herkovits J. y Fernández A. (1979). Tolerancia a noxas durante el desarrollo embrionario. Medicina (Bs. As.) **39**: 400-408)
- Herkovits J. y Pisanó A. (1980). Estudio con microscópio electrónico de barrido de la evolución de las células ciliadas ectodérmicas en embriones de Bufo arenarum. An. Soc. Cient. Arg. **206**: 23-28.
- Herkovits J. y Pésico A. (1982). Papel del calcio sobre la forma y contactos celulares en etapas iniciales del desarrollo embrionario: estudio con microscopía electrónica de barrido. Rev. Univ. Nac. Lomas Zamora. **1**: 65-76

- Hillyard S.D., Sera R. y Gonick H.C. (1979). Effects of Cd^{++} on short-circuit current across epithelial membranes. II Studies with the isolated frog skin epithelium, urinary bladder and large intestine. J. Membrane Biol. **6**: 268-294.
- Hoffman J. y Katz U. 1991. Tissue osmolytes and body fluid compartment in the toad Bufo viridis under simulated terrestrial conditions. J. Comp. Physiol. **161**: 433-439.
- Hochacka P.W. y Somero G.N. (1984). Biochemical adaptation. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Jacobson K.B. y Turner J.E.. (1980). The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. Toxicology **16**: 1-37.
- Katz U. (1987). The effect of salt acclimation on the water uptake and osmotic permeability of the skin of the toad (Bufo viridis, L.). J. Physiol., Paris, **82**: 183-187.
- Katz U.; Degani G. y Gabbay S. (1984). Acclimation of the euryhaline toad Bufo viridis to hyperosmotic (NaCl, urea and mannitol). J. Exp. Biol. **108**: 403-409).
- Katz U. y Hoffman J. (1989). Changing plasma osmolarity: a strategy of adaptation of anuran amphibians to water scarcity under burrowing conditions. Fortschr Zool **38**: 163-168.
- Kawada U., Taylor R.E. Jr. and Barker, S.B. 1969. Measurement of Na-K-ATPase in the separated epidermis of Rana catesbeiana frogs and tadpoles. Comp. Biochem. Physiol. **30**: 965-975.
- Manson J.M. y O'Flaherty E.J. (1978). Effects of cadmium on salamander survival and limb regeneration. Env. Res. **16**: 62-69.

- Martoja T., Truchet M. y Bouquegneau J.M. (1981). Une néphropathie provoquée par le cadmium chez l'anguille adaptée a l'eau de mer (Téléostéen) C.R. Acad. Sc. **295**: 369-374.
- Minotti P.G., Herkovits J. y Salibián A. (1983). Desarrollo de embriones de Bufo arenarum en agua destilada: tolerancia y alteraciones en el tejido ectodérmico. Res. II Congr. Arg. Cs. Morfológ. p:24.
- Morrison D.F. (1976) Multivariate Statistical Methods. Mc Graw Hill, New York. 415 pp.
- Niriagu, J.O. y Pacyna, J.M. (1988). Quantitative assesement of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. Nature **333**: 134-139.
- Ouellette A.J., Aviles L., Burnweit C.A., Frederic D. y Malt R.A. (1982). Metallothionein mRNA induction in mouse small bowel by oral cadmium and zinc. Amm. J. Physiol. **243**: G396-G403.
- Page, A.L., El-Ammamy, M.M.y Chang, A.C. 1986. Cadmium in the environment and its Entry into terrestrial food chain crops. En Foulkes, E.C (Ed.) Cadmium. Springer-Verlag, Berlin. pp:33-75.
- Pérez-Coll C.S., Herkovits, J.y Salibián, A. (1985). Efectos del cadmio sobre el desarrollo de un anfibio. Arch. Biol. Med. Exper. **18**: 33-39.
- Pérez-Coll C.S., Herkovits J. y Salibián, A. (1986). Teratogenic effects of cadmium on Bufo arenarum during gastrulation. Experientia **42**: 1174-1176.
- Pérez Coll C.S., Herkovits J. y Salibián A. (1988). Embriotoxicity of Lead on Bufo arenarum. Bull. Environm. Contam. Toxicol. **41**: 247-252.

- Pisanó A. (1956). Método para mentener la hipófisis de anfibio fisiológicamente "in vivo". Arch. Bioq. Quim. Farm. 7: 387-391.
- Rao J. y Madhayasta M. N. (1987). Toxicities of some heavy metals to the tadpoles of frogs, Microhyla ornata (Dumeril & Bibron). Toxicol. Lett. 36: 205-208.
- Randi A.S., Romano L.A. y Monserrat J. (1993). Estres branquial en el pez de agua dulce Macropsobrycon uruguayanae (Eigenmann, 1915) expuesto a cadmio y al ayuno. Resúmenes XVI Reun. Arg Ecol. p:251.
- Ravera, O., 1984. Cadmium in freshwater ecosystems. Experientia 40: 2-14.
- Reboreda J.C. 1987. Control del balance acuoso en anfibios. Integración de mecanismos nerviosos, neuroendócrinos y comportamentales. Tesis doctoral Facultad de Ciencias Exactas y naturales, Universidad de Buenos Aires. p: 60-88.
- Ringuelet R.A., Salibián, A., Clavérie E. y Ilhero S. (1967). Limnología química de las lagunas pampásicas (Provincia de Buenos Aires). Physis 27: 201-221.
- Roch M. y Maly E.J. (1979). Relationship of cadmium-induced hypocalcemia with mortality in rainbow trout (Salmo gairdneri) and the influence of temperature on toxicity. J. Fish. Res. Board. Can. 36: 1297-1303.
- Salibián A. 1977. Transporte de cloro y de sodio a través de la piel "in situ" de anfibios sudamericanos. Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. 35: 121-163.
- Salibián A. 1992. Effect of Deltamethrin on the South American toad Bufo arenarum tadpoles. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 48: 616-621.

- Schrock, H. y Hanke, W. (1979). Cell volume regulation in tadpoles of Xenopus laevis in hypertonic salt solution. Comp. Biochem. Physiol. **63A**: 399-403.
- Schrock, H.; Bauer, O.; Merkle, S. y Hanke, W. (1980). Cell volume regulation in juveniles of Xenopus laevis in hypertonic mannitol solution. Comp. Biochem. Physiol. **65A**: 259-265.
- Shpun, S.; Hoffman J. y Katz, U. 1992. Anuran amphibia which are not acclimatle to high salt, tolerate high plasma urea. Comp. Biochem. Physiol. **103A**: 473-477.
- Simkiss K. y Watkins B. (1988). Metal ion activities in oscillating temperatures. Mar. Environm. Res. **24**: 125-128.
- Smith M.J., Pihl R.O. y Garber B. (1982). Postnatal cadmium exposure and long term behavioral changes in the rat. Neurobehav. Toxicol. Teratol. **4**: 283-287.
- Snedecor G.W. y Cockran W.G. (1969). Statistical Methods. Iowa State University Press. Iowa. pp.534.
- Somero G.N. (1992). Adapting to water stress: Convergence on common solutions. En Somero, G.N., Osmond, C.B. y Bolis, C.L. (Eds.), Water and Life. Springer-Verlag. pp:1-18.
- Sprague, J.B. 1987. Effects o cadmium on freshwater Fish. En Niriagu, J.O. y Sprague, J.B. Cadmium in the aquatic environment. Jhon Wiley & Sons. pp: 139-171.
- Takada M. y Hayashi H. (1980). Effects od cadmium on active sodium transport by the abdominal skin and the isolated epidermis of the bullfrog: differences in effects beteen epideeermal and dermal cadmium applications. Jap. J. Physiol. **30**: 257-269.

- Thorpe J.H. y Costlow J.D. (1989). The relation of the acute (96-h) uptake and subcellular distribution of cadmium and zinc to cadmium toxicity in larvae of Rhithropanopeus harrisii and Palaemonetes pugio. En Cowgill U.M. y Williams L.R.(Eds) Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 12th Volume. pp:82-95.
- Timasheff S.N. (1992). A physicochemical basis for the selection of osmolytes by nature. En Somero, G.N., Osmond, C.B. y Bolis, C.L. (Eds.), Water and Life. Springer-Verlag. pp: 70-84.
- U.S. Department of Health Human Services . 1993. Toxicological profile for cadmium. (Atlanta, Georgia). 171 pag, y tres Apéndices.
- Verboost P.M., Senden M.H.M.N. y Os C.H. (1987). Nanomolar concentration of Cd²⁺ inhibit Ca²⁺ transport system in plasma membranes and intracellular Ca²⁺ stores in intestinal epithelium. Biochim. Biophys. Acta. **902**: 247-252.
- Verboost P.M., Flik G., Lock R.A.C. y Wendelaar Bonga S.E. (1988). Cadmium Inhibits Plasma membrane calcium transport. J. Membrane Biol. **102** 97-104.
- Warburg M.R. y Rosenberg M. 1990. Ion and water balance and their endocrine control in the aquatic amphibians. En Hanke, W.(Ed) Biology and Physiology of Amphibians. Gustav Fisher Verlag-Stuttgart. New York. p: 385-403.
- Yancey P. H. y Somero G.N. 1978. Urea-requiring lactate dehydrogenases of marine elasmobranch fishes. J. Comp. Physiol. **125**: 135-141.
- Yancey P.P., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D. y Somero G.N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolytes system. Science **217**: 1214-1222.
- Zar H.J. (1984). Biostatistical Analysis. 2nd Ed. Prentice-Hall. Toronto. 718 pag.

Comunicaciones de los resultados presentados en esta tesis:

a. Reuniones científicas:

FERRARI, L., SALIBIAN, A. 1987. Ontogénesis de la Osmoregulación en Anuros: Exposición prolongada de larvas de Bufo arenarum a soluciones de diferentes osmolaridad. Res. III^{as}. Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral. pag. 28.

FERRARI, L., LOMBARDO, R.J., SALIBIAN, A. 1988. Modificaciones en el equilibrio hídrico de larvas de Bufo arenarum expuestas a soluciones de D-Manitol. Res. XVI Cong. Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas.:pag. 96.

- MUIÑO, C., FERRARI, L., SALIBIAN, A. 1988. Cadmium toxicity in Bufo arenarum tadpoles: Protective action of ions. Comunicaciones Biológicas. Vol 7 n° 1.pag.:70.
- FERRARI, L. y LOMBARDO, R. 1990. Análisis multivariado aplicado a estudios de equilibrio hídrico en larvas de Bufo arenarum. Arch. Biol. Med. Exper.,23 (3):212.

FERRARI, L. y SALIBIAN, A. 1991. Alteraciones epidermicas en larvas juvenes de Bufo arenarum expuestas a cadmio en soluciones no iónicas. Arch. Biol. Med. Exper., 24(2): 141.

FERRARI, L. STRIPEIKIS, J. TROCCOLI, O. y SALIBIAN, A. 1992. Contenidos iónicos intralarvales de Bufo arenarum en diferentes soluciones con y sin cadmio. Res.I Congreso Latinoamericano de Toxicología. p:107. 1992.

FERRARI, L y SALIBIAN, A. 1994. Análisis multivariado del balance hídrico de larvas de Bufo arenarum expuestas a soluciones de D-manitol. Resúmenes XVIII Congreso latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. 1994. en Fe de Erratas.

b. Artículos publicados:

MUIÑO, C.V., FERRARI, L., SALIBIAN, A. 1990. Protective actions of ions against the Cadmium toxicity to Bufo arenarum young tadpoles. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 45 (3): 313-319.

- FERRARI, L., SALIBIAN, A. MUIÑO, C.V. 1993. Selective protection of temperature against acute toxicity of Bufo arenarum tadpoles. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50(2): 213-218.

SUBSIDIOS RECIBIDOS

Observaciones sobre el equilibrio iónico en larvas de Bufo arenarum. Otorgado por la CIC. Bs.As. Res. nº 7812, Leg. 2109-3108/86.

- Efectos del Cd sobre el balance iónico durante el desarrollo larval temprano y tardío de Bufo arenarum. 1989. Otorgado por el CONICET. Proyecto 004-0382/88.